

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

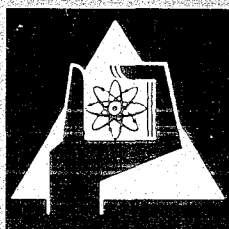
Januar 1970

KFK 1139

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen zur Frage der Metabolisierung synthetischer
Polyaminopolycarboxylsäuren

H. Zorn



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Januar 1970

KFK 1139

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen zur Frage der Metabolisierung synthetischer
Polyaminopolycarboxylsäuren

Herbert Zorn

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Orientierende Untersuchungen	6
3. Versuche zur Anreicherung des Enzyms	10
3.1. Differentialzentrifugation	10
3.2. Behandlung mit Detergentien	12
3.3. Ultraschallbehandlung	12
3.4. Enzymatische Ablösung des Enzyms von den Zellstrukturen	14
4. Versuche zur Charakterisierung des Enzyms	15
4.1. pH-Abhängigkeit	15
4.2. Zeitabhängigkeit	16
4.3. Temperaturabhängigkeit	16
4.4. Veratmung unter Luft, N ₂ und O ₂	17
4.5. Wirkung von Enzymhemmern	18
4.6. Wirksamkeit der Cytochromoxidase	21
4.7. Untersuchung verschiedener Organe und Körperflüssigkeiten	23
4.8. Vergleich zwischen NaCa-ÄDTA und NaFe-ÄDTA	24
5. Zwischendiskussion	24
6. Versuche mit gereinigten Chelatbildnern	29
6.1. Vorversuch und in vitro-Veratmung	29
6.2. In vivo-Versuche mit Chelatbildnern unter- schiedlichen Reinheitsgrades	30
6.3. Elektrophoretische Untersuchung	32
7. Diskussion	33
8. Zusammenfassung	42
9. Methodik	43
10. Literatur	50
11. Tabellen	53
12. Abbildungen	64

1. Einleitung

Chelatbildner vom Typ der synthetischen Polyaminopolycarboxylsäuren haben sich im Verlauf der letzten Jahre als Mittel der Wahl bei der Therapie von Vergiftungen mit stabilen und radioaktiven Metallionen erwiesen (Übersicht bei Catsch 1968a). Die Fähigkeit dieser Substanzen, mit einer großen Zahl von Metallionen sehr stabile, wasserlösliche Komplexe zu bilden, die schnell durch die Nieren ausgeschieden werden, ließen sie als optimales Antidot bei Schwermetallvergiftungen erscheinen. Besonders geeignet wegen ihres günstigen therapeutischen Index schien zunächst die von Munz (1935) patentierte Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA). Wegen ihrer starken Affinität zu Ca^{2+} wurde sie zunächst in der Textilindustrie zur Wasserenthärtung verwendet und seit 1952 zur Behandlung von Pb-Vergiftungen eingesetzt (Rubin et al. 1953). In der Folgezeit stieg die Verwendung der ÄDTA und verwandter Chelatbildner, in erster Linie der im Vergleich zu ÄDTA wirksameren Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA), in der klinischen Medizin sprunghaft an.

Bereits Dykerhoff et al. (1942) zeigten, daß die $\text{Na}_4\text{ÄDTA}$ eine hohe toxische Wirkung auf Versuchstiere hat, die sich in einem starken Blutdruckabfall mit Krämpfen und Exitus äußert. Es konnte gezeigt werden, daß dies auf einer drastischen Senkung des Ca-Blutspiegels beruht. Aus diesem Grund wird bei der therapeutischen Anwendung der ÄDTA im allgemeinen das Ca-Chelat verabfolgt. Bei der Bedeutung dieser Verbindung lag es frühzeitig nahe, ihr genaues Verhalten im Organismus zu studieren. Foreman et al. (1953) untersuchten an Ratten das Verteilungsmuster und die Ausscheidung von ^{14}C -markierter ÄDTA. Zur Anwendung kam eine in α -Stellung zur Carboxylgruppe vierfach markierte ÄDTA (ÄDTA-2- ^{14}C). Die Applikation erfolgte intravenös, intraperitoneal und oral mit einer Trägerdosis von 50 mg $\text{Na}_2\text{Ca-ÄDTA/kg}$ in 0,2 ml wässriger Lösung (pH 7). Es zeigte sich,

daß die Verweilzeit der $\text{Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ im Organismus sehr kurz ist. Bereits nach 6 Std. werden mit dem Urin etwa 95 % der ^{14}C -Dosis ausgeschieden (Tabelle 1). In der ausgeatmeten Luft wurden nach 24 Std. nur $< 0,1$ % der ^{14}C -Dosis gefunden. Dieses Ergebnis deutete auf einen vernachlässigbaren metabolischen Abbau im Organismus hin, zumal auch bei der papierchromatographischen Untersuchung des Urins keinerlei radioaktive Metaboliten gefunden wurden. Dazu ist kritisch folgendes zu bemerken:

1. Das ausgeatmete $^{14}\text{CO}_2$ wurde als BaCO_3 gefällt und mit Hilfe eines Methandurchfluß-Zählrohres gemessen. Diese Methode ist im Vergleich zu der jetzt üblichen Messung mit Flüssigszintillatoren ziemlich unempfindlich.

2. Die Papierchromatographie wurde auf Whatman No. 1 Filterpapier absteigend 12 - 15 Std. mit einem 1:1-Gemisch aus iso-Propanol mit HCl 0,2 N (pH 1,5) als Laufmittel durchgeführt. Wie ein von uns durchgeführter Kontrollversuch zeigt, fällt in diesem sauren Laufmittel offensichtlich $\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ im Verlauf der Chromatographie aus (Abb. 1). Diese erzeugt entlang des Laufweges eine Spur aus kleinen Kristalliten, so daß der Schluß auf Einheitlichkeit der chromatographierten Substanz nicht zulässig ist. Außerdem deutet der hohe R_f -Wert von 0,8 darauf hin, daß das Laufmittel stark eluierende Eigenschaften hat. Damit ist der Schluß von Foreman et al. auf die metabolische Inertheit der $\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ ebenfalls in Frage gestellt.

Erstmals untersuchten Foreman et al. (1956), angeregt durch klinische Erfahrungen mit der Chelattherapie, bei Ratten den Einfluß höherer $\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ -Dosen auf die Niere; sie fanden eine starke hydropische Degeneration der proximalen Tubuli, die nach Absetzen der Chelatbehandlung wieder verschwand. Wie später Weber (1970) zeigte, handelt es sich dabei hauptsächlich um eine Schädigung der proximalen Convoluten. Die der $\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ chemisch ähnliche DTPA , die ebenfalls von erheblichem therapeutischen Interesse ist, wurde

von Foreman et al. 1960 untersucht. Es stellte sich heraus, daß auch diese Verbindung starke Veränderungen in den Nieren von Ratten hervorruft. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen an Mäusen und Ratten mit den Ca-Chelaten der ÄDTA und DTPA bestätigt und erweitert (Catsch 1964). Der für die Schädigung der Niere verantwortliche Mechanismus der ÄDTA-Wirkung blieb jedoch ungeklärt. Reuber (1963) zeigte, daß bei gleichzeitiger Verabfolgung von Cortison die toxische Wirkung von ÄDTA auf die Nieren potenziert wird. Derselbe Autor fand sowohl eine starke Abhängigkeit der durch CaÄDTA hervorgerufenen Nierenschäden vom Stamm der verwendeten Versuchstiere (Reuber und Lee 1966) als auch eine je nach Alter der Tiere unterschiedliche Wirkung auf die Nieren (Reuber 1967). Es lag nahe, die beobachtete starke Vakuolisierung der Nierenzellen mit einer Beeinflussung der darin vorkommenden Enzyme in Zusammenhang zu bringen (Foreman 1960). Schwartz et al. (1966) untersuchten daher die Aktivität mehrerer Enzyme in der Nierenrinde von Ratten, die vorher mit unterschiedlichen CaÄDTA-Dosen behandelt worden waren, konnten jedoch keine Parallelität zwischen den morphologischen Nierenschädigungen und Änderungen in der Enzymaktivität feststellen. Nach eingehenden Untersuchungen der von CaÄDTA und CaDTPA hervorgerufenen Wirkungen auf Ratten kamen Doolan et al. (1967) zu dem Schluß, daß wahrscheinlich die Niere als kritisches Organ für die Toxizität nicht in Betracht kommt, sondern vielmehr eine (nicht näher spezifizierte) allgemeine Reaktion des Organismus ("systemic reaction") dafür verantwortlich ist. Trotz dieser Untersuchungen herrschte weiterhin Unklarheit über den Entstehungsmechanismus der durch die Chelatbildner erzeugten Nierenschäden. Es lagen zwar einige Erklärungsversuche vor, z.B. wurde ein der (von Allen (1951) nach parenteraler Verabreichung hypertotonischer Lösungen von Saccharose und Äthylenglykol gefundenen) "osmotischen" Nephrose ähnlicher Effekt diskutiert, doch können diese Überlegungen keineswegs alle Befunde widerspruchsfrei erklären (zusammen-

fassende Diskussion bei Harmuth-Hoene 1967 und Catsch 1968b). In diesem Zusammenhang war von Interesse, daß Darwish und Kratzer (1965) fanden, daß bei Küken nach der Verfütterung von $\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ in der Expirationsluft 4,2 bzw. 5,4 % der ^{14}C -Dosis nachweisbar waren. Dieser Befund, zusammen mit den von Havlíček et al. (1968) erhaltenen Ergebnissen, veranlaßten Catsch (1968b) zur Erklärung der Toxizität der Chelatbildner eine mögliche Einwirkung ihrer Metaboliten auf die Niere zur Diskussion zu stellen. Havlíček et al. hielten eine Wiederholung und Erweiterung der von Foreman et al. (1953) durchgeführten Experimente für angebracht und untersuchten daher sowohl ÄDTA als auch DTPA in Form verschiedener Metallchelate auf ihr metabolisches Verhalten bei Ratten. Als Versuchstiere dienten Ratten, denen die Chelate in 0,5 ml Wasser (pH 7,4) in verschiedener Dosierung intraperitoneal injiziert wurden. Die Aktivität der Lösungen betrug 10 - 20 $\mu\text{Ci/ml}$. Bei den Versuchen befanden sich die Tiere in einem Exsikkator, durch den Luft gesaugt wurde, auf einem Drahtnetz über Kieselgel. Anschließend wurde die Atemluft zur Trocknung durch eine Waschflasche mit Kieselgel sowie (zwecks Sättigung mit Methanol) durch eine zweite mit Methanol geleitet. Darauf wurde das ausgeatmete CO_2 in zwei hintereinandergeschaltete Waschflaschen, die mit je 12 ml Absorptionsflüssigkeit ($\text{Äthanolamin:Methanol } 1:3\text{V/V}$) gefüllt waren, geleitet. Nach Zugabe von 10 ml Petroff-Szintillator wurde die ^{14}C -Aktivität in einem Flüssigszintillationszähler gemessen. Wie aus den Tabellen 2 und 3 ersichtlich, konnte weder eine Dosisabhängigkeit der Veratmung noch eine Abhängigkeit von der Art des chelierten Metallions nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der Arbeit von Foreman et al. wurde allerdings eine wesentlich höhere Veratmung, nämlich $\sim 1\%$ der ^{14}C -Dosis gefunden. ÄDTA unterliegt dabei einem etwas stärkeren Abbau als DTPA . Bei ÄDTA war es gleichgültig, ob die Markierung an der Carboxylgruppe oder in α -Stellung zu ihr erfolgte; die äthylenmarkierte ÄDTA erwies sich dagegen als

praktisch metabolisch inert. Es ergeben sich zweierlei Möglichkeiten zur Interpretation dieser Befunde:

1. Die empfindlichere Meßmethode - verglichen mit der von Foreman angewandten - gestattet, den Abbau der Chelatbildner nachzuweisen. Da nur bei den an der Azetatgruppe markierten Verbindungen $^{14}\text{CO}_2$ in der Atemluft gefunden wurde, muß angenommen werden, daß nur diese Gruppen metabolisiert werden.
2. Die verwendeten Präparate waren entweder von der Synthese oder durch Autoradiolyse mit aktiven Substanzen verunreinigt, die metabolisiert werden und einen Abbau der Chelatbildner im Organismus vortäuschen.

Um die zweite Möglichkeit auszuschließen, wurden die Injektionslösungen sowohl papierchromatographisch als auch mittels Hochspannungselektrophorese untersucht. Beim Ausmessen der Streifen im Methandurchflußzähler (4 π -Geometrie) ergaben frische Lösungen von Na_2Ca ÄDTA-1- ^{14}C und Na_3H_2 -DTPA-1- ^{14}C einheitliche Peaks. Bei einer 3 Wochen bei Zimmertemperatur gelagerten Na_3H_2 DTPA-1- ^{14}C -Lösung zeigte sich ein kleiner zweiter Peak, der aber auf das Ausmaß der in vivo-Veratmung keinen Einfluß hatte. Eine mit 20 MR γ -bestrahlte Probe von Na_3H_2 DTPA-1- ^{14}C zeigte im Elektropherogramm eine deutliche Verunreinigung, und ihre in vivo-Veratmung stieg auf 1,3 % an.

Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß der gefundene Veratmungseffekt tatsächlich auf einem Metabolismus der Chelatbildner beruht und nicht auf Verunreinigungen zurückzuführen ist.

Es erhob sich nun die Frage, welches Organ hauptsächlich für den Metabolismus der Chelatbildner verantwortlich ist und welches Enzym oder Enzymsystem den Abbau bewirkt. Außerdem waren die entstehenden Metaboliten zur Erklärung der evtl. toxischen Wirkung dieser Substanzen von besonderem Interesse. Damit sind die Aufgaben der vorliegenden Arbeit umrissen.

2. Orientierende Untersuchungen

Die in vitro-Versuche zum Abbau der Chelatbildner wurden mit Homogenaten aus frischen Organen von Ratten des Heiligenberg-Inzuchtstammes durchgeführt. Wegen der bekannten Nephrotoxizität der Chelatbildner lag es nahe, das Hauptaugenmerk bei der Suche nach einem die ÄDTA abbauenden Enzym auf die Nieren zu legen. Daneben schien die Leber als Organ, in dem zahlreiche Entgiftungsprozesse ablaufen, und das Blutserum am ehesten als Enzymquelle in Frage zu kommen. Zunächst wurden alle Experimente mit der am leichtesten zugänglichen Verbindung, der ÄDTA-2-¹⁴C, durchgeführt. Nach der Klärung ihres in vitro-Verhaltens sollten die Versuche durch DTPA-1-¹⁴C, ÄDTA-1-¹⁴C sowie ÄDTA-äthylen-¹⁴C erweitert und mit den in vivo-Ergebnissen von Havlíček et al. verglichen werden. Da für die Chelatbildner offensichtlich ein oxydativer Abbau anzunehmen ist, wurde folgende Versuchsanordnung zum Nachweis des vermuteten enzymatischen Abbaus gewählt (Abb. 2): Als Reaktionsgefäß diente eine ca. 12 ml fassende Waschflasche mit Fritte, in der sich ein sog. Standardansatz befand. Darauf folgte eine gleichgroße Sicherheitsflasche, der ein mit Kieselgel gefülltes U-Rohr zur Trocknung nachgeschaltet war. Das entstehende ¹⁴CO₂ wurde in einem Absorptionsgefäß, das mit 12 ml einer Mischung aus Methanol und Äthanolamin (3:1 V/V) gefüllt war, aufgefangen. Das Reaktionsgefäß und die Sicherheitsflasche wurden in einem Wasserbad thermostatiert (30 °C). Zur "Beatmung" des Ansatzes wurde langsam ein Luftstrom durch die Apparatur gesaugt. Die Inkubationsdauer betrug 1 Std., dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml halbkonzentrierter H₂SO₄ gestoppt und anschließend noch 20 min. mit Luft gespült, um alles ¹⁴CO₂ zu absorbieren.

Die Untersuchung enzymatischer Reaktionen erfordert die Einführung einer Maßeinheit für die Enzymaktivität. Im "Report of the Commission on Enzymes" (1961) wird die Enzymeinheit wie folgt definiert: Eine Enzymeinheit ist die Menge, die unter definierten Bedingungen pro Minute $1 \mu\text{mol}$ Substrat umsetzt. Die Reaktionsbedingungen müssen dabei optimal sein, und als Standardtemperatur gilt 25°C . Die spezifische Aktivität eines Enzympräparates ist demnach die Anzahl der Enzymeinheiten pro mg Protein. Oft ist es allerdings zweckmäßig, die enzymatische Aktivität in relativen Einheiten zu messen. Bei der Metabolisierung der ÄDTA ist z.B. nicht bekannt, wie viele Acetatgruppen abgebaut werden, so daß die obige Definition der Enzymeinheit nicht angewendet werden kann. Daher wurde in dieser Arbeit die enzymatische Aktivität entweder durch den als $^{14}\text{CO}_2$ gemessenen, abgebauten Prozentsatz der Dosis oder direkt durch die gefundenen Zerfälle pro Minute ausgedrückt. Als spezifische Aktivität wird im folgenden die (wie vorstehend definiert) enzymatische Aktivität pro Gewichtseinheit (g oder mg) Protein bzw. Organpräparat bezeichnet. Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe der Biuret-Methode (Beisenherz et al. 1953) durchgeführt. Mit Darmhomogenaten war diese Methode wegen der starken Trübung der Reaktionslösung, die eine Extinktionsmessung unmöglich machte, nicht anwendbar.

Bereits die ersten, orientierenden Versuche im physiologischen pH-Bereich von 7,4 zeigten, daß offensichtlich die "spezifische Aktivität" von Nierenhomogenaten wesentlich über der von Leberhomogenaten liegt, während im Serum dagegen keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte (Tabelle 4). Allerdings zeigte sich, daß bei Umrechnung auf das ganze Organ die Leber mehr Chelatbildner abbaut als die Niere. Es sei jedoch an dieser Stelle darauf

hingewiesen, daß Schlußfolgerungen aus in vitro-Versuchen auf den Metabolismus im Tier nicht ohne weiteres zulässig sind. Einerseits ist ein in vitro-System wesentlich einfacher, andererseits aber auch komplizierter als der Organismus. Einfacher, da man den Einfluß aller anderen Organe außer dem untersuchten ausschließen und definierte Bedingungen schaffen kann; komplizierter, weil ein Organhomogenat im Gegensatz zur intakten Zelle eine ungeordnete Mischung verschiedenster Zellbestandteile darstellt.

Die Untersuchung enzymatischer Reaktionen erfordert möglichst optimale Bedingungen. Darunter werden Reaktionsbedingungen verstanden, bei denen der für die Reaktion günstigste pH-Wert herrscht und das Enzym jederzeit sowohl mit Substrat als auch mit allen Cofaktoren gesättigt ist, so daß die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion eine lineare Funktion der Enzymkonzentration ist. Insbesondere sind optimale Bedingungen Voraussetzung für die Bestimmung von Anreicherungs- und Reinheitsgrad der Enzympräparation. Unter Umständen muß man allerdings, z.B. aus Gründen der Löslichkeit des Substrats, in einem System arbeiten, das obige Voraussetzungen nicht ganz erfüllt.

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion wurde ein Vorversuch bei 3 verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Der Standardansatz I wurde unter Standardbedingungen in folgenden Puffern beatmet:

- | | |
|---------------------|------------------------|
| 1. Sörensen | pH 6,5 |
| 2. Sörensen | pH 7,4 (physiologisch) |
| 3. Pyrophosphat/HCl | pH 8,5 |

Tabelle 5 zeigt, daß die Reaktion offensichtlich im schwach saueren Bereich am besten abläuft. Die genauere Untersuchung erbrachte als pH-Optimum einen Wert zwischen pH 5,5 und 6,0 (s. S.15).

Um diejenige Substratkonzentration zu ermitteln, bei der das Enzym abgesättigt ist, wurde der Standardansatz I unter Standardbedingungen in Gegenwart steigender Substratkonzentrationen beatmet. Zur Änderung der Substratkonzentration wurden verschiedene Volumina einer $\text{Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ -Lösung mit der spezifischen Aktivität von $0,03 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ zugegeben. In Abbildung 3 ist die veratmete Substratmenge in % der eingesetzten Dosis als Funktion der $\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ -Konzentration aufgetragen. Die absolut umgesetzte Substratmenge - unter der Annahme berechnet, daß alle Acetatgruppen abgespalten und veratmet werden - steigt natürlich mit Erhöhung der Substratkonzentration in den Ansätzen (Abb. 4). Eine Enzymsättigung ist aber offensichtlich erst oberhalb $400 \mu\text{mol}$ $\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ pro Ansatz erreicht (Abb. 5). Da die ^{14}C -Aktivität der methodisch limitierende Faktor bei den Experimenten ist, die spezifische ^{14}C -Aktivität aber nicht beliebig gesteigert werden kann, müssen eine Substratkonzentration und eine spezifische Aktivität gewählt werden, bei denen, in bestimmten Grenzen, eine lineare Abhängigkeit der Veratmung von der Enzymmenge besteht und noch eine sichere Nachweismöglichkeit für die Veratmung gegeben ist.

Die Abhängigkeit der enzymatischen Veratmung von der Homogenatmenge wurde im Standardansatz I geprüft. Da die einzige Möglichkeit zur Erhöhung der Enzymkonzentration in der Zugabe steigender Homogenatmengen bestand, wurde vorläufig nur in dem Bereich zwischen $0,25 \text{ ml}$ und 1 ml Homogenat pro Ansatz getestet. Sobald eine Methode zur Anreicherung des Enzyms gefunden war, sollte diese Untersuchung über eine größere Konzentrationsbreite durchgeführt werden. Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, daß in dem genannten Bereich eine lineare Beziehung zwischen Homogenatmenge und freigesetztem $^{14}\text{CO}_2$ unter Standardbedingungen besteht.

Es zeigte sich im Laufe der Untersuchungen, daß Ergebnisse mit Nierenhomogenaten von verschiedenen Ratten schlecht reproduzierbar sind (vgl. S. 15). Der Grund dafür dürfte in einer biologischen Variabilität zu suchen sein, die auch bei Tieren desselben Wurfes und nahezu desselben Gewichts noch beträchtlich sein kann. Daher wurde versucht, eine Methode zur Herstellung von Organpräparaten, die längere Zeit lagerfähig sind, zu finden. Die Lagerung bei 4 °C führt sowohl in Sörensen-Puffer (pH 7,4) als auch in reiner Saccharoselösung (0,25 M) nach 24 Std. zu einem praktisch vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität. Ebenso scheiterte der Versuch, ein Acetontrockenpulver nach der üblichen Methode, d.h. durch Einbringen eines Homogenats in das 10-fache Volumen eisgekühlten Acetons, anschließendes Abtrennen und Lufttrocknung, herzustellen, da die Enzymaktivität bei diesem Verfahren völlig verlorenggeht. Auch die Gefriertrocknung erwies sich als unzureichende Methode, da bereits beim Einfrieren des Homogenats im Kältebad (Trockeneis/Aceton) der größte Teil der enzymatischen Aktivität verloren ging. Der Aktivitätsverlust schwankte stark, er betrug im Mittel 75 %.

3. Versuche zur Anreicherung des Enzyms

3.1. Differentialzentrifugation

Zur Anreicherung des die Chelatbildner abbauenden Enzyms schien es sinnvoll, zunächst mittels einer Differentialzentrifugation die Zellorganellen zu bestimmen, in denen die Hauptmenge des Enzyms lokalisiert ist, und anschließend weitere Anreicherungs- und Reinigungsverfahren anzuwenden. Neben den Mitochondrien, in denen bekanntlich eine große Zahl von Enzymen und insbesondere die gesamte Atmungskette lokalisiert ist, kamen noch hauptsächlich Peroxisomen und Mikrosomen als Enzymquelle in Frage. Bei den Peroxisomen handelt es sich, wie von de Duve und Baudhuin (1966) eingehend beschrieben, um besonders enzymreiche

Teile des Cytoplasmas, die u.a. Katalase, D- und L-Aminosäureoxidase, Cytochromoxidase und saure Phosphatase enthalten. Besonders interessant schien in diesem Zusammenhang, daß die Peroxisomen bisher nur in der Leber und Niere eindeutig nachgewiesen wurden. Daß die Mikrosomen Fremdstoffe hydroxylieren und oxydieren können, ist seit längerem bekannt. Für das vorliegende Problem ist die Arbeit von Kiese und Uehleke (1961), die den Nachweis erbrachten, daß die Mikrosomen für die N-Oxydation von Methyl-N,N-Dimethyl- und Äthylamin verantwortlich sind, von besonderem Interesse. Zwar müßten beim Abbau der ÄDTA nicht Alkylgruppen, sondern Acetatgruppen am Stickstoff oxydativ abgespalten werden, was bei der meist hohen Spezifität enzymatischer Reaktionen nicht vom selben Enzym katalysiert werden sollte; die Tatsache jedoch, daß z.B. sowohl Benzpyren von Mikrosomen hydroxyliert wird (Gelboin und Blackburn 1964), als auch Steroide oxydativ demethyliert werden (Swindell und Gaylor 1968), ließ die Annahme, daß Mikrosomen beim ÄDTA-Metabolismus beteiligt sein könnten, nicht völlig unplausibel erscheinen.

Zur Überprüfung dieser Überlegungen wurde mit einem Nierenhomogenat eine Differentialzentrifugation nach Hogeboom (1955) durchgeführt. Es zeigte sich, daß weder die Mikrosomenfraktion noch das Zytoplasma ein ÄDTA abbauendes Enzym enthielt. Nur in den Kern- und Mitochondrienfraktionen wurden 8 - 10 % der ursprünglichen Enzymaktivität gefunden. Offensichtlich ist die enzymatische Aktivität an Zellstrukturen gebunden, und es tritt während der Präparation eine weitgehende Inaktivierung ein. Daher wurde im Folgenden versucht, das Enzym mittels einschlägiger Methoden in Lösung zu bringen und so einer chromatographischen Anreicherung zugänglich zu machen.

3.2. Behandlung mit Detergentien

Synthetische Detergentien und einige natürlich vorkommende Substanzen mit ähnlicher Wirkung sind in der Lage, Bestandteile biologischer Membranen in Lösung zu bringen (Morton 1955). Dabei werden hauptsächlich mit einem wesentlichen Teil der Zellmembran (Proteinlipiddoppelschichten) Mizellen gebildet, wodurch die Membranstruktur stark verändert wird. Eine Enzymablösung von Membranen ist auf diesem Wege allerdings nur dann möglich, wenn das benutzte Detergenz keine irreversiblen Inhibitoreigenschaften aufweist. Da im allgemeinen kationische, anionische und neutrale Detergentien nicht gleichartig wirken, wurde der Einfluß verschiedener Agentien geprüft: Triton X 100 (Octylphenoldecaäthylenglykoläther, neutral), N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (kationisch), Teepol 710 (Sec. Alkylsulfat, anionisch), Desoxycholat (anionisch), Digitoninlösung nach Kaplan (Morton 1955).

Die Homogenate wurden im Eisbad mit den verschiedenen Substanzen 30 Min. behandelt und anschließend die enzymatische Aktivität mit der des frischen Homogenats verglichen (Tabelle 6). Während kationische und neutrale Agentien die enzymatische Aktivität nicht hemmen, wirken das anionische Teepol und Desoxycholat sowie Digitonin als Inhibitoren. Nach dem Zentrifugieren (20 Min. bei 15 000xg) wurde die gesamte enzymatische Aktivität im Niederschlag gefunden (siehe Tabelle 6), wogegen im Überstand keinerlei nennenswerte Aktivität nachgewiesen werden konnte. Damit scheidet die Behandlung mit Detergentien als Methode zur Ablösung des Enzyms oder Enzymkomplexes von Zellpartikeln aus.

3.3. Ultraschallbehandlung

Nachdem das Enzym mit üblichen Detergentien nicht in Lösung zu überführen war, wurde dies mittels Ultraschallzerkleinerung versucht. Dazu wurde zunächst ein Nierenhomogenat nach Potter und Elvehjem (1955) in 0,25 M Saccharose her-

gestellt und dessen spezifische Aktivität im Standardansatz I bestimmt. Der Proteingehalt wurde nach der Biuret-Methode gemessen (Beisenherz et al. 1953). Anschließend wurde das Homogenat durch Ultraschall mit dem Sonifier (Branson Sonic Power) im Eis/NaCl-Bad 10 Min. (Stufe 1) zerkleinert; nach je 30 Sekunden wurde ebenso lange pausiert. Die enzymatische Aktivität des so erhaltenen Homogenats wurde ebenfalls im Standardansatz I getestet. Den Rest des mit Ultraschall behandelten Homogenats zentrifugierten wir 1 Std. in der Ultrazentrifuge (Spinco L50) bei ca. 100 000xg (R 40, 40 000 UpM). Sowohl der gewaschene Niederschlag als auch der Überstand wurden ebenfalls in Standardansatz I untersucht (Tab. 7). Es zeigte sich, daß die spezifische Aktivität im Niederschlag des ultraschallbehandelten Homogenats auf den fünffachen Wert des einfachen Homogenats nach Potter und Elvehjem angestiegen war. Im Überstand konnte keine Aktivität nachgewiesen werden, was bedeutet, daß lediglich enzymatisch inaktive Proteine von den Zellstrukturen abgelöst wurden. Interessant ist, daß das Gesamthomogenat nach der Ultraschallbehandlung keinerlei enzymatische Aktivität aufweist, wofür sich zwei Erklärungsmöglichkeiten anbieten:

1. Es handelt sich um eine kompetitive Hemmung durch die in Lösung gebrachten Proteine, die mit dem an die Strukturreste gebundenen Enzym Komplexe bilden und dadurch die Bildung von Enzym-Substrat-Komplexen mit der ÄDTA verhindern.
2. Die ÄDTA reagiert selbst mit den gelösten Substanzen und wird dadurch dem Zugriff des Enzyms entzogen.

Um entscheiden zu können, welche Art der Hemmung vorliegt, wären weitere Untersuchungen nötig, die für unsere Fragestellung jedoch nicht interessieren.

3.4. Enzymatische Ablösung des Enzyms von den Zellstrukturen

Beaufay und de Duve (1959) aktivierten lysosomale Hydrolasen mit saurem pH-Optimum durch Behandlung der Mitochondrienfraktion aus Rattenleber mit Enzympräparaten. Es wird von den Autoren angenommen, daß dadurch Veränderungen an den Membranen der Lysosomen hervorgerufen werden, die entweder den Eintritt der Substrate erleichtern oder das Austreten der Hydrolasen aus den Lysosomen ermöglichen. In Anlehnung an diese Experimente versuchten wir, in einem aus einem Nierenhomogenat in Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,5, Saccharose 0,25 M) nach Zentrifugation bei 15 000xg (20 Min.) erhaltenen Niederschlag eine Enzymaktivierung durch Behandlung mit Enzympräparaten zu erreichen. Der Niederschlag wurde in obigem Puffer suspendiert, mit CaCl_2 versetzt (4 mM) und je 8 ml 30 Min. bei 30 °C mit folgenden Enzympräparaten inkubiert:

5 und 10 mg Pankreatin	18 000 E/g Lipase	(Merck, Darmstadt)
5 " 10 mg Trypsin	80 000 E/g	(Merck, Darmstadt)
2 mg Phospholipase D		(C.F. Boehringer, Mannheim)
0,2 ml Phospholipase A	(1 mg/ml in Glycerin)	(C.F. Boehringer, Mannheim)

Anschließend wurden die so behandelten suspendierten Niederschläge im Standardansatz I auf ihre enzymatische Aktivität geprüft und diese mit der der unbehandelten Niederschläge verglichen. Je 4 ml der inkubierten Suspensionen wurden 20 Min. bei 15 000xg zentrifugiert (Spinco L50) und sowohl der Niederschlag als auch der Überstand mit der Standardmethode untersucht. Bei den mit Pankreatin und Trypsin behandelten Proben konnte keine eindeutige Wirkung der zugesetzten Enzympräparate auf die enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Die beiden Phospholipasen lösten ebenfalls kein Enzym von den Zellbruchstücken ab, aber in den damit inkubierten Niederschlägen stieg die spezifische Aktivität

analog zu dem mit Ultraschall behandelten Homogenaten an (Tabelle 8). Daraus geht hervor, daß auch in diesem Fall nur am ÄDTA-Abbau unbeteiligte Proteine von den Zellstrukturen abgelöst werden und somit auch diese Methode für eine Ablösung des Enzyms erfolglos blieb.

4. Versuche zur Charakterisierung des Enzyms

4.1. pH-Abhängigkeit

Nachdem sämtliche Experimente, das die Chelatbildner metabolisierende Enzym bzw. Enzymsystem von Zellstrukturen abzulösen, fehlgeschlagen waren, versuchten wir, mittels einer detaillierteren Charakterisierung der Reaktion Aufschluß über die Identität des Enzyms zu erhalten. Zunächst wurde das pH-Optimum der Reaktion mit Nierenhomogenaten von zwei Ratten gleichen Gewichts bestimmt. Dazu wurde der Standardansatz I mit verschiedenen Puffern benutzt:

pH 3 - 4,5	Citratpuffer (Mc Ilvaine-Puffer)
pH 5,5 - 7,5	Sörensen-Puffer
pH 8,5	Pyrophosphat/HCl-Puffer

Die Blindwerte der Reaktion blieben über den gesamten pH-Bereich konstant. Es ergab sich für beide Homogenate ein übereinstimmendes pH-Optimum für die Veratmungsreaktion zwischen pH 5,5 und pH 6,0 (Abb. 7). Die Maxima der beiden Kurven unterscheiden sich infolge der biologischen Variabilität um einen Faktor von rund 1,6. Aus diesem Grunde dürfen immer nur die Ergebnisse innerhalb einer Versuchsreihe, die mit demselben Homogenat durchgeführt wurden, verglichen werden. Die Variabilität bei den Versuchen mit Nierenhomogenaten ist wesentlich größer als bei in vivo-Versuchen. Das deutet darauf hin, daß in vivo nicht die Niere allein den gesamten metabolischen Abbau bewirkt, wenn sie auch den wesentlichsten Beitrag dazu liefern dürfte. Dafür sprechen auch die Versuche von Havlíček et al. (1968) an Ratten mit abgebundenen Nierengefäßen. Die Tiere mit Nierenligatur

veratmeten zwar in den ersten vier Stunden wesentlich weniger ÄDTA als Kontrolltiere, die Veratmungsrates blieb aber über weitere vier Stunden konstant, wogegen sie bei den Kontrolltieren wegen der raschen Ausscheidung der Chelatbildner stark absank. Insgesamt wurden im Zeitraum von 0 - 8 Stunden von beiden Versuchsgruppen etwa 1 % ÄDTA veratmet. Das ist ein Hinweis dafür, daß eine "Ausweichreaktion" über andere Organe möglich ist.

4.2. Zeitabhängigkeit

Da die bei der in vitro-Reaktion entstehenden Metaboliten der ÄDTA nach Möglichkeit isoliert und charakterisiert werden sollten, wurde untersucht, welche Reaktionsdauer unter optimalen Bedingungen (Standardansatz II) eine maximale Ausbeute ergibt. Aus Abb. 8 ist ersichtlich, daß über einen Bereich von 4 Std. die veratmete Substratmenge mit der Inkubationsdauer zunimmt. Daraus ist zu folgern, daß die Veratmung der ÄDTA offenbar eine langsame Reaktion ist, was auch die geringe Veratmungsrates bei der relativ kurzen Verweilzeit in vivo erklären könnte. Eine Aussage über die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaues darf jedoch wegen der geringen Reinheit des Präparates nicht gemacht werden, und eine Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wäre nur mit einem reinen oder zumindest weitgehend angereicherten Enzympräparat sinnvoll.

4.3. Temperaturabhängigkeit

Die Thermostabilität ist ein wesentliches Charakteristikum für ein Enzym. Auch hier gilt, daß exakte Aussagen nur aus Experimenten mit reinen Präparaten gewonnen werden können und Untersuchungen an einem Homogenat müssen nicht die tatsächliche Temperaturempfindlichkeit wiedergeben, da es z.B. durchaus denkbar ist, daß gelöste Proteine oder die Bindung an Strukturen eine Denaturierung beschleunigen oder verhindern. In erster Näherung kann aber eine Untersuchung

der Enzymaktivität eines Homogenats in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur für eine Charakterisierung herangezogen werden. Daher wurden Standardansätze (II) bei verschiedenen Temperaturen je 30 Min. bebrütet und nach Zugabe des Substrats die enzymatische Aktivität bestimmt (Abb. 9). Ob eine strenge Linearität zwischen steigender Bebrütungstemperatur und Abnahme der enzymatischen Aktivität über das untersuchte Temperaturintervall besteht, ist - insbesondere wegen der großen Fehlerbreite des zweiten Punktes - nicht gesichert. Von alleinigem Interesse ist die Temperatur, bei der eine 100 %ige Inaktivierung eintritt. Aus Abb. 9 ist eindeutig zu entnehmen, daß bei einer 30-minütigen Bebrütung oberhalb 60 °C die Enzymaktivität völlig verschwindet. Demnach gehört das Enzym weder zu den besonders temperaturempfindlichen noch zu den besonders thermostabilen.

4.4. Veratmung unter Luft, N₂ und O₂

Da es sich bei dem ÄDTA-abbauenden Enzym um eine Oxidase handeln könnte, wurde die enzymatische Reaktion unter Luft, O₂ und N₂ untersucht (O₂ und N₂ hochrein). Es war zu erwarten, daß unter N₂ die Veratmung gehemmt, unter O₂ dagegen gesteigert würde. Die im Standardansatz I unter den verschiedenen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Setzt man den unter Luft gewonnenen Wert gleich 100 %, dann zeigt sich, daß zwar die für anaerobe Bedingungen erwartete Senkung des ÄDTA-Abbaues eintritt, aber unter O₂-Atmosphäre die Abbaurrate nicht eindeutig erhöht wird. Die genaue Abbaurrate unter N₂ ist wegen der Schwankungen der Leerrate, die sich natürlich besonders bei niedrigen ¹⁴C-Aktivitäten auswirken, nicht exakt bestimmbar (s. S. 46). Daß die enzymatische Aktivität unter O₂-Atmosphäre nicht größer als in Luft ist, darf nicht verwundern, wenn man bedenkt, daß auch die Cytochromoxidase bereits bei einem Partialdruck von 5 % O₂ in Stickstoff ihre maximale Aktivität erreicht (Yonetani 1963).

4.5. Wirkung von Enzymhemmern

Enzymatische Reaktionen können durch eine Vielzahl verschiedenster Substanzen gehemmt oder völlig unterbunden werden. Es handelt sich dabei teils um spezifisch wirkende Inhibitoren, wie z.B. um das Amytal (5-Äthyl-5-iso-amylbarbitursäure), das die NADH-Dehydrogenase hemmt, oder das Antimycin A, das die Reduktion des Cytochrom C blockiert (Karlson 1966), teils um weitgehend unspezifisch wirkende Agentien, wie KCN oder Quecksilberverbindungen. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, durch Anwendung spezifischer Inhibitoren die Beteiligung bestimmter Enzyme am Abbau der ÄDTA auszuschließen und die Anzahl der möglicherweise daran mitwirkenden Enzyme einzuengen.

Nach Havlíček et al. (1968) wurden bei der Veratmung der ÄDTA durch Ratten die Acetatgruppen am Stickstoff abgespalten, wogegen die Äthylengruppe offensichtlich intakt bleibt. Kiese und Uehleke (1961) hatten gezeigt, daß beim Säugetier die Mikrosomen der Ort der N-Oxydation des Anilins sind. Unter den Arbeiten über mikrosomale Oxydasen sind besonders die Untersuchungen von Machinist et al. (1968) über die Verteilung der Dialkylarylaminoxid-Dealkylase und die Dialkylarylaminoxidase bei verschiedenen Tieren interessant. Die Autoren fanden u.a., daß Mikrosomen aus Waschbärleber Chlorpromazin dealkylieren können. Chlorpromazin besitzt einen Dimethylaminopropanrest, der, wie Ross et al. (1958) an der ^{14}C -markierten Verbindung zeigten, oxydativ demethyliert wird. Ratten, denen man oral Chlorpromazin (an der Methylgruppe markiert) verabreichte, atmeten 16,7 % des ^{14}C innerhalb 6 Std. als $^{14}\text{CO}_2$ aus. Auch das Psychopharmakon Tofranil ^(B) besitzt die Dimethylaminopropan-Gruppierung und wird, wie Herrmann und Pulver (1960) zeigten, demethyliert. Neben anderen Metaboliten konnte papierchromatographisch im Urin ein Produkt identifiziert werden, bei dem eine Methylgruppe durch Wasserstoff ersetzt ist. Diese Befunde könnten befriedigend mit einer Oxydation der tertiären Amine durch mikrosomale Oxydasen erklärt werden. Auch die

ÄDTA besitzt als Strukturelement dreifach substituierte N-Atome. Sie kann als freie Säure natürlich nicht mit tertiären Aminen verglichen werden; es muß aber darauf hingewiesen werden, daß sie von uns immer als Metallchelate verwendet wurde. In dieser Form ist nicht nur die sterische Anordnung auf jeden Fall anders als beim freien Säureanion, sondern die Carboxylfunktionen sind auch teilweise abgesättigt, so daß sie nicht mehr mit denen der freien Säure vergleichbar sind. Damit konnte nicht von vornherein mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß u.U. Enzymsysteme, die tertiäre Amine angreifen, auch auf die ÄDTA einwirken. Die mikrosomalen Oxidasen kommen nach den Ergebnissen der Differentialzentrifugation dafür allerdings nicht in Betracht.

Ein anderes Enzym, das tertiäre Amine abbauen kann, ist die Monoaminoxidase (Blaschko 1963). Ihre Beteiligung am Metabolismus der ÄDTA würde, vom therapeutischen Standpunkt betrachtet, eventuelle Konsequenzen haben. Falls nämlich die ÄDTA von der MAO zu nephrotoxischen Aminoverbindungen abgebaut wird, könnte man bei der Chelat-Behandlung von Metallvergiftungen durch gleichzeitige Verabreichung gewisser Thymoleptika (z.B. Nardil^(R)), deren Wirkung auf einer MAO-Hemmung beruht (Auterhoff 1965), den therapeutischen Index der Chelate verbessern. Neben der MAO schien es auch sinnvoll, eine Beteiligung der Atmungskette beim Metabolismus der ÄDTA in Betracht zu ziehen. Zur Klärung dieser Fragen dienten die von uns durchgeführten Hemmversuche. Zunächst wurde der Einfluß verschiedener Inhibitoren auf Nierenhomogenate im Standardansatz I geprüft. War eine Hemmung eindeutig nachweisbar, führten wir eine genauere Untersuchung im Standardansatz II bei Substratsättigung durch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Wäre die MAO für den Abbau der ÄDTA verantwortlich, müßten Substanzen wie Methylenblau und das Hydrazinderivat

β -Phenyläthylhydrazin-hydrogensulfat hemmend wirken, wogegen Carbonylreagentien, wie Hydroxylamin, Semicarbazid und Aminoguanidin, ohne Einfluß sein sollten. Ferner ist für die MAO charakteristisch, daß sie nicht von Cyanid vergiftet wird. Es zeigte sich, daß außer dem Cyanid alle oben genannten Substanzen keine Inhibitorwirkung ausüben. Damit ist eine Beteiligung der MAO und von gegen Carbonylreagentien empfindlichen Enzyme am Abbau der ÄDTA auszuschließen. Enzyme der Atmungskette, außer der Cytochromoxidase, kommen als Katalysatoren des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes ebenfalls nicht in Frage, wie die Unempfindlichkeit der in vitro-Veratmung gegen Amobarbital und Antimycin A zeigt. Alloxan, p-Chinon und Naphthochinon, die wegen der Vielzahl ihrer Reaktionsmöglichkeiten weitgehend unspezifische Inhibitoren sind (Webb 1966), verhalten sich unterschiedlich: Alloxan ist ohne Wirkung auf die in vitro-Veratmung der ÄDTA, wogegen die Chinone starke Hemmer sind. Chinone reagieren u.a. bevorzugt mit SH-Gruppen, und da auch Quecksilber (ein typisches SH-Reagenz) offensichtlich eine Hemmwirkung ausübt, kann angenommen werden, daß SH-Gruppen entweder am aktiven Zentrum des Enzyms beteiligt sind oder zumindest in seiner unmittelbaren Nachbarschaft stehen.

Anionen, die eine starke Affinität zu Schwermetallen aufweisen, wie CN^- , S^{2-} und N_3^- , hemmen die enzymatische Veratmung der ÄDTA ebenfalls, woraus man auf die Beteiligung eines Schwermetalls an der Reaktion schließen kann.

Da RBS 25, ein Detergenz mit stark komplexierenden Eigenschaften, zur Reinigung der meisten Laborgeräte benutzt wurde, lag es nahe, auch dessen Wirkung auf den ÄDTA-Abbau zu untersuchen. Es erwies sich als deutlicher Hemmer, während 8-Oxychinolin, das auch als Komplexbildner Verwendung findet, ohne Einfluß blieb. Zur Verhinderung des Bakterienwachstums im biologischen Material wird oft Chloroform zugesetzt.

Daher wurde auch dessen Einfluß auf die enzymatische Reaktion getestet. Aus Tabelle 10 ist zu entnehmen, daß auch Chloroform eine beträchtliche Hemmwirkung ausübt.

Ultraschallbehandelte Nierenhomogenate verlieren ihre Fähigkeit, ÄDTA zu veratmen, was mit der Einwirkung abgelöster Proteine auf die ÄDTA erklärt wurde. Anghileri (1968) fand, daß ÄDTA mit Albumin Komplexe bilden kann. Daher **untersuchten** wir den Einfluß von Rattenserum auf die in vitro-Veratmung. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung, was mit einer Reaktion der ÄDTA mit den Serumproteinen oder mit einer kompetitiven Hemmung erklärt werden kann.

Aus den Untersuchungen mit verschiedenen Inhibitoren ergab sich kein eindeutiger Hinweis auf die Beteiligung eines bestimmten Enzyms. Die Substanzen, die als Hemmer wirksam sind, besitzen eine zu geringe Spezifität, und außerdem ist in einem so heterogenen System, wie es ein Organhomogenat darstellt, wegen der möglichen Wechselwirkung der verschiedenen Komponenten eine exakte Identifizierung eines Enzyms durch Hemmversuche nicht zu erwarten.

4.6. Wirksamkeit der Cytochromoxidase

Aus den bisherigen Versuchen ergaben sich zwar keine klaren Hinweise auf die Mitwirkung eines bestimmten Enzyms am Metabolismus der ÄDTA, aber einige Anhaltspunkte für eine Beteiligung der Cytochromoxidase: Nach Yonetani (1963) besitzt die Cytochromoxidase ein pH-Optimum von 5,8, was gut mit dem pH-Bereich (5,5 - 6,0) übereinstimmt, in dem die ÄDTA in vitro maximal veratmet wird. Als Inhibitoren werden Cyanid und Azid angegeben, wogegen ÄDTA und 8-Oxychinolin ohne Hemmwirkung sind. Allerdings müßten auch Aldehydreagentien, wie Hydroxylamin und Hydrazinderivate, als Hemmer fungieren, was jedenfalls bei Untersuchungen mit Nierenhomogenat für den ÄDTA-Abbau nicht der

Fall ist. Wie bereits öfter bemerkt, müssen jedoch Homogenate nicht dieselben Eigenschaften wie gereinigte Enzyme haben. Interessant ist ferner, daß anionische Detergentien die Cytochromoxidase inhibieren, neutrale und kationische dagegen aktivieren. Ersteres gilt für den ÄDTA-Abbau, letzteres konnte allerdings dafür nicht gefunden werden. Nach Bergmeyer (1962) lassen sich Gewebeschnitte, in denen Cytochromoxidase nachgewiesen werden soll, nicht lyophilisieren, da dabei das Enzym seine Aktivität verliert. Ferner kann die Cytochromoxidase in Gewebeschnitten durch 30-minütiges Erwärmen auf 60° inaktiviert werden. Die genannten Übereinstimmungen schienen eingehendere Untersuchung über den Einfluß der Cytochromoxidase auf den in vitro-Abbau der ÄDTA zu rechtfertigen.

Green und Ziegler (1963) beschrieben eine Methode zur Gewinnung der Cytochromoxidase aus Rinderherzmitochondrien. Falls die Cytochromoxidase das ÄDTA abbauende Enzym ist, sollte auch ein aus Rinderherz gewonnenes Enzympräparat fähig sein, ÄDTA in vitro zu veratmen. Nach obiger Vorschrift wurde daher aus einem frischen Rinderherz ein Enzympräparat dargestellt und sowohl die Cytochromoxidaseaktivität (nach Wharton 1963) als auch die ÄDTA-Veratmungsfähigkeit in einem modifizierten Standardansatz (5 ml Sörensen-Puffer pH 5,9; 0,1 ml Substrat (12 µCi/ml, 400 µmol/ml); 0,2 ml suspendierter Niederschlag (in 0,25 M Saccharose) bzw. Enzymlösung) getestet. Im Niederschlag, der nach der Behandlung der ultraschallzerkleinerten Mitochondrien mit Kaliumcholat erhalten wurde, wurde ebenfalls die Cytochromoxidaseaktivität und die Aktivität gegen ÄDTA geprüft. Aus Tabelle 11 ist zu ersehen, daß die angereicherte Cytochromoxidase gegenüber ÄDTA völlig inaktiv ist, der weitgehend von Cytochromoxidase befreite Niederschlag dagegen einen deutlichen ÄDTA-Abbau bewirkt. Ferner wurde der suspendierte Niederschlag auf seine Fähigkeit, ÄDTA in Gegenwart von KCN und nach Hitzebehandlung zu veratmen,

untersucht. Eine Cyanidkonzentration von 10^{-3} M reicht ebenso wie 15-minütiges Erwärmen auf 90°C aus, die Veratmungsfähigkeit gegen ÄDTA zu unterbinden (Tabelle 12). Diese Ergebnisse mit einem Enzympräparat aus Rinderherz stimmen sehr gut mit denen überein, die mit homogenisierten Rattennieren erhalten wurden. Damit dürfte der Schluß erlaubt sein, daß in beiden Fällen das gleiche Enzym den ÄDTA-Abbau bewirkt, die Cytochromoxidase jedoch nicht das oxydierende Enzym ist.

4.7. Untersuchung verschiedener Organe und Körperflüssigkeiten

Aronson und Ahrens (1968) sowie Weber (1969) fanden, daß $\text{Na}_2\text{C}_2\text{ÄDTA}$ und Na_3CaDTPA nicht nur die Nieren, sondern auch die Darmschleimhaut schädigen. Daraufhin wurde, außer in Niere und Leber, die enzymatische Aktivität für den ÄDTA-Abbau auch im Dünndarm untersucht. Nach Beatmung von Homogenaten aus Nieren, Leber und Darm sowie Darmstücken im Standardansatz I zeigte sich, daß die spezifische Aktivität von Nierenhomogenaten 2,1 mal größer als die von Leberhomogenaten und 3,6 mal größer als die des Dünndarms ist, wobei die spezifische Aktivität des Darmstückes auf mg Frischgewicht bezogen wurde. Aus diesen Daten ist lediglich zu entnehmen, daß die Niere das Organ mit der größten spezifischen metabolisierenden Wirkung auf die ÄDTA ist und daß Leber und Darm etwa die gleiche enzymatische Aktivität besitzen. Rattenserum ist, wie bereits gezeigt wurde, nicht in der Lage, ÄDTA in vitro zu veratmen. Auch Vollblut, das - ebenso wie der enzymhaltige Urin von Ratten - im Standardansatz I getestet wurde (je 0,5 ml) erwies sich als völlig inaktiv.

4.8. Vergleich zwischen NaCa-ÄDTA und NaFe-ÄDTA

Havlíček et al. hatten unabhängig von der Dosis und der Art des chelierten Metallions in vivo eine Veratmung der ÄDTA von ca. 1,2 % gefunden. Die Stabilität der Metallchelate ist offensichtlich ohne Einfluß auf die Metabolisierung, da anderenfalls hätte erwartet werden müssen, daß die im Vergleich zu CaÄDTA rund 10^7 mal stabilere Y(III)-ÄDTA weniger abgebaut wird. In Analogie zu diesen Versuchen kann angenommen werden, daß auch in vitro keine Abhängigkeit der Veratmungsrate von dem chelierten Metallion vorliegt. Der Vergleich des Abbaus von $\text{Na}_2\text{CaÄDTA}$ und NaFe(III)ÄDTA , ein Chelat, dessen Stabilitätskonstante mit 10^{24} sehr hoch ist, im Standardansatz I bestätigte diese Voraussage (Tabelle 13). In vitro konnte das Fe-Chelat verwendet werden, da hier die für den Gesamtorganismus hohe Toxizität dieser Verbindung, der wahrscheinlich ein von Nofre et al. (1962) postulierter Reaktionsmechanismus zugrunde liegt, unberücksichtigt bleiben kann.

5. Zwischendiskussion

Die bisherigen Versuche zeigten zwar, daß es sich bei dem in vitro gefundenen Effekt um eine enzymatische Einwirkung auf das radioaktive Substrat handelt, eine Identifizierung des Enzyms war jedoch nicht möglich.

Die gefundene Veratmung ist unerwartet niedrig; unerwartet im Hinblick auf die Tatsache, daß bei dem Ansatz in vitro das Enzym während der gesamten Versuchsdauer mit Substrat gesättigt ist, was in vivo wegen der großen Ausscheidungsgeschwindigkeit des Chelats nicht zutrifft. Außerdem dürfte die ÄDTA-Konzentration am Reaktionsort in einem Homogenat größer sein als im lebenden Organismus, da in diesem Fall die mehrfach negativ geladenen Ca-Chelate erst die Zellmembran durchdringen müssen, um in Kontakt mit dem abbauenden Enzym zu kommen; dies erfolgt jedoch nach Bohne et al.

(1968), Foreman et al. (1953) sowie Volf et al. (1970) in nur sehr geringem Maße. Im Widerspruch zu den obigen Überlegungen steht, daß nach Ultraschallbehandlung die Homogenate ihre enzymatische Aktivität gegen ÄDTA verlieren und daß Serum als Hemmer für den ÄDTA-Abbau wirkt. Als mögliche Erklärung für diese Befunde kann man eine kompetitive Hemmung durch die von Membranen abgelöste Proteine bzw. Serumproteine oder einen Schutz der ÄDTA durch Komplexbildung mit gelösten Proteinen annehmen. Diese Überlegungen zeigen, daß im vorliegenden Fall in einem in vitro-System a priori nicht unbedingt eine größere Abbaurate als in vivo erwartet werden darf.

Alle Anreicherungsversuche waren von einer starken Verminderung der Gesamtaktivität begleitet, was zunächst auf eine große Empfindlichkeit des abbauenden Enzyms zurückgeführt wurde. Die Abtrennung des Enzyms von Zellbruchstücken gelang ebenfalls nicht. Eine Beteiligung der MAO und der Cytochromoxidase konnte durch Hemmversuche und Untersuchungen mit angereicherter Cytochromoxidase ausgeschlossen werden. Nur unspezifische Inhibitoren mit breitem Wirkungsspektrum beeinflussten die enzymatische Veratmung.

Zur Erklärung dieser Befunde bieten sich zwei Alternativen an:

1. Zum enzymatischen Abbau der ÄDTA sind mehrere, an Zellbruchstücken lokalisierte Enzyme nötig. Beim Ablösen oder Hemmen eines Teils dieser Enzyme wird der ganze Enzymkomplex unwirksam.
2. Bei dem tatsächlich abgebauten Substrat handelt es sich nicht um ÄDTA, sondern um eine Vielzahl von Verunreinigungen, die von verschiedenen Enzymen metabolisiert werden.

Nachstehende Überlegungen setzen sich mit Annahme 1) auseinander:

Werden einige Enzyme gelöst, ist deren Aktivität wegen der hohen Blindwerte nicht eindeutig nachweisbar. Nur wenn alle, oder der größte Teil der Enzyme, die an Zellstrukturen gebunden sind, wirksam werden, ist eine eindeutige enzymatische Aktivität nachweisbar. Mit dieser Vorstellung ließen sich sowohl die negativen Anreicherungsversuche als auch die Wirkung der Inhibitoren erklären. In diesem Fall bewirken nur diejenigen Inhibitoren eine deutliche Hemmung, die eine Vielzahl von Enzymen gleichzeitig beeinflussen. Die spezifische Blockierung nur eines Enzyms würde sich demnach experimentell nicht sichern lassen, da schon die stark schwankenden Blindwerte durchschnittlich 10 - 20 % des gefundenen Veratmungseffekts ausmachen (s. S. 46). Diese hohen Leerwerte waren insofern unerwartet, als die ÄDTA als stabile Substanz gilt und nach Perrin (1964) nur durch starke Säuren oder Oxydationsmittel zerstört werden kann.

Falls tatsächlich die ÄDTA abgebaut würde, könnte man zunächst erwarten, daß, entsprechend ihrer unterschiedlichen Markierung, die ÄDTA-1-¹⁴C und die ÄDTA-2-¹⁴C mit verschiedenen Geschwindigkeiten in vitro oxydiert werden. Als erster Abbauschritt wäre eine Decarboxylierung möglich, gefolgt von einer oxydativen Abspaltung des benachbarten C-Atoms, wobei die Frage, ob eine solche Reaktionsfolge durch einen plausiblen Mechanismus erklärt werden kann, nicht diskutiert werden soll. Havlíček et al. fanden in vivo keine Abhängigkeit der ÄDTA-Metabolisierung von der Markierungsposition, was nur mit der Annahme erklärt werden könnte, daß in obiger Reaktion der zweite Schritt wesentlich schneller als der erste abläuft.

Sollten jedoch die gefundenen Veratmungseffekte durch radioaktive Verunreinigungen hervorgerufen werden, wäre zu erwarten, daß die unterschiedlich sauberen Präparate (ÄDTA-1-¹⁴C zu 99 %, ÄDTA-2-¹⁴C zu 98 - 96 % radiochemisch rein, siehe Methodik) auch verschieden große Effekte ergeben, und zwar ist zu erwarten, daß die Veratmung der ÄDTA-2-¹⁴C etwa um den Faktor 2 - 4 die der ÄDTA-1-¹⁴C übersteigt. Diese Vermutung wurde bei drei verschiedenen pH-Werten im Standardansatz I überprüft, und es zeigte sich, daß ÄDTA-2-¹⁴C tatsächlich einen etwa 4-mal größeren Veratmungseffekt als die ÄDTA-1-¹⁴C ergibt (Tabelle 14).

Damit kann als sehr wahrscheinlich angenommen werden, daß die bisherigen Veratmungsergebnisse nicht auf einem Abbau der ÄDTA, sondern auf der Oxydation unbekannter Verunreinigungen beruhen. Da von Havlíček et al. für beide ÄDTA-Präparate die gleiche Abbaurate gefunden wurde, aber keine exakten Daten über die Reinheit der verwendeten Chargen vorliegen, kann obige Aussage nicht ohne weiteres auf die Versuche in vivo übertragen werden.

Wahrscheinlicher dagegen ist eine Degradation von radioaktiven Verunreinigungen, die zwar in geringfügiger Konzentration vorliegen, aber dank der empfindlichen Meßmethode erfaßt werden.

Nachdem mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit anzunehmen war, daß in vitro eine Veratmung der ÄDTA durch radioaktive Verunreinigungen vorgetäuscht wird, stellt sich die Frage, um welche Substanzen es sich dabei handelt. Eine exakte Analyse war wegen der geringen Substanzmenge nicht möglich. Es ist mit Autoradiolyseprodukten und/oder mit Verunreinigungen durch die Synthese zu rechnen. Bei der Autoradiolyse würde eine Vielzahl von unterschiedlichen Molekülbruchstücken entstehen, über deren Art eine Aussage a priori schwer zu treffen ist. Untersuchungen darüber existieren nicht. Venezky und Moniz (1969) untersuch-

ten das Verhalten von $H_4\text{ÄDTA}$, $Na_2H_2\text{ÄDTA}$ und $Li_4\text{ÄDTA}$ in entgasten wässrigen Lösungen bei 200°C und stellten mittels NMR-Spektroskopie fest, daß unter diesen Bedingungen eine stufenweise Abspaltung von $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ Gruppen erfolgt, die zur Bildung von $^-\text{OOCCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ und $(\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COO}^-)_2$ führt. Andere Produkte wurden von den Autoren noch nicht identifiziert. Es kann angenommen werden, daß diese Substanzen prinzipiell auch bei der Autoradiolyse entstehen, was aber nicht heißen soll, daß dies die einzige Möglichkeit darstellt.

Vom Hersteller der $\text{ÄDTA}-2-^{14}\text{C}$ wird als Syntheseweg die Kondensation von Äthylendiamin mit Bromacetat in Gegenwart von Na_2CO_3 angegeben. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer Verunreinigung des Präparats mit radioaktiver Bromessigsäure. Es wurde deshalb das Verhalten der Bromessigsäure unter Standardbedingungen in verschiedenen Ansätzen geprüft. Bei den Versuchen wurde pro Ansatz $0,48 \mu\text{Ci}$ Na -Bromacetat- ^{14}C (spez. Akt. ca. 46 mCi/mmol), entsprechend dem 10-fachen Wert der maximal erwarteten Verunreinigung verwendet. Zunächst wurden Leerwerte unter Standardbedingungen sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von inaktiver ÄDTA mit Br -acetat (Br -ac-1- ^{14}C und Br -ac-2- ^{14}C) bestimmt. Erwartungsgemäß ergab die carboxylmarkierte Bromessigsäure einen höheren Leerwert als die in 2-Stellung markierte Verbindung (Tabelle 15). Bei den anschließenden Versuchen mit Nierenhomogenat unter Standardbedingungen mit und ohne Zusatz von inaktiver ÄDTA ergab sich nach Subtraktion der entsprechenden Leerwerte ein im Vergleich zu den Blindwerten schwacher Veratmungseffekt (Tabelle 16). Daraus geht hervor, daß nur ein minimaler Teil des in vitro gefundenen Effekts durch den Abbau einer Verunreinigung mit radioaktiver Bromessigsäure erklärt werden kann.

6. Versuche mit gereinigten Chelatbildnern

6.1. Vorversuch und in vitro-Veratmung

Nachdem feststand, daß in vitro nicht ÄDTA, sondern radioaktive Verunreinigungen unbekannter Art abgebaut werden, mußte überprüft werden, ob der von Havlíček et al. gefundene Effekt in vivo wirklich auf einer Metabolisierung der ÄDTA beruht. Die Versuche von Havlíček et al. waren also zu wiederholen und darüberhinaus ein Verfahren zu finden, mit dem der größere Teil der Verunreinigungen von der ÄDTA abgetrennt werden kann. Am geeignetsten (im Hinblick auf die Verwendung beim Tier) wäre eine Reinigungsmethode, bei der die ÄDTA zuletzt in wässriger Phase ohne Fremdionenzusatz vorliegt. Dieser Voraussetzung entspricht die Gelfiltration über Sephadex, die in einem Schritt zu einer zumindest partiellen Reinigung führt. Eine vollständige Abtrennung aller Verunreinigungen konnte nicht erwartet werden, da zumindest ein Teil der Autoradiolyseprodukte der ÄDTA beliebig ähnlich sein dürfte. Ferner beruht die Gelchromatographie keineswegs auf einer reinen Molekülsiebung, wie ursprünglich angenommen wurde. So konnten Gorbach und Henke (1968) bei der Auftrennung verschiedener Purinbasen mittels Sephadex besonders deutlich zeigen, daß dem Siebeffekt sicher auch noch Wechselwirkungen der Moleküle mit der Gelmatrix überlagert sind. Diese Wechselwirkungen können eine Auftrennung nahezu gleich großer Moleküle hervorrufen, müßten aber auch prinzipiell in der Lage sein, die entgegengesetzte Wirkung hervorzurufen. Ferner sei darauf hingewiesen, daß die unterschiedlich großen, aber chemisch sehr ähnlichen Substanzen ÄDTA und DTPA an der gleichen Stelle im Elutionsdiagramm erscheinen (siehe Abb. 11 - 15).

Um die Leistungsfähigkeit der Gelfiltration zu testen, wurde eine kurze Säule mit in Wasser gequollenem Sephadex G 10 gefüllt (Betthöhe 44 cm, Durchmesser 1 cm), 1 ml Na_2Ca ÄDTA-2- ^{14}C (400 $\mu\text{mol/ml}$, 12 $\mu\text{Ci/ml}$) aufgegeben und

mit Wasser eluiert. Die Aktivität erschien im Elutionsdiagramm in einem einzigen Peak, der allerdings eine kleine Schleppe aufweist (Abb. 10). Mit der dem Peakmaximum entsprechenden Fraktion (im folgenden als "gereinigt" bezeichnet) wurde ein Veratmungsversuch in vitro in einem modifizierten Standardansatz unternommen*. Als Vergleich diente ein analoger Ansatz mit ungereinigter $\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$. Die Veratmung betrug bei der ungereinigten $\text{ÄDTA-}^{14}\text{C}$ $2,75 \cdot 10^{-2}$ % der Dosis, bei der "gereinigten" dagegen nur $0,225 \cdot 10^{-2}$ % der Dosis. Damit war der direkte Beweis erbracht, daß in vitro zumindest der größte Teil des Veratmungseffektes nicht auf dem Abbau der ÄDTA beruht.

6.2. In vivo-Versuche mit Chelaten unterschiedlichen Reinheitsgrades

Nachdem also prinzipiell die Möglichkeit besteht, die ÄDTA durch Gelfiltration über Sephadex G 10 zu reinigen, wurden verschiedene Präparate der ÄDTA und DTPA säulenchromatographisch aufgearbeitet. In Wasser gequollenes Sephadex G 10 wurde in eine Säule gefüllt (Betthöhe 143 cm, Durchmesser 1,4 cm) und die Na-Salze der Substanzen in 1 ml Wasser gelöst aufgegeben (je $100 \mu\text{Ci/ml}$, bei $\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ $80 \mu\text{Ci}/0,8 \text{ ml}$). Es wurde mit Wasser eluiert, das Eluat in Fraktionen zu 40 Tropfen (1,8 ml) aufgefangen und die Aktivität der einzelnen Fraktionen im Flüssigszintillationszähler gemessen. Es ergaben sich zwei grundsätzlich verschiedene Arten von Elutionsdiagrammen: Entweder erscheint die Aktivität in einem Peak (I), dem mindestens ein weiterer, deutlich kleinerer (II) folgt, oder die gesamte Aktivität wird in einem einzigen stark verbreiterten Peak gefunden

* 9 ml Sörensen pH 5,9	Kontrolle analog
0,1 ml Na_2Ca ÄDTA ($400 \mu\text{mol/ml}$)	aber: 0,1 ml Na_2Ca $\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$
1 ml Nierenhomogenat	($400 \mu\text{mol/ml}$, $12 \mu\text{Ci/ml}$) ungereinigt
0,36 ml Fraktion 13 (Abb. 8) entsprechend $1,2 \mu\text{Ci}$ ^{14}C	0,36 ml H_2O

(Abb. 11 - 15). Das letztere betrifft die äthylenmarkierte ÄDTA und die von Schweer synthetisierte DTPA-1-¹⁴C. Diese beiden Verbindungen werden übrigens auch in vivo ohne vorherige Reinigung zu einem deutlich niedrigeren Prozentsatz veratmet, woraus man schließen kann, daß sie weniger mit niedermolekularen Autoradiolyseprodukten, die offensichtlich leicht metabolisiert werden, verunreinigt sind.

Um zu beweisen, daß es sich bei der von Havlíček et al. gefundenen Veratmung der Chelatbildner um einen methodischen Artefakt handelt, mußte gezeigt werden, daß gereinigte Chelatbildner im Gegensatz zu ungereinigten überhaupt nicht oder zumindest wesentlich schwächer metabolisiert werden. Ferner mußte eine starke Veratmung der abgetrennten Verunreinigungen nachgewiesen werden, wobei die Frage, um welche Substanzen es sich dabei handelt, in diesem Zusammenhang unwesentlich ist. Es wurden daher die Injektionslösungen sowohl aus ungereinigten Chelatbildnern als auch aus den Fraktionen, die den beiden ersten Peakmaxima I und II entsprachen, hergestellt. Die Konzentration betrug jeweils 200 µmol/ml und die Radioaktivität je 4 µCi/ml, wogegen die abgetrennten Verunreinigungen bei gleicher Trägerdosis eine wesentlich geringere Aktivität besaßen (siehe Methodik).

Als Versuchstiere dienten weibliche Ratten des Heiligenberg-Inzuchtstammes mit einem Körpergewicht von 170 - 195 g. Die Verabfolgung der Chelate erfolgte unter Äthernarkose intraperitoneal (0,5 ml). Anschließend wurden die Tiere sofort in die bei Havlíček et al. beschriebene Apparatur (Abb. 16) gebracht und die exspirierte ¹⁴CO₂-Menge nach 4, 8 und 24 Stunden bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefaßt. Folgendes ist daraus ersichtlich:

1. Der Veratmungseffekt ist für ÄDTA-2-¹⁴C, entsprechend der vom Hersteller angegebenen größeren Verunreinigung, um einen Faktor von 2 - 3 größer als bei der ÄDTA-1-¹⁴C.
2. Nach Reinigung der Chelatbildner sinkt die ¹⁴C-Aktivität in der Expirationsluft deutlich ab, und zwar bei ÄDTA-1-¹⁴C, ÄDTA-2-¹⁴C sowie DTPA-1-¹⁴C (Geigy) auf etwa den gleichen Wert.
3. Die abgetrennten Verunreinigungen werden zu einem wesentlich höheren Prozentsatz als die nicht gereinigten Ausgangspräparate metabolisiert.
4. Die bereits im Elutionsdiagramm homogener erscheinenden Chelatbildner (äthylenmarkierte ÄDTA und DTPA nach Schweer) ergeben einen geringeren Veratmungseffekt.

Diese Ergebnisse widerlegen somit eindeutig die von Havlíček et al. aufgestellte Hypothese über die Metabolisierung der Chelatbildner vom Typ der Polyaminopolycarboxylsäuren. Ob diese Substanzen möglicherweise doch zu einem minimalen Prozentsatz abgebaut werden, kann natürlich nicht eindeutig entschieden werden, jedenfalls wäre dieser Abbau so geringfügig, daß er nicht zur Erklärung der toxischen Wirkung der Chelatbildner herangezogen werden kann.

6.3. Elektrophoretische Untersuchung

Havlíček et al. hatten bei ihrer Untersuchung der ÄDTA-1-¹⁴C und der DTPA-1-¹⁴C (Geigy) weder bei der Papierchromatographie noch mittels Hochspannungselektrophorese nennenswerte Verunreinigungen, die den Veratmungseffekt erklären könnten, gefunden. Zum Nachweis der in vorliegender Arbeit gefundenen geringfügigen Verunreinigungen muß ihre Methode jedoch als nicht genügend genau angesehen werden. Daher wurden die beiden Injektionslösungen mit ungereinigter und gereinigter ÄDTA-2-¹⁴C sowie die deren Verunreinigung

enthaltende dritte Lösung auf einer Cellulosedünnschicht, die meist bessere Auftrennungen gewährleistet, hochspannungselektrophoretisch untersucht. Die ÄDTA-2-¹⁴C wurde gewählt, da sie die Substanz mit der stärksten Verunreinigung ist. Es wurden je 6 µl der Injektionslösungen aufgetragen. Als Puffer diente ein Veronalpuffer (pH 8,6), die Laufzeit betrug 20 Min. bei einer Feldstärke von 90 V/cm. Die Aktivität wurde durch Autoradiographie lokalisiert und die ÄDTA mit dem Sprühreagenz nach Sýkora und Eybl (1966) nachgewiesen (Abb. 17). Bei der ungereinigten und der gereinigten ÄDTA ist der Hauptteil der Radioaktivität identisch mit dem färbbaren Chelat. Beide Flecke besitzen eine radioaktive Schleppe, die keine Farbreaktion mit dem Sprühreagenz gibt und bei der gereinigten Verbindung deutlich kürzer ist. Die Injektionslösung mit der aktiven Verunreinigung ist in 2 Flecke, einen großen inaktiven und färbbaren sowie einen kleinen kreisförmigen und aktiven, der keine Farbreaktion gibt, auftrennbar. Aus der runden Form des von der Verunreinigung hervorgerufenen Flecks läßt sich auf eine weitgehende Homogenität der Substanz schließen, wogegen die lange Schleppe - analog dem Elutionsdiagramm - für eine Vielzahl von Substanzen spricht. Die Größe der färbbaren Flecke ist auf die hohe Trägerkonzentration (200 µmol/ml), der gegenüber die Menge der radioaktiven Verunreinigung vernachlässigbar ist, zurückzuführen. Die Trennung ist nicht sehr deutlich, wegen der voneinander unabhängigen Nachweismethoden für Radioaktivität und ÄDTA jedoch ausreichend. Mit dieser Untersuchung wurden die Ergebnisse der Gelchromatographie bestätigt.

7. Diskussion

Die Arbeiten von Foreman et al. (1953 und 1960) schienen zu beweisen, daß ÄDTA und DTPA nicht in nennenswerter Menge in vivo abgebaut werden. Aus papierchromatographischen Untersuchungen wurde geschlossen, daß die im Urin ausgeschiedene ¹⁴C-Aktivität allein auf intakte markierte Che-

latbildner zurückzuführen sei. Daß dieser Schluß aus papierchromatographischen Untersuchungen allein und nur in einem Laufmittelsystem nicht zulässig ist, wurde neben anderen Einwänden bereits in der Einleitung aufgezeigt. Die Papierchromatographie von Lösungen mit ungereinigter und gereinigter ÄDTA-2- ^{14}C und deren abgetrennter Verunreinigung zeigt, daß die ÄDTA in dem von Foreman verwendeten Laufmittelsystem nicht von ihren Verunreinigungen abgetrennt werden kann (Abb. 1). Die gleichen Lösungen zeigen bei der Hochspannungselektrophorese auf einer Dünnschichtplatte (Cellulose) deutlich eine radioaktive Substanz, die nicht mit der ÄDTA identisch ist (Abb. 17). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beweis dafür, daß die mit nur einer Untersuchungsmethode festgestellte Einheitlichkeit einer Substanz kein ausreichendes Reinheitskriterium darstellt. Die Behauptung von Foreman et al., die Chelatbildner ÄDTA und DTPA würden nicht metabolisiert, erhielt jedoch eine Stützung durch die Tatsache, daß nur etwa 0,1 % der applizierten ^{14}C -Dosis in der Expirationsluft der Versuchstiere als $^{14}\text{CO}_2$ nachgewiesen werden konnte. Foreman hatte allerdings nur die in C-2-Position markierten Verbindungen und nur bei einer Dosis untersucht. Daraus konnte nicht mit Sicherheit geschlossen werden, daß sich die Chelatbildner völlig inert im Organismus verhalten.

Nachdem Darwish und Kratzer (1965) in der Expirationsluft von Küken, denen oral ^{14}C -markierte ÄDTA verabreicht worden war, 4 - 5 % der Dosis als $^{14}\text{CO}_2$ fanden, gewann die Frage nach dem metabolischen Verhalten der Chelatbildner neue Aktualität. Havlíček et al. (1968) untersuchten daher bei verschiedenen Dosen (1 und 100 μmol) und mit unterschiedlich markierten Chelatbildnern (ÄDTA-1- ^{14}C , ÄDTA-2- ^{14}C , ÄDTA-äthylen- ^{14}C und DTPA-1- ^{14}C), ob diese Substanzen von der Ratte metabolisiert werden. Die Autoren fanden mit ihrer bereits eingangs beschriebenen Methode eine nennenswerte Veratmung der Chelatbildner, unabhängig von der Dosis

und von dem chelierten Metallion. Bei ÄDTA-1-¹⁴C und ÄDTA-2-¹⁴C betrug die in der Exspirationsluft nachgewiesene ¹⁴C-Aktivität ca. 1 %, bei der DTPA ca. 0,8 % der Dosis. Die äthylenmarkierte ÄDTA wurde dagegen nur zu einem minimalen Prozentsatz veratmet. Daraus wurde geschlossen, daß die Chelatbildner, im Gegensatz zu Foreman's Annahme, doch metabolisiert werden, und zwar sollten die Acetatgruppen in vivo abgespalten werden.

Bei der an sich geringen Größe des gefundenen Effektes mußte natürlich eine Vortäuschung des Ergebnisses durch radioaktive Verunreinigungen einkalkuliert werden. Autoradiolyseprodukte glaubten die Autoren wegen der geringen spezifischen Aktivität der Präparate ausschließen zu können. Die papierchromatographische Untersuchung der verwendeten Lösungen hatte ebenso wie die Reinheitsprüfung mittels Hochspannungselektrophorese keine eindeutigen Hinweise für eine stärkere Verunreinigung der Substanzen ergeben. Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß bei der radiometrischen Auswertung der Chromatogramme und Elektropherogramme, wie sie von den Autoren vorgenommen wurde, eine nur geringfügige Verunreinigung sich wegen der hohen Restaktivität dem Nachweis entzieht.

Um den Einfluß der Autoradiolyse zu studieren, wurde eine DTPA-¹⁴C-Lösung mit 20 MR bestrahlt und anschließend deren Veratmung in vivo gemessen. Die so behandelte Lösung ergab eine Erhöhung der Veratmungsrates um einen Faktor von 1,63. Gleichzeitig erschien im Hochspannungselektropherogramm ein deutlicher zweiter Peak, den man den Zersetzungsprodukten zuschrieb. Da die Steigerung der Veratmungsrates in vivo geringer war als die Vergrößerung des zweiten Peaks im Elektropherogramm, glaubten die Autoren, daß der gefundene Effekt einer Metabolisierung der Chelatbildner zugeschrieben werden dürfte.

Daß diese Schlußfolgerung nicht erlaubt ist, zeigen die folgenden halbquantitativen Überlegungen. Tolbert (1960) veröffentlichte Daten über die jährliche Selbstbestrahlungsdosis von ^{14}C -markierten Substanzen und deren Zersetzung in Abhängigkeit von der Dosis, wobei ein Molekulargewicht von 125 und ein G-Wert* von 5 vorausgesetzt wurden. Für ein Präparat mit der spezifischen Aktivität von 1 mCi/g ergibt sich eine Selbstbestrahlungsdosis von $8,3 \cdot 10^5$ rad/Jahr und bei 1 mCi/mmol (MG = 125 vorausgesetzt) eine Dosis von $6,6 \cdot 10^6$ rad/Jahr. Demnach werden durch eine Dosis von 10^6 rad etwa 0,06 % und durch eine Dosis von 10^7 rad etwa 0,59 % einer ^{14}C -markierten Verbindung zersetzt. Aus den von Tolbert angegebenen Werten kann man die $D_{37\%}$ zu ungefähr $1,68 \cdot 10^9$ rad abschätzen. Da die $D_{37\%}$ umgekehrt proportional dem Molekulargewicht ist, kann - gleicher G-Wert vorausgesetzt - die $D_{37\%}$ für Substanzen mit einem Molekulargewicht von 400 bestimmt werden; in diesem Bereich liegen die Molekulargewichte der verwendeten Verbindungen. Nach Dertinger und Jung (1969) kann für organische Stoffe mit einem Molekulargewicht von 400 ein G-Wert von etwa 2,5 erwartet werden, wodurch sich die $D_{37\%}$ verdoppelt. Durch lineare Extrapolation wird für eine Zersetzung von etwa 1 % eine Dosis von ca. $1,2 \cdot 10^7$ rad gefunden. Mit diesem Wert und der bekannten spezifischen Aktivität der verwendeten Chelatbildner wurde die nach einjähriger Lagerung zu erwartende prozentuale Zersetzung der Substanzen berechnet:

*Unter dem G-Wert versteht man die Zahl der Moleküle, die pro 100 eV absorbiertes Strahlungsenergie verändert werden.

Substanz	Spez. Aktivität mCi/g	Selbstbe- strahlung rad/Jahr	% Zer- setzung
H ₄ ÄDTA-äthylen	5,4	4,48 · 10 ⁶	0,37
Na ₄ ÄDTA-1- ¹⁴ C	2,63	2,18 · 10 ⁶	0,18
Na ₄ ÄDTA-2- ¹⁴ C	56,8	47,2 · 10 ⁶	3,94
H ₅ DTPA (Geigy)	7,14	5,93 · 10 ⁶	0,49
H ₅ DTPA (Schweer)	1,5	1,25 · 10 ⁶	0,1

Daß die Größenordnung dieser Werte richtig ist, zeigen die vom Hersteller gemachten Angaben über die radiochemische Reinheit der ÄDTA-2-¹⁴C, die im Februar 1966 99 % und im Januar 1968 nur noch 95 - 96 % betrug. Über die Lagerzeit der übrigen Substanzen ist nur bekannt, daß die DTPA (Geigy) mehrere Jahre alt war, bevor sie für die Veratmungsversuche verwendet wurde.

Der Versuch von Havlíček et al., den Einfluß etwaiger Autoradiolyseprodukte auf den Veratmungseffekt anhand einer bestrahlten Na₃Ca DTPA-Lösung zu studieren, verdient ebenfalls einiger kritischer Anmerkungen. Die D_{37%} ist bei Bestrahlung in Lösung der Konzentration proportional. Für die Bestrahlung einer Na₃Ca DTPA-Lösung der Konzentration 0,59g/g (das entspricht der angewandten Konzentration der Injektionslösung von 200 µmol/ml) mit 20 MR ergibt die graphische Lösung eine Zersetzung von 1 - 2 %. Wie Dertinger und Jung (1969) am Beispiel der Ribonuclease zeigten, beträgt allerdings der G-Wert in Lösung nur etwa die Hälfte des G-Wertes im Trockenen, was zu einer Verminderung der erwarteten Zerstörungsrate führt. Diese sicher sehr grobe Abschätzung zeigt, daß der bei der Bestrahlung einer DTPA-Lösung mit 20 MR erhaltene Anteil an Spaltprodukten in der gleichen Größenordnung liegt, wie bei der Autoradiolyse nach längerer Lagerung. Dabei muß beachtet werden, daß in der Lösung bei der Bestrahlung natürlich der gleiche Prozentsatz an inaktiven Spaltprodukten ent-

steht, der wegen des großen Überschusses an Trägersubstanz mit den aktiven Bruchstücken konkurriert. Aus diesen Gründen ist es keineswegs unerwartet, wenn Havlíček et al. mit einer bestrahlten DTPA-Lösung eine Erhöhung der Veratmungsrates um nur 0,5 % erhielten. Die Behauptung, daß wegen dieser geringen Erhöhung der Veratmung nach Bestrahlung der ursprünglich gefundene Effekt auf einen Abbau der Chelatbildner beruhen muß, kann daher nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Falls die Veratmungsergebnisse durch den Abbau von Autoradiolyseprodukten hervorgerufen werden, mußte erwartet werden, daß die Substanz mit der größten spezifischen Aktivität auch am stärksten verunreinigt ist. Das wird bereits durch eine qualitative Betrachtung der Elutionsdiagramme, die nach der Gelfiltration über Sephadex G 10 erhalten wurden, bestätigt. Die einwandfrei abgetrennten Verunreinigungen betragen bei der ÄDTA-2-¹⁴C 3,63 % und bei der ÄDTA-1-¹⁴C sowie bei der DTPA-¹⁴C (Geigy) je 0,35 %. Es ist nicht zu erwarten, daß bereits durch einen Trennschritt radiochemisch reine Substanzen erhalten werden. Bei den abgetrennten Verunreinigungen dürfte es sich nur um kleinere Molekülbruchstücke handeln, wogegen die der ÄDTA ähnlicheren Produkte im Hauptpeak auftreten sollten. Daher darf aus dem abgetrennten Bruchteil der ¹⁴C-Aktivität nicht quantitativ auf die Veratmungsrates geschlossen werden. Die von Schweer synthetisierte DTPA besitzt die geringste spezifische Aktivität und sollte demnach die sauberste Substanz sein und sich metabolisch inert verhalten. Tatsächlich zeigt sie mit der ÄDTA-äthylen-¹⁴C bereits im ungereinigten Zustand einen deutlich geringeren Effekt als die übrigen Chelatbildner. Beide Substanzen ergeben auch im Elutionsdiagramm lediglich einen Peak, der allerdings stark verbreitert ist. Das läßt den Schluß zu, daß es sich bei den etwa vorhandenen Verunreinigungen nicht um sehr kleine Moleküle handeln kann.

Obwohl die ÄDTA-äthylen-¹⁴C fast dieselbe spezifische Aktivität besitzt wie die DTPA-¹⁴C (Geigy), wird sie bereits im ungereinigten Zustand wesentlich schwächer veratmet als die übrigen ÄDTA-Präparate. Zwar können aus jeder markierten ÄDTA prinzipiell die gleichen Bruchstücke entstehen, aber bei der äthylenmarkierten Verbindung wird ein anderer Teil von ihnen ¹⁴C-Aktivität besitzen. Wie bereits erwähnt, kann man aus dem Elutionsdiagramm schließen, daß es sich dabei hauptsächlich um ÄDTA-ähnliche Substanzen handeln dürfte. Es ist daher nicht verwunderlich, daß diese Autoradiolyseprodukte ein anderes, der ÄDTA ähnliches metabolisches Verhalten zeigen als kleinere ¹⁴C-markierte Moleküle. Damit erklärt sich zwanglos die im Vergleich zu den übrigen ÄDTA-Präparaten außerordentlich niedrige Veratmungsrates der ÄDTA-äthylen-¹⁴C.

Die durch einmalige Gelfiltration gereinigten Chelatbildner sind, wie bereits erwähnt, vom radiochemischen Standpunkt aus betrachtet, keineswegs völlig homogen. Dies ist aus dem Elektropherogramm der ungereinigten und der gereinigten ÄDTA-2-¹⁴C eindeutig ersichtlich (Abb. 17). Die Verunreinigung, die bei der Hochspannungselektrophorese als Schleppe hinter dem ÄDTA-Fleck erscheint, ist lediglich verringert. Daher kann der mit gereinigten Präparaten erhaltene Veratmungseffekt nicht ohne weiteres einem echten Abbau der Chelatbildner zugeschrieben werden. Erst nach wiederholter Chromatographie der saubersten Fraktionen könnte eine genaue Aussage gemacht werden. Für die toxische Wirkung der Chelatbildner ist jedoch eine Metabolisierung, die sicher unter 0,1 % liegen dürfte, ohne Bedeutung, weshalb eine weitergehende Untersuchung dieser Frage nicht sinnvoll ist.

In den Abb. 18 - 21 sind die Veratmungsergebnisse aus Tabelle 17 graphisch aufgetragen. Zwei verschiedene Kurvenarten sind angedeutet. Die bereits im ungereinigten Zustand schwächer veratmeten Präparate (ÄDTA-1-¹⁴C, ÄDTA-äthylen-¹⁴C

und DTPA (Schweer)) zeigen in den ersten acht Stunden einen nahezu linearen Anstieg der Veratmungsrates. Diese Kinetik wird durch die Reinigung nicht wesentlich geändert. Es erfolgt lediglich eine etwas bessere Angleichung an die Linearität und eine Senkung der absolut veratmeten Menge. Die Veratmung der beiden Präparate mit dem größten Effekt (ÄDTA-2-¹⁴C und DTPA (Geigy)) hat bereits nach vier Stunden nahezu den Maximalwert erreicht. Besonders deutlich tritt dies bei den abgetrennten Verunreinigungen hervor. Die gereinigten Chelatbildner zeigen dagegen in den ersten acht Stunden ebenfalls eine nahezu lineare Veratmungskinetik. Diese Ergebnisse können mit folgender Hypothese erklärt werden: Der gefundene Veratmungseffekt der ungereinigten Chelatbildner beruht auf dem Abbau von niedermolekularen Autoradiolyseprodukten und einem minimalen Abbau von Chelatbildnern bzw. diesen sehr ähnlichen Substanzen, die z.B. durch Abspaltung von CO₂ entstehen könnten. Die niedermolekularen Bruchstücke werden sehr schnell metabolisiert, was die große Anfangsgeschwindigkeit der Veratmung erklärt und durch den außerordentlich großen Effekt bei den abgetrennten Verunreinigungen gestützt wird. Chelatbildner und/oder ihnen ähnliche Produkte werden dagegen sehr langsam im Organismus abgebaut. Da innerhalb sechs Stunden bereits 95 % der Chelatbildner von der Ratte ausgeschieden sind, muß angenommen werden, daß kurz nach der Injektion durch einen aktiven Transport ein Teil der Chelatbildner aus dem extrazellulären in den intrazellulären Raum gelangt. Dieser Teil wird anschließend langsam metabolisiert, und nach acht Stunden sind die am Abbau beteiligten Enzyme nicht mehr mit Substrat gesättigt, so daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkender Substratkonzentration abnimmt. Diese Hypothese erklärt widerspruchsfrei die in vivo gefundenen Ergebnisse, der positive Beweis für ihre Richtigkeit ist damit jedoch nicht erbracht.

Aufgrund unserer Ergebnisse werden kritische Anmerkungen zu Arbeiten notwendig, die mit ungereinigten Chelatbildnern durchgeführt wurden. Bohne et al. (1968) fanden für die Plasmaclearance der ÄDTA und DTPA bei der Ratte einen multiexponentiellen Verlauf. Ein Teil der Aktivität wurde mit einer Halbwertszeit von 20 Minuten, der andere mit einer Halbwertszeit von 20 - 40 Stunden (die Unterschiede für ÄDTA und DTPA konnten dabei statistisch nicht gesichert werden) ausgeschieden. Der "langsame" Term beträgt weniger als 0,1 % der verabfolgten Dosis und wurde von den Autoren durch die Bindung der Chelate bzw. ihrer Metaboliten durch Plasmaproteine erklärt. Nach obiger Hypothese ist diese Möglichkeit zwar nicht auszuschließen, es muß aber beachtet werden, daß dieser zweite Anteil auch aus Verunreinigungen und/oder deren Metaboliten bestehen könnte. Zur Klärung dieser Frage müßten die Versuche mit gereinigten Präparaten wiederholt werden.

Analoge Überlegungen gelten für die Arbeit von Weber (1969b), der nach i.v. Injektion die Verteilung von ÄDTA-2-¹⁴C bei Ratten autoradiographisch untersuchte. Da die abgelagerte Aktivität nur einen minimalen Bruchteil der applizierten Dosis ausmacht und Weber die Verbindung mit der stärksten Verunreinigung benutzt hatte, kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, daß es sich möglicherweise bei der aufgefundenen ¹⁴C-Aktivität um radioaktive Verunreinigungen und/oder deren Metaboliten handelt.

Die diskutierten Ergebnisse bieten eine zwanglose Erklärung für die uneinheitlichen Befunde aus den in vitro-Versuchen. Diese Experimente wurden mit der am leichtesten zugänglichen, aber auch am stärksten verunreinigten ÄDTA-2-¹⁴C durchgeführt. Bei der großen Zahl möglicher Autoradiolyseprodukte und der geringen Größe der Effekte erscheint die Frage nach der Art der abbauenden Enzyme nicht sinnvoll und eine eingehende Untersuchung erübrigt sich.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit darf die Behauptung von Havlíček et al., daß die Chelatbildner zu etwa 1 - 2 % abgebaut werden, als widerlegt angesehen werden. Die Unabhängigkeit des von den Autoren gefundenen Veratmungseffekts von der applizierten Trägerdosis und den chelierten Metallionen findet eine einfache Erklärung in der Tatsache, daß zumindest sein größter Teil auf den Abbau von Verunreinigungen zurückzuführen ist. Die Feststellung von Foreman et al., daß ÄDTA und DTPA höchstens zu einem Anteil, der kleiner als 0,1 % der verabfolgten Dosis ist, veratmet wird, wird somit bestätigt.

8. Zusammenfassung

Anknüpfend an in vivo-Versuche von Havlíček et al. (1968) wurde versucht, in Homogenaten aus Rattenorganen ein Chelatbildner abbauendes Enzym zu isolieren. Es gelang der Nachweis einer enzymatischen Reaktion mit ¹⁴C-markierter ÄDTA in vitro in Homogenaten aus Leber, Niere und Darm. Eine Anreicherung des Enzyms war nicht möglich, da es offenbar fest an Zellstrukturen gebunden ist und bei allen Ablöseversuchen ein beträchtlicher Aktivitätsverlust auftrat. Die enzymatische Reaktion verläuft langsam (über mehrere Stunden mit konstanter Geschwindigkeit), ist an die Gegenwart von O₂ gebunden und besitzt ein pH-Optimum von ca. 5,9. Homogenate verlieren durch Lyophilisieren und Einfrieren den größten Teil ihrer enzymatischen Aktivität. Durch Erwärmen auf 60 °C (30 Min.) können sie vollständig inaktiviert werden. Als Enzymhemmer wirken nur Inhibitoren mit breitem Wirkungsspektrum, insbesondere Substanzen mit großer Affinität zu Schwermetallen und SH-Gruppen. Eine Beteiligung der MAO und eines Teiles der Atmungskette konnte durch Versuche mit spezifischen Inhibitoren ausgeschlossen werden. Die Cytochromoxidase ist, wie mit einem Enzympräparat aus Rinderherzmitochondrien gezeigt wurde, für den Abbau ebenfalls bedeutungslos.

Im Verlauf der Untersuchungen ergaben sich Zweifel an der ursprünglichen Annahme, daß die gefundenen Effekte tatsächlich auf einem Abbau der ÄDTA beruhen. Radiochemisch unterschiedlich reine Substanzen ergaben in vitro ihrer Verunreinigung proportionale Veratmungseffekte, und nach einer groben Vorreinigung über Sephadex G 10 war in vitro kein Abbau nachweisbar. Darauf wurden die Versuche von Havlíček et al. (1968) mit gereinigten und ungereinigten Chelatbildnern wiederholt. Es zeigte sich, daß über Sephadex G 10 gereinigte Chelatbildner in vivo nur ca. 1/10 des mit den ungereinigten Substanzen erhaltenen Veratmungseffekts ergaben. Damit war die frühere Annahme, die ÄDTA und DTPA würden in vivo zu ca. 1 % metabolisiert, widerlegt und der Befund von Foreman et al. (1953), der nur eine Metabolisierung der ÄDTA von ca. 0,1 % nachweisen konnte, bestätigt.

9. Methodik

Tiermaterial, Organgewinnung und Homogenatherstellung

Als Versuchstiere dienten Albinoratten des Heiligenberg-Inzuchtstammes, die Standardfutter (Altromin R) und Leitungswasser ad lib. erhielten.

Für die in vitro-Versuche wurden Organe von männlichen Tieren mit einem Körpergewicht von 180 - 220 g verwendet, während die Versuche in vivo (analog denen von Havlíček et al.) mit weiblichen Ratten, deren Körpergewicht 170 - 190 g betrug, durchgeführt wurden. Die Organe wurden den Tieren unter Äthernarkose, nach Ausbluten aus der Aorta und V. cava inf. entnommen und sofort gewogen. Alle weiteren Prozeduren wurden im Eisbad durchgeführt. Nach grobem Zerkleinern mit einer Schere wurden pro g Frischgewebe 5 ml Saccharoselösung (0,25 M) bzw. der entsprechende Puffer zugegeben und mit Ultra-Turrax oder nach Potter und Elvejem (in einem Glashomogenisator mit eingepaßtem Teflonstempel) homogenisiert. Der Darm wurde vor

der weiteren Verarbeitung mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Urin wurde von männlichen Ratten, die in einem Stoffwechsellkäfig immobilisiert waren, über 24 Stunden gesammelt. Zur Serungewinnung wurde frisches Blut in einer Laborzentrifuge kurz zentrifugiert.

Standardansätze und Standardbedingungen

Standardansatz I:

9 ml Puffer (Sörensen pH 5,9)

0,5 ml auf enzymatische Aktivität zu untersuchende Lösung
bzw. Suspension

0,1 ml Substratlösung ($\text{Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA}-2-^{14}\text{C}$ 12 $\mu\text{Ci/ml}$, 400 $\mu\text{mol/ml}$)

Standardansatz II:

Wie I, aber 0,2 ml Substratlösung und zusätzlich zur Substratlösung 154 mg $\text{Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Sättigung)

Die Ansätze wurden je nach Bedarf modifiziert (siehe Experimenteller Teil).

Zur Beatmung wurde für eine Stunde ein kontinuierlicher Luftstrom durch die Apparatur (Abb. 2) gesaugt und danach die enzymatische Reaktion mit 1 ml halbkonzentrierter Schwefelsäure gestoppt. Zwanzigminütiges Spülen mit Luft erwies sich als ausreichend für die Sammlung des noch in der Apparatur verbliebenen Restes an $^{14}\text{CO}_2$.

Bestimmung der ^{14}C -Aktivität

Die ^{14}C -Aktivität der Proben wurde in einem Flüssigszintillationszähler (Mark I, Nuclear Chicago Corporation) bei 0 °C zusammen mit einem Standard (d.h. einem aliquoten Teil der Substrat- bzw. Injektionslösungen) gemessen.

Als Flüssigszintillatoren dienen:

1) Petroff-Szintillator

8 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)

110 mg 2,2'-p-Phenylen-bis-(5-Phenyloxazol) (POPOP)

wurden in 100 ml Toluol gelöst und nach Zugabe von 150 ml 2-Butoxy-äthanol wurde mit Toluol auf 1000 ml aufgefüllt.

2) Bray's-Szintillator

4 g PPO

200 mg POPOP

60 g Naphthalin

wurden mit 100 ml Methanol sowie 60 ml Äthylenglykol versetzt und mit Dioxan auf 1000 ml aufgefüllt.

Zur Messung des $^{14}\text{CO}_2$ wurden nach Beendigung der Veratmungsversuche je 10 ml Petroff-Szintillator in die Absorptionsgläschen pipettiert und, wenn nötig, mit Methanol aufgefüllt (Gesamtvolumen ca. 22 ml). Die Bestimmung der ^{14}C -Aktivität in den durch die Gelchromatographie erhaltenen Fraktionen erfolgte mit je 10 μl Lösung in 10 ml Bray's-Szintillator.

Die gemessene Impulsrate wurde mit Hilfe einer Quenchkurve, die mittels Toluol- ^{14}C bekannter Aktivität hergestellt war, in Zerfälle pro Minute umgerechnet. Dieses Verfahren war notwendig, um die verschieden starke Löschung der Proben, die bei einer (z.B. durch Luftsauerstoff hervorgerufenen) Verfärbung auftritt, zu berücksichtigen.

Blindwerte

Es zeigte sich, daß bei Veratmungsversuchen, in denen das Homogenat durch Saccharoselösung oder Puffer ersetzt war, im Absorptionsgefäß ebenfalls ^{14}C nachweisbar war. Dieser Leerwert ist unabhängig vom pH des Ansatzes, steigt kaum mit zunehmender Inkubationsdauer und besitzt unter Luft

und N_2 denselben Wert. Im Mittel ergaben sich für den Leerwert 220 Zerfälle pro Minute, das entspricht 10 - 20 % des auftretenden Effekts. In Einzelfällen schwankte er allerdings zwischen 100 und 400 Zerfällen pro Minute, so daß geringe Änderungen in der enzymatischen Aktivität nicht mehr sicher feststellbar waren. Die mit der ÄDTA-2- ^{14}C gefundenen Leerwerte waren etwa doppelt so hoch wie die mit ÄDTA-1- ^{14}C erhaltenen, was bei dem unterschiedlichen Reinheitsgrad der beiden Präparate den Erwartungen entspricht. Umgekehrtes Verhalten zeigte die ^{14}C -markierte Bromessigsäure. Der Leerwert, der mit Bromacetat-1- ^{14}C erhalten wurde, war zwei- bis dreimal größer als im Falle von Bromacetat-2- ^{14}C . Das ist, wenn man die leicht erfolgende Decarboxylierung der halogenierten Essigsäure berücksichtigt, nicht verwunderlich.

Zentrifugation

Die Differentialzentrifugation zur Anreicherung einzelner Zellbestandteile wurde nach Hageboom (1955) durchgeführt. Für die Isolierung der Kernfraktion wurden eine Servall-Zentrifuge, sonst eine Ultrazentrifuge (Beckman Spinco L 50) verwendet. Da im Inneren der Zentrifugenröhrchen auf die suspendierten Partikel in Abhängigkeit von ihrem Aufenthaltsort unterschiedlich große Kräfte einwirken, wurden die Drehzahlen so gewählt, daß die angegebenen Vielfachen von g in der Mitte der Probe voll zur Wirkung kamen. Die mit Ultraschall zerkleinerten Homogenate wurden zur vollständigen Sedimentierung aller Partikel 1 Stunde bei 100 000 x g zentrifugiert.

Behandlung mit Detergentien

Mit dem Ultra-Turrax hergestellte Nierenhomogenate (Saccharose 0,25 M) wurden wie folgt mit verschiedenen Detergentien behandelt:

1. Digitonin 4 ml Homogenat wurden mit 14 ml einer 2 %igen Digitoninlösung (Morton 1955) bei 4 °C 20 Minuten gerührt.
2. Teepol 710 4 ml Homogenat wurden mit 0,008 ml 40 %iger Teepollösung bei 4 °C 35 Minuten gerührt und nach der Entnahme von 1 ml Homogenat 3 ml H₂O zugefügt.
3. Desoxycholát 4 ml Homogenat wurden mit 80 mg Na-Desoxycholát bei 4 °C 35 Minuten gerührt. Anschließend Behandlung wie unter 2.
4. Triton X-100 14 ml Homogenat wurden mit 1 % (V/V) Triton X-100 im Eisbad 1 Stunde gerührt.
5. N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid 9 ml Homogenat (in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,0) wurden mit 9 mg Detergenz bei 4 °C 35 Minuten gerührt.

Unmittelbar nach der Behandlung mit den Detergentien folgte eine Zentrifugation bei 15 000 X g (20 Min.). Danach wurden die Sedimente im ursprünglichen Lösungsmittel suspendiert und aliquote Teile (je 0,5 ml Ausgangshomogenat entsprechend) für die einzelnen Ansätze entnommen.

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der geringfügig modifizierten Methode von Beisenherz et al. (1953). Nach Zugabe von Trichloressigsäure zur Ausfällung des Proteins stand der Ansatz 30 Minuten in einem auf 90 °C erwärmten Wasserbad. Ferner wurde die Proteinkonzentration nicht aus der bei 550 m μ gemessenen Extinktion errechnet, sondern direkt aus einer mit Rinderalbumin aufgestellten Eichkurve abgelesen.

Sprühreagenz nach Sýkora und Eybl

Das Reagenz färbt ÄDTA- und DTPA-Komplexe durch Bildung der jeweiligen Co(III)-Verbindungen violett.
Zusammensetzung: 1 % CoCl₂, 2 % K₂Cr₂O₇ und 10 % Eisessig in Wasser.

Chelate

Inaktive Chelate: $\text{Na}_2\text{Ca ÄDTA} \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Calcium-Titriplex^(R)),
von E. Merck AG, Darmstadt.

$\text{Na}_3\text{Ca DTPA} \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ von J.R. Geigy, Basel.

¹⁴C-markierte Verbindungen:

$\text{Na}_4\text{ÄDTA-1-}^{14}\text{C}$ (1 mCi/mmol) zu 99 %
radiochemisch rein, von International
Chemical and Nuclear Corporation, City
of Industry, Calif./USA.

$\text{Na}_4\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ (21,6 mCi/mmol) zu 95-96 %
radiochemisch rein, von Radiochemical
Centre, Amersham, England.

$\text{H}_4\text{ÄDTA-äthylen-}^{14}\text{C}$ (1,58 mCi/mmol) von
Mallinckrodt Nuclear, Orlando, Florida/
USA.

$\text{H}_5\text{DTPA-1-}^{14}\text{C}$ (2,81 mCi/mmol) von den
Geigy Research Laboratories, Ardsley,
N.Y./USA.

$\text{H}_5\text{DTPA-1-}^{14}\text{C}$ (0,59 mCi/mmol) syntheti-
siert von Schweer.

$\text{BrCH}_2\text{-COOH-1-}^{14}\text{C}$ (45,5 mCi/mmol) zu 98 %
radiochemisch rein

und

$\text{BrCH}_2\text{-COOH-2-}^{14}\text{C}$ (46,6 mCi/mmol) zu
98 - 99 % radiochemisch rein, von
Radiochemical Centre, Amersham, England

Gelchromatographie

Sephadex G 10 wurde einige Stunden, unterbrochen durch
mehrmaliges Dekantieren, in Wasser gequollen und an-
schließend blasenfrei in Säulen, deren Auslauf mit Glas-
wolle verschlossen war, eingefüllt. Für die einzelnen
Reinigungsversuche wurden folgende Säulendimensionen ge-
wählt:

	Betthöhe	Säulendurchmesser
Vorversuch	44 cm	1 cm
Reinigung	143 cm	1,4 cm

Die Elutionsgeschwindigkeit betrug im Vorversuch 31 ml/h und bei der Reinigung 26 - 28 ml/h. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Na-Salze der Chelatbildner in 1 ml Wasser gelöst aufgegeben. Die Fraktionsgröße betrug 1,8 ml (40 Tropfen).

Injektionslösungen

Alle Chelatbildner wurden als Ca-Chelate intraperitoneal, in 0,5 ml Wasser gelöst, injiziert. Die Konzentration betrug 200 $\mu\text{mol/ml}$ und die ^{14}C -Dosis bei den ungereinigten und den gereinigten Verbindungen etwa 4 $\mu\text{Ci/ml}$, wogegen die Lösungen, in denen die abgetrennten Verunreinigungen enthalten waren, eine wesentlich niedrigere Aktivität besaßen, wie aus folgenden Daten hervorgeht:

Verunreinigungen von	^{14}C -Aktivität
ÄDTA-1- ^{14}C	8,6 nCi/ml
ÄDTA-2- ^{14}C	7,42 nCi/ml
DTPA-1- ^{14}C (Geigy)	57 nCi/ml

Der pH-Wert der Injektionslösungen lag bei den Chelaten der ÄDTA um 5, bei denen der DTPA zwischen 7,5 und 8,0. Die Ca-Chelate der markierten Verbindungen wurden aus den Na-Salzen durch Zugeben der entsprechenden Menge CaCl_2 -Lösung hergestellt. Vor der Verwendung standen alle Injektionslösungen mindestens 12 Stunden im Kühlschrank.

10. Literatur

- Allen, A.C.: The Kidney. New York 1951.
- Ahrens, F.A., A.L. Aronson: Fed. Proc. 27, 465 (1968).
- Anghileri, L.J.: Naturwissenschaften 55, 182 (1968).
- Auterhoff, H.: Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie.
Stuttgart 1965.
- Beaufay, H., C. de Duve: Biochem. J. 73, 604-609 (1959).
- Beisenherz, G., H.J. Boltze, R. Czok, K.H. Garabade,
E. Meyer-Arendt, G. Pfeleiderer: Z. Naturf. 8b, 555
(1953).
- Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse S. 952.
Weinheim 1962.
- Blaschko, H.: The Enzymes 8, 337-351. New York u. London
1963.
- Bohne, F., A.-E. Harmuth-Hoene, K. Kürzinger, F. Havlíček:
Strahlentherapie 136/5, 609-616 (1968).
- Catsch, A.: Arch. exp. Path. Pharmak. 246, 316-329 (1964).
- Catsch, A.: Dekorporierung radioaktiver und stabiler
Metallionen. München 1968a.
- Catsch, A.: Naturwissenschaften 55, 473-477 (1968b).
- Darwish, N.M., F.H. Kratzer: J. Nutrition 86, 187-192
(1965).
- Dertinger, H., H. Jung: Molekulare Strahlenbiologie.
Heidelberger Taschenbücher 57/58, 1969.
- Doolan, P.D., S.L. Schwartz, J.R. Hayes, J.C. Mullen,
N.B. Cummings: Toxicology and Applied Pharmacology
10, 481-500 (1967).
- Duve, C. de, P. Baudhuin: Physiol. Rev. 46, 323-356 (1966).
- Dykerhoff, H., R. Marx, B. Ludwig: Z. ges. exp. Med. 110,
412 (1942).

- Foreman, H., M. Vier, M. Magee: J. Biol. Chem. 203, 1045-1053 (1953).
- Foreman, H., C. Finnegan, C.C. Lushbaugh: J. Am. Med. Ass. 160, 1042 (1956).
- Foreman, H. In: Metal-Binding in Medicine, p. 82-94. Philadelphia and Montreal 1960.
- Gelboin, H.V., N.R. Blackburn: Cancer Res. 24, 356 (1964).
- Gorbach, G., J. Henke: J. Chromatog. 37, 225-233 (1968).
- Green, D.E., D.M. Ziegler: Methods in Enzymology VI, 416-430. New York and London 1963.
- Harmuth-Hoene, A.-E.: Strahlentherapie 134/1, 110 (1967).
- Havlíček, F., F. Bohne, H. Zorn: Strahlentherapie 136/5, 604-608 (1968).
- Herrmann, B., R. Pulver: Arch. int. Pharmacodyn. CXXVI No. 3-4, 454-469 (1960).
- Hogeboom, G.H.: Methods in Enzymology I, 16-19. New York and London 1955.
- Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie S. 174. Stuttgart 1966.
- Kiese, M., H. Uehleke: Arch. exp. Path. Pharmak. 242, 117-129 (1961).
- Machinist, J.M., E.W. Dehner, D.M. Ziegler: Arch Biochem. Biophys. 125, No. 3, 858-864 (1968).
- Morton, R.K.: Methods in Enzymology I, 25-51. New York and London 1955.
- Nofre, C., A. Cier, A. Paquelier: Path. Biol. 10, 1203 (1962).
- Perrin, D.D.: Chemical Analysis Vol. 18. Organic Complexing Reagents p. 126. New York and London 1964.
- Potter, R.: Methods in Enzymology I, 10-16. New York and London 1955.

- Reuber, M.D.: Arch. Pathol. 76, 44-48 (1963).
- Reuber, M.D., C.W. Lee: Arch. Environ. Health 13, 554-557 (1966).
- Reuber, M.D.: Arch. Environ. Health 15, 141-146 (1967).
- Ross, J.J., R.L. Young, A.R. Maass: Science 128, 1279 (1958).
- Rubin, M., S. Gignac, S.B. Bessman, E.L. Belknap: Science 117, 659 (1953).
- Schwartz, S.L., J.R. Hayes, R.S. Ide, C.B. Johnson, P.D. Doolan: Biochem. Pharmacology 15, 377-389 (1966).
- Swindell, A.C., J.L. Gaylor: J. Biol. Chem. 243, No. 21, 5546-5555 (1968).
- Tolbert, B.M.: Nucleonics 18 (8), 74 (1960).
- Venezky, D.L., W.B. Moniz: Analytical Chemistry 41, 11-16 (1969).
- Volf, V.: Atomkernenergie (1970). In Vorbereitung.
- Webb, J.L.: Enzyme and Metabolic Inhibitors III, New York and London 1966.
- Weber, K.M.: Z. ges. exp. Med. 150, 354-360 (1969a).
- Weber, K.M.: Strahlentherapie 137/6, 708-710 (1969b).
- Weber, K.M.: Virchows Archiv B (1970). In Vorbereitung.
- Wharton, C.D.: Methods in Enzymology X, 245-246. New York and London 1967.
- Yonetani, T.: The Enzymes Vol. 8, 41-79. New York and London 1963.

11. Tabellen

Tabelle 1

^{14}C -Ausscheidung nach i.p. Injektion von $\text{Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA-2-}^{14}\text{C}$
(nach Foreman et al. 1953).

	% der ^{14}C -Dosis		
	1 1/2 h	6 h	24 h
Urin	85,22	95,73	94,56
Faeces	0,50	2,04	3,63
$^{14}\text{CO}_2$ ausgeatmet	-	0,05	0,08

Tabelle 2

$^{14}\text{CO}_2$ in der Atemluft (24 Std.) nach i.p. Injektion 1- ^{14}C -markierter Chelatbildner. Mittelwerte mit Mutungsbereich für $P = 0,05$ (nach Havlíček et al. 1968).

Chelat	Dosis (μmol)	% der ^{14}C -Dosis
$\text{Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA}$	1	$1,353 \pm 0,148$
	100	$1,191 \pm 0,212$
$\text{NaY(III)}\ddot{\text{A}}\text{DTA}$	100	$1,175 \pm 0,168$
Na_3CaDTPA	1	$0,724 \pm 0,108$
	100	$0,852 \pm 0,100$
	1000	$0,848 \pm 0,129$
Na_3ZnDTPA	1	$0,860 \pm 0,152$
	100	$0,546 \pm 0,177$

Tabelle 3

$^{14}\text{CO}_2$ in der Atemluft (24 Std.) nach i.p. Injektion von $100 \mu\text{mol Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ in verschiedenen Positionen markiert. Mittelwerte mit Mutungsbereich für $P = 0,05$ (nach Havlíček et al. 1968).

Position des ^{14}C	% der ^{14}C -Dosis
1-C-ac.	$1,191 \pm 0,212$
2-C-ac.	$1,234 \pm 0,062$
äthylen	$0,0513 \pm 0,024$

Tabelle 4

Veratmung von $\text{Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA-2-}^{14}\text{C}$ durch Organhomogenate und Serum. Die veratmete Menge pro Organ ergibt sich aus dem für den Standardansatz I bestimmten Wert durch Multiplikation mit dem von den einzelnen Organen erhaltenen Homogenatvolumen.

Organ	% der ^{14}C -Dosis	
	pro Standardansatz	pro Organ
Leber	$0,48 \cdot 10^{-2}$	0,50
	$0,81 \cdot 10^{-2}$	0,84
Niere	$2,82 \cdot 10^{-2}$	0,39
	$1,57 \cdot 10^{-2}$	0,22
Serum	0	0

Tabelle 5

pH-Abhängigkeit der Veratmung im Nierenhomogenat im Standardansatz I. Mittelwerte aus 2 Messungen.

pH	% der ^{14}C -Dosis
6,5	$6,43 \cdot 10^{-2}$
7,4	$2,59 \cdot 10^{-2}$
8,5	$0,68 \cdot 10^{-2}$

Tabelle 6

Einwirkung von Detergentien auf die Veratmung in Nierenhomogenaten. Als Kontrolle diente ein unbehandeltes Homogenat. Standardansatz I.

Substanz	% der Kontrolle
Teepol 710	39 54
Desoxycholat	45 42
Digitonin	21 46
=====	
N-Cetyl-N,N,N-trimethyl ammoniumbromid	75 99
Suspendierter Niederschlag	119
=====	
Triton X 100	78 81
Suspendierter Niederschlag	95 106

Tabelle 7

Einwirkung der Ultraschallbehandlung auf die Veratmung in Nierenhomogenaten.

Probe	Zerfälle $\text{Min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ Protein
Homogenat nach Potter und Elvehjem	51
Homogenat nach Ultraschallbehandlung	0
Niederschlag nach Ultraschallbehandlung	244
Überstand nach Ultraschallbehandlung	0

Tabelle 8

Einwirkung von Phospholipasen auf ein Nierenhomogenat. Standardansatz I.

Probe	Zerfälle $\text{Min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ Protein
Niederschlag suspendiert	66 69
Niederschlag mit Lipase A behandelt	46
Niederschlag mit Lipase D behandelt	63 61
Niederschlag nach Behandlung mit Lipase A	137 157
Niederschlag nach Behandlung mit Lipase D	129 112

Tabelle 9

Veratmung im Nierenhomogenat unter Luft, Sauerstoff und Stickstoff. Standardansatz I. Der unter Luft erhaltene Wert wurde gleich 100 % der Kontrolle gesetzt.

Gas	% der Kontrolle
O ₂	128 93
N ₂	8 22 30

Tabelle 10

Einwirkung verschiedener Enzyminhibitoren auf die Veratmung im Nierenhomogenat. Standardansatz I. Die Inhibitor-konzentration war (mit wenigen Ausnahmen) 10^{-3} M. Bei den Versuchen mit RBS 25, CHCl_3 und Na-Cholat wurden je 0,1 ml Lösung und vom Rattenserum 0,5 ml dem Standardansatz I zugegeben.

Inhibitor	% der Kontrolle Mittelwert	% der Kontrolle Extremwerte
KCN	11	34-0
Na_2S	20	47-0
NaN_3	10	27-0
RBS 25	15	20-9
CHCl_3	18	20-15
Na-Cholat (20 %ig)	2	3-1
p-Chinon	18	30-6
Dinitrophenol	9	10-7
Naphthochinon	4	8-0
HgCl_2	12	24-0
Rattenserum	24	31-16
Antimycin A	keine Hemmung nachweisbar	
Amobarbital ¹	"	"
Nardil ²	"	"
$\text{H}_2\text{NOH}\cdot\text{HCl}$	"	"
$\text{H}_4\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$	"	"
Aminoguanidin	"	"
Semicarbazid	"	"
Methylenblau	"	"
8-Oxychinolin	"	"
Alloxan	"	"

1) 5-Äthyl-5-iso-amylobarbitursäure

2) β -Phenyläthylhydrazin-hydrogensulfat

Tabelle 11

Enzymatische Aktivität gegen $\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ und Cytochrom-oxidaseaktivität eines Präparats aus Rinderherz.

Probe	Zerf. $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{Protein}$	$\Delta E_{550} \text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{Protein}$
Cytochrom-oxidase-präparat	0	8
Suspendierter Niederschlag	976	1,33

Tabelle 12

$\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ -Veratmung eines Mitochondrienpräparats aus Rinderherz.

Probe	Zerfälle $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{Protein}$
Suspendierter Niederschlag	879
$\text{KCN } 10^{-3}\text{m}$	0
15' bei 90°C inkubiert	0

Tabelle 13

Vergleich der Veratmung von $\text{NaFeÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ und $\text{Na}_2\text{CaÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ durch ein Nierenhomogenat.

Chelat	% der Dosis
$\text{Na}_2\text{CaÄDTA-2-}^{14}\text{C}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$ $1,3 \cdot 10^{-2}$
$\text{NaFeÄDTA-2-}^{14}\text{C}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$ $0,9 \cdot 10^{-2}$

Tabelle 14

Vergleich der Veratmung von $\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ und $\text{ÄDTA-1-}^{14}\text{C}$ in vitro (Mittelwerte aus 2 Messungen).

Der Wert für pH 5,9 wurde mit Nierenhomogenat einer zweiten Ratte gewonnen.

pH	% der ^{14}C -Dosis		$^{14}\text{C-2}/^{14}\text{C-1}$
	$\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$	$\text{ÄDTA-1-}^{14}\text{C}$	
4,5	$12,4 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	3,4
5,9	$33 \cdot 10^{-2}$	$7,6 \cdot 10^{-2}$	4,4
6,5	$16,5 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-2}$	4,7

Tabelle 15

Leerwerte mit Na-Bromacetat. Die zugefügte Bromacetatmenge entspricht dem 10-fachen Wert (bezogen auf die ^{14}C -Aktivität) der maximal erwarteten Verunreinigung von 4 %. Die Berechnung der Prozentwerte erfolgte unter der Annahme, daß $1,2 \mu\text{Ci}$ verunreinigte $\text{ÄDTA-}^{14}\text{C}$ im Ansatz vorhanden ist.

Probe	% der Dosis
$\text{Br-ac-2-}^{14}\text{C}$ mit $40 \mu\text{mol Na}_2\text{CaÄDTA}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$
$\text{Br-ac-2-}^{14}\text{C}$ ohne $\text{Na}_2\text{CaÄDTA}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$ $1,9 \cdot 10^{-2}$
$\text{Br-ac-1-}^{14}\text{C}$ mit $40 \mu\text{mol Na}_2\text{CaÄDTA}$	$4,8 \cdot 10^{-2}$ $5,0 \cdot 10^{-2}$
$\text{Br-ac-1-}^{14}\text{C}$ ohne $\text{Na}_2\text{CaÄDTA}$	$4,1 \cdot 10^{-2}$ $3,6 \cdot 10^{-2}$

Tabelle 16

Veratmung von Na-Bromacetat- ^{14}C mit Nierenhomogenat.
Es wurden jeweils die entsprechenden Leerwerte aus
Tabelle 15 subtrahiert. Die Berechnung der Prozentsätze
erfolgte unter den bei Tab. 15 genannten Voraussetzungen.

Probe	% der Dosis
Br-ac-2- ^{14}C mit 40 μmol $\text{Na}_2\text{CaÄDTA}$	$2,2 \cdot 10^{-2}$ $2,3 \cdot 10^{-2}$
Br-ac-2- ^{14}C ohne $\text{Na}_2\text{CaÄDTA}$	$< 1 \cdot 10^{-2}$
Br-ac-1- ^{14}C mit 40 μmol $\text{Na}_2\text{CaÄDTA}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$ $1,6 \cdot 10^{-2}$
Br-ac-1- ^{14}C ohne $\text{Na}_2\text{CaÄDTA}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$ $1,2 \cdot 10^{-2}$

Tabelle 17

Veratmung ^{14}C -markierter Chelatbildner in vivo.

Substanz		% der ^{14}C -Dosis		
		0-4 h	0-8 h	0-24 h
$\text{Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA-}$ $1\text{-}^{14}\text{C}$	ungereinigt	0,281 $\pm 0,027$	0,429 $\pm 0,074$	0,594 $\pm 0,183$
	Peak I	0,0234 $\pm 0,0014$	0,0628 $\pm 0,0040$	0,144 $\pm 0,0175$
	Peak II	3,05 $\pm 0,311$	5,17 $\pm 0,43$	6,12 $\pm 0,482$
$\text{Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA-}$ $2\text{-}^{14}\text{C}$	ungereinigt	1,235 $\pm 0,062$	1,577 $\pm 0,028$	1,683 $\pm 0,036$
	Peak I	0,0649 $\pm 0,0032$	0,1124 $\pm 0,0044$	0,1691 $\pm 0,036$
	Peak II	31,75 $\pm 2,52$	40,19 $\pm 1,16$	41,64 $\pm 1,12$
$\text{Na}_2\text{Ca}\ddot{\text{A}}\text{DTA-}$ ^{14}C -äthylen	ungereinigt	0,0449 $\pm 0,0048$	0,0861 $\pm 0,0173$	0,138 $\pm 0,048$
	Peak- maximum	0,0193 $\pm 0,0009$	0,0376 $\pm 0,0017$	0,0579 $\pm 0,0029$
$\text{Na}_3\text{CaDTPA-}$ ^{14}C -(Geigy)	ungereinigt	1,613 $\pm 0,103$	1,854 $\pm 0,083$	1,933 $\pm 0,082$
	Peak I	0,0338 $\pm 0,0035$	0,0727 $\pm 0,0062$	0,1223 $\pm 0,0192$
	Peak II	14,25 $\pm 1,31$	19,28 $\pm 1,88$	21,64 $\pm 2,18$
$\text{Na}_3\text{CaDTPA-}$ ^{14}C -(Schweer)	ungereinigt	0,0985 $\pm 0,0163$	0,1703 $\pm 0,0127$	0,1954 $\pm 0,0144$
	Peak- maximum	0,0337 $\pm 0,0048$	0,0839 $\pm 0,0026$	0,1135 $\pm 0,0055$

12. Abbildungen

Abbildung 1

Autoradiogramm eines Papierchromatogramms.

Papier: Whatman No. 1

Laufmittel: Isopropanol:HCl 0,2 N (1:1 V/V)

Temperatur: 22 °C

Zeit: 10 h, absteigend

Substanzen: je 6 µl aufgetragen

1. Lösung mit ungereinigter ÄDTA-2-¹⁴C

Na₂CaÄDTA-2-¹⁴C 200 µmol/ml, 4 µCi/ml

2. Lösung mit gereinigter ÄDTA-2-¹⁴C

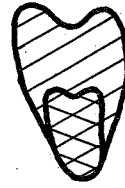
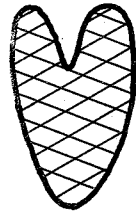
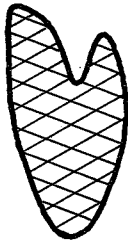
Na₂CaÄDTA-2-¹⁴C 200 µmol/ml, 4 µCi/ml

3. Lösung mit ÄDTA und abgetrennter Verunreinigung

Na₂CaÄDTA 200 µmol/ml als Träger

\\ radioaktiv

/// mit Sprühreagenz anfärbbar



1

2

3

Abbildung 2

Apparatur zum Nachweis des enzymatischen Abbaus der
Chelatbildner in vitro.

1. Reaktionsgefäß
2. Sicherheitsflasche
3. Trockenrohr mit Kieselgel
4. Absorptionsgefäß
5. Verbindungsstück aus Gummi
6. Wasserbad 30 °C

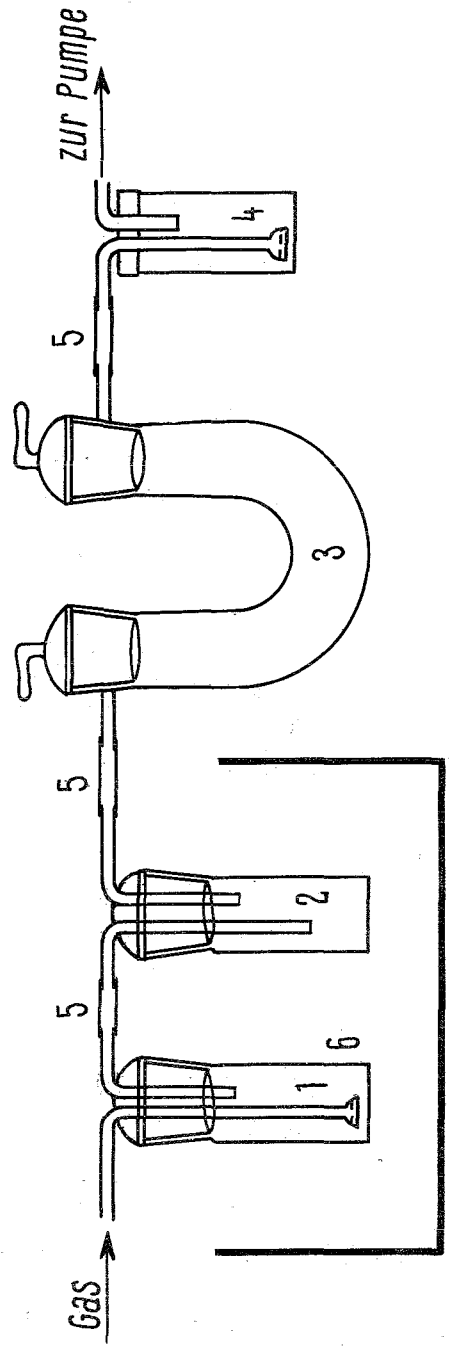


Abbildung 3, 4 und 5

Abhängigkeit der umgesetzten Substratmenge von der Substratkonzentration. Die unterschiedlichen Ordinatenabschnitte in den Abbildungen 4 und 5 beruhen auf der biologischen Variabilität der jeweiligen Versuchstiere. Die vertikalen Linien bezeichnen die Spannweiten.

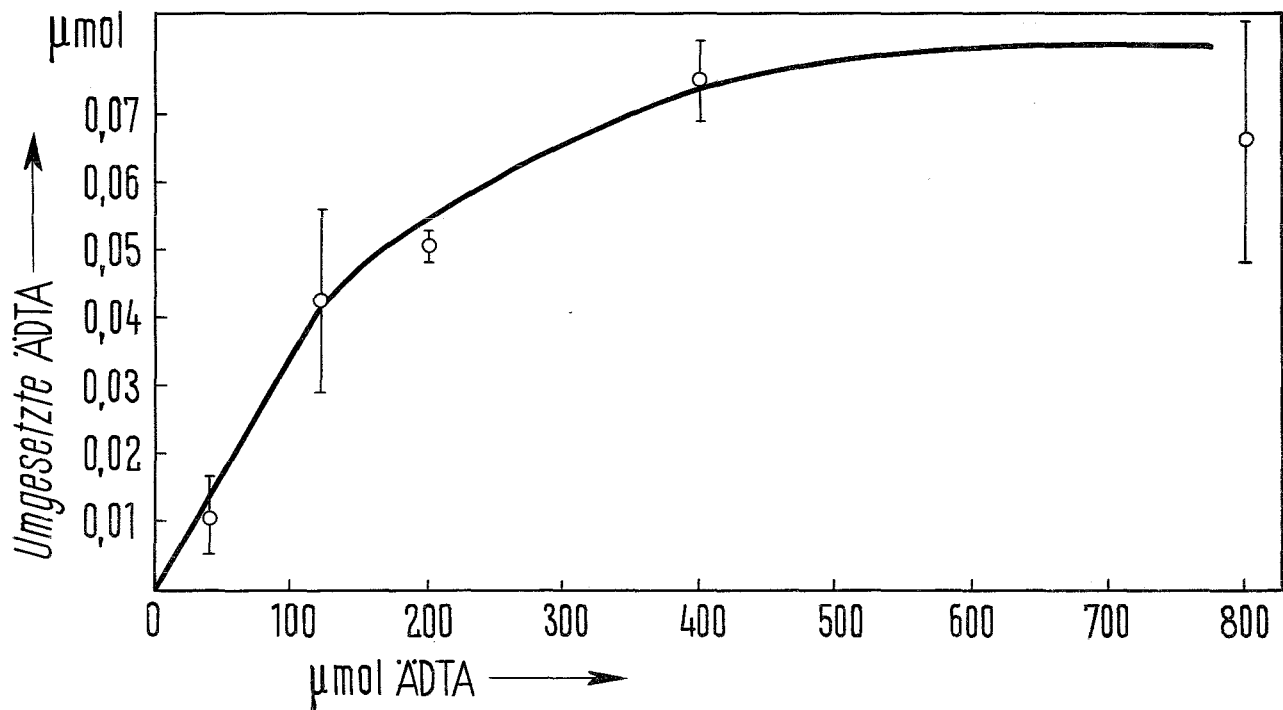
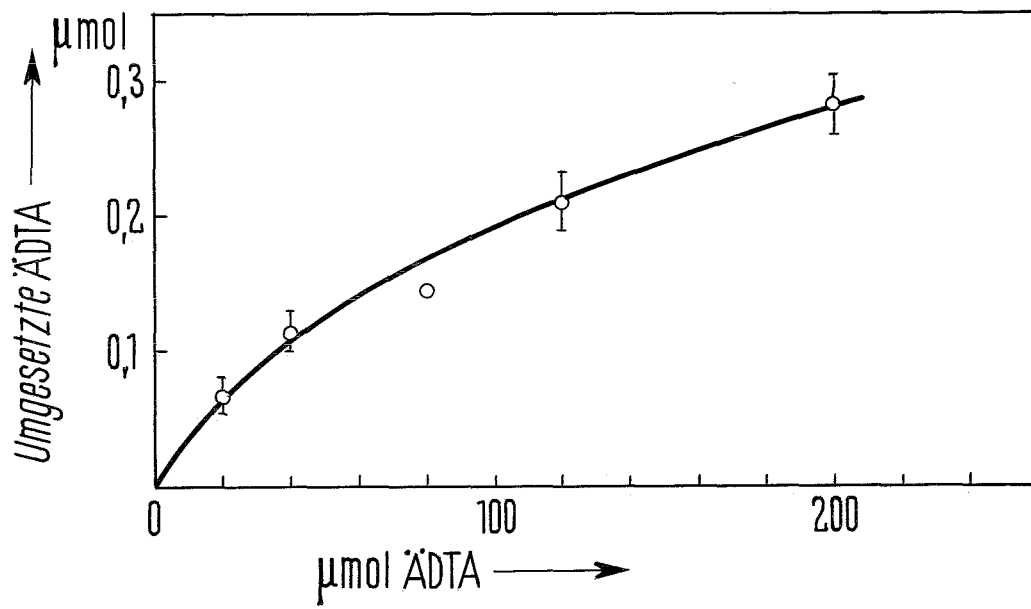
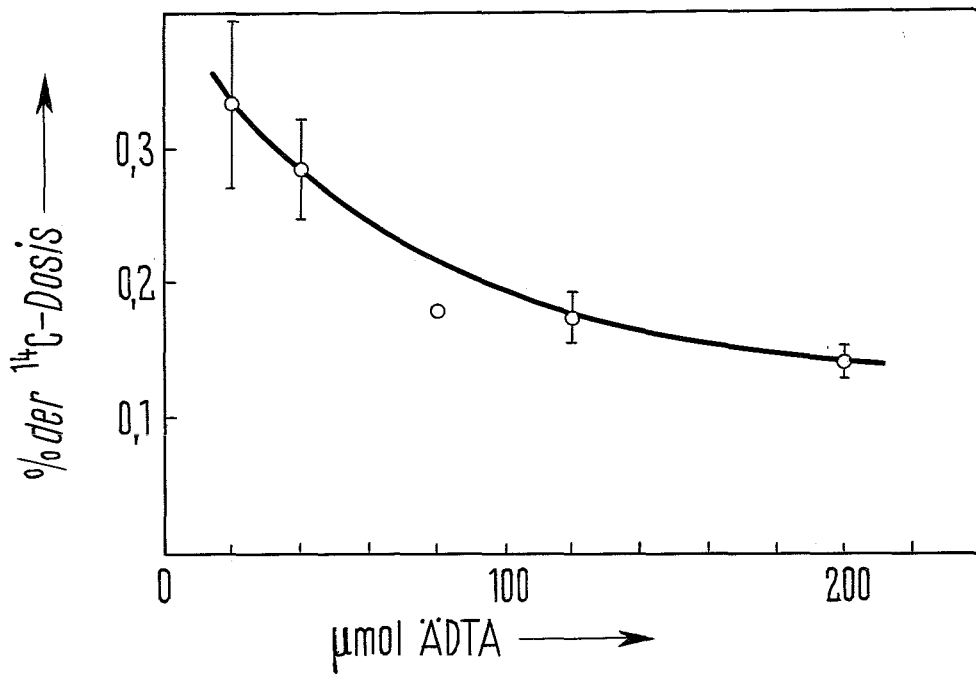


Abbildung 6

Gefundene $^{14}\text{CO}_2$ -Aktivität in Abhängigkeit von der
zugefügten Homogenatmenge (in Zerfällen pro Minute).

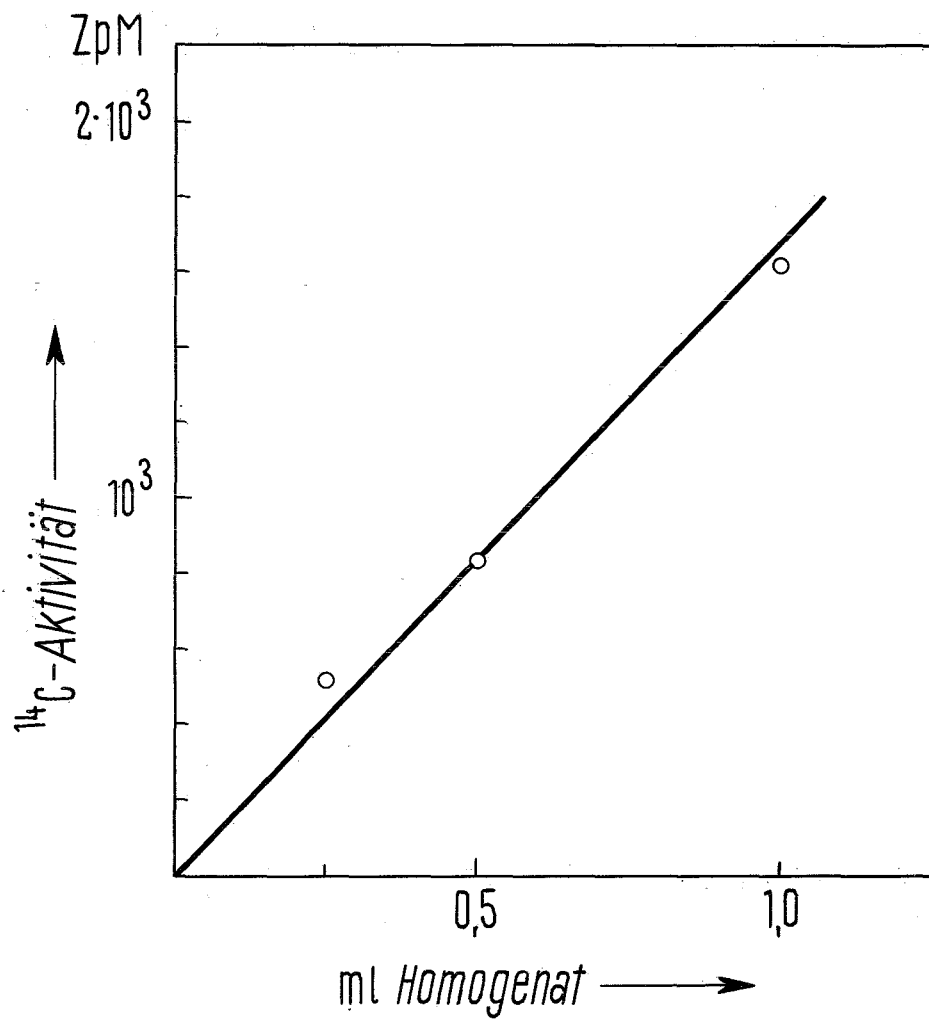


Abbildung 7

pH-Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion. Die Reaktion wurde mit Nierenhomogenaten von zwei verschiedenen Ratten durchgeführt.

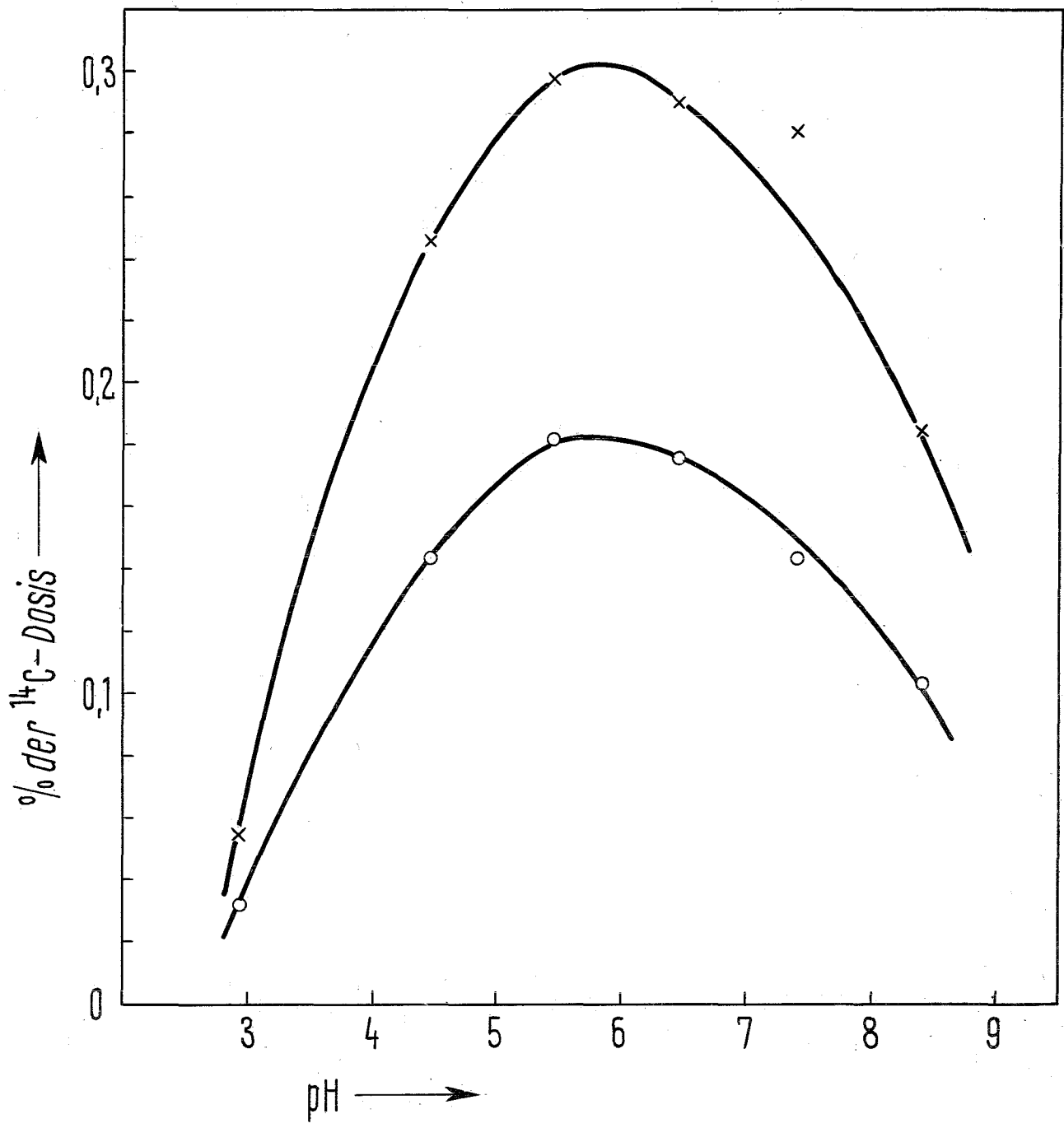


Abbildung 8

Zeitabhängigkeit der enzymatischen Veratmung.
Die vertikalen Linien bezeichnen die Spannweiten.

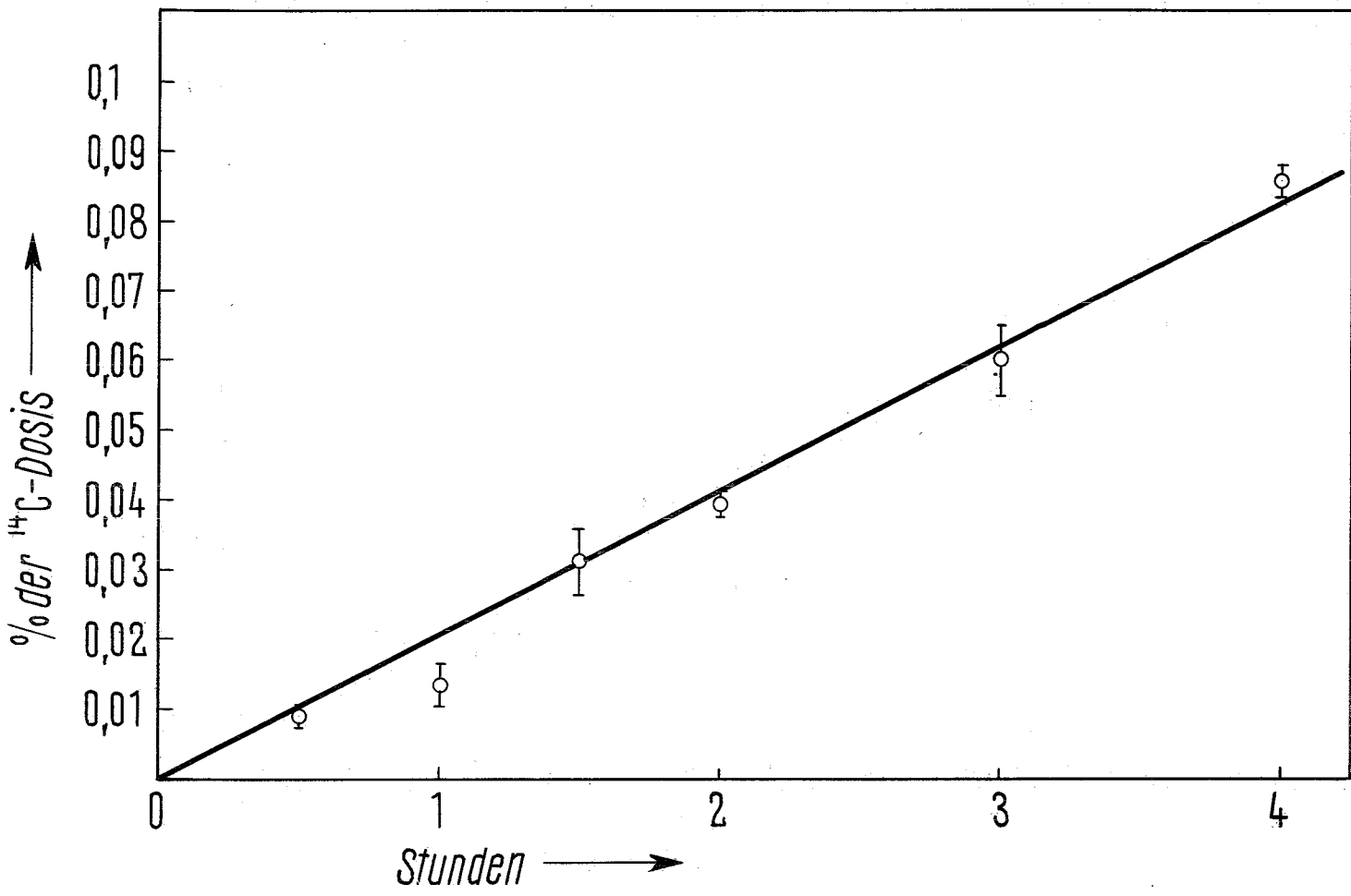


Abbildung 9

Einfluß der Bebrütungstemperatur auf die enzymatische Veratmung. Die vertikalen Linien bezeichnen die Spannweiten.

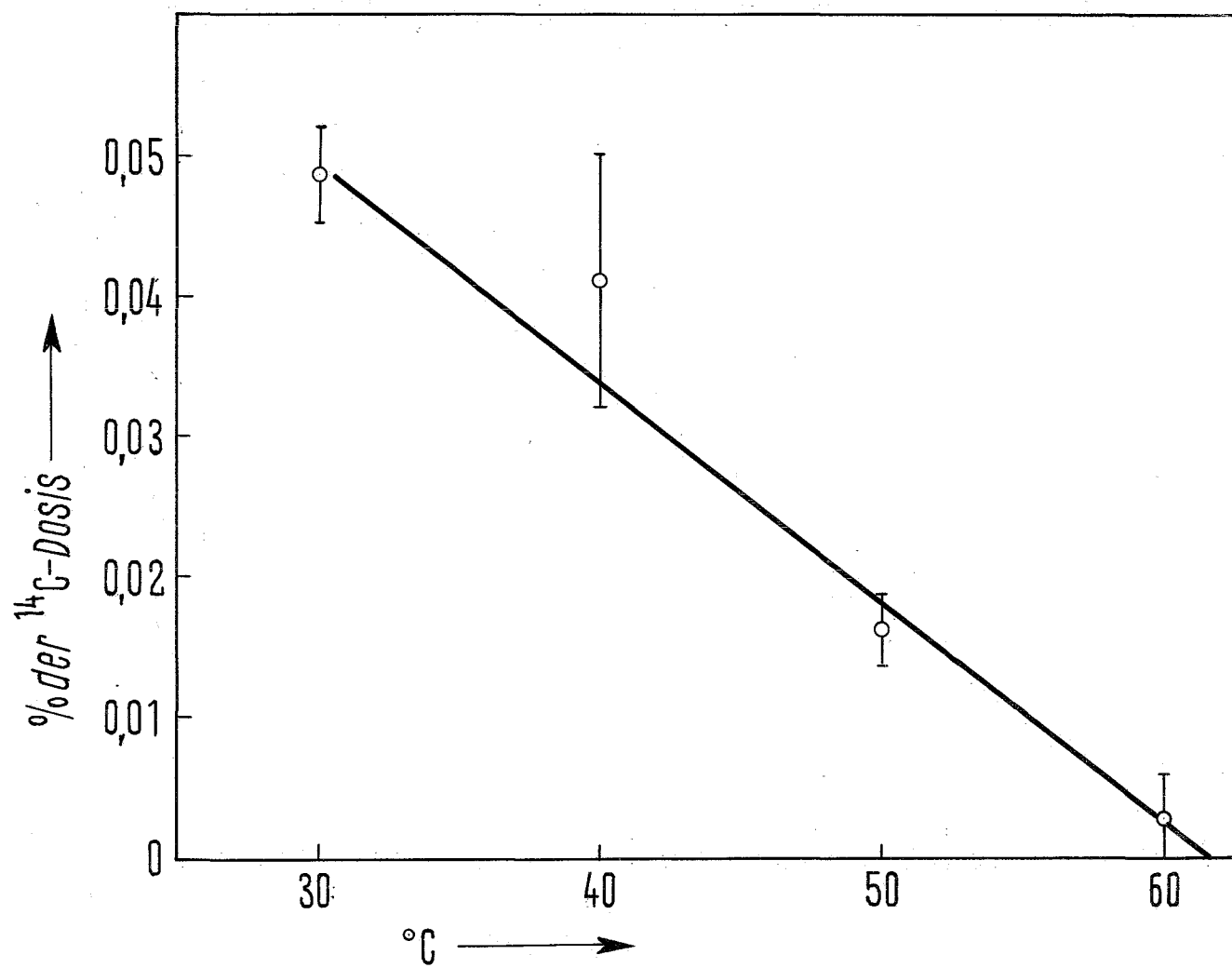


Abbildung 10

Verteilung der eluierten Aktivität auf die einzelnen Fraktionen nach einer Gelfiltration von $\text{Na}_2\text{CaÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ über Sephadex G 10. Betthöhe 44 cm, Durchmesser 1,1 cm, Fraktionsgröße 1,8 ml.

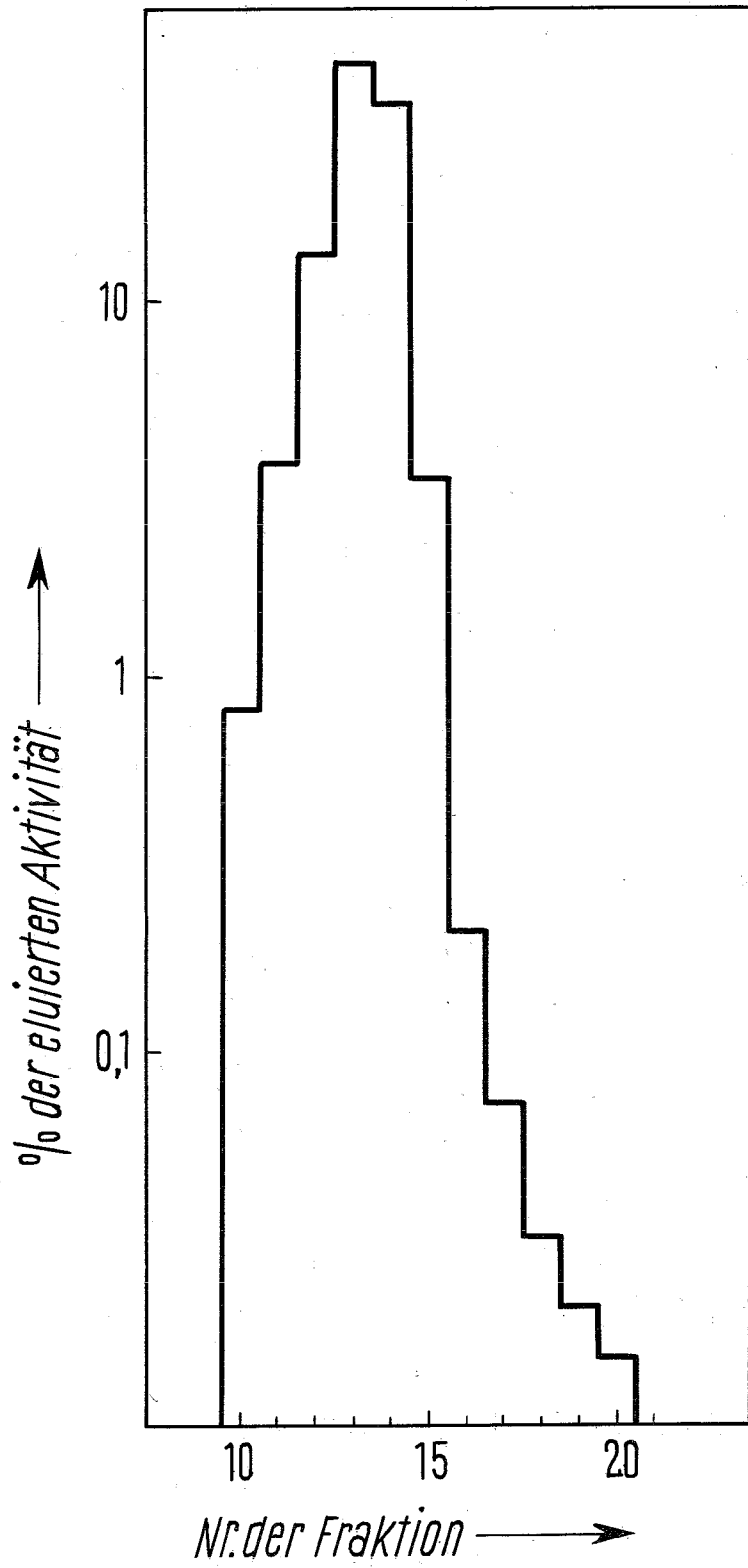


Abbildung 11

Verteilung der eluierten Aktivität auf die einzelnen Fraktionen nach einer Gelfiltration von $\text{Na}_4\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ über Sephadex G 10. Betthöhe 143 cm, Durchmesser 1,4 cm, Fraktionsgröße 1,8 ml.

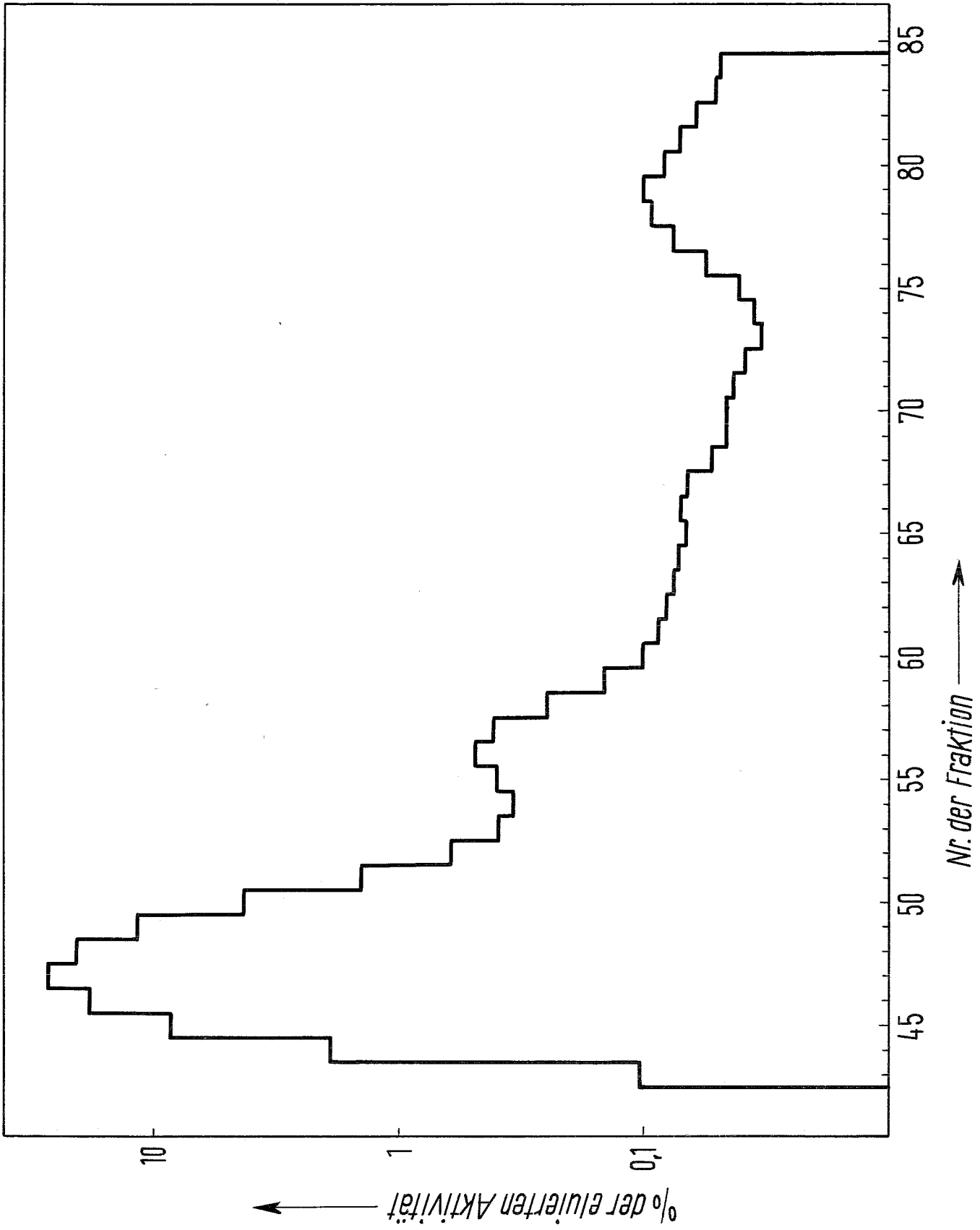


Abbildung 12

Verteilung der eluierten Aktivität auf die einzelnen Fraktionen nach einer Gelfiltration von $\text{Na}_4\text{ÄDTA-1-}^{14}\text{C}$ über Sephadex G 10. Betthöhe 143 cm, Durchmesser 1,4 cm, Fraktionsgröße 1,8 ml.

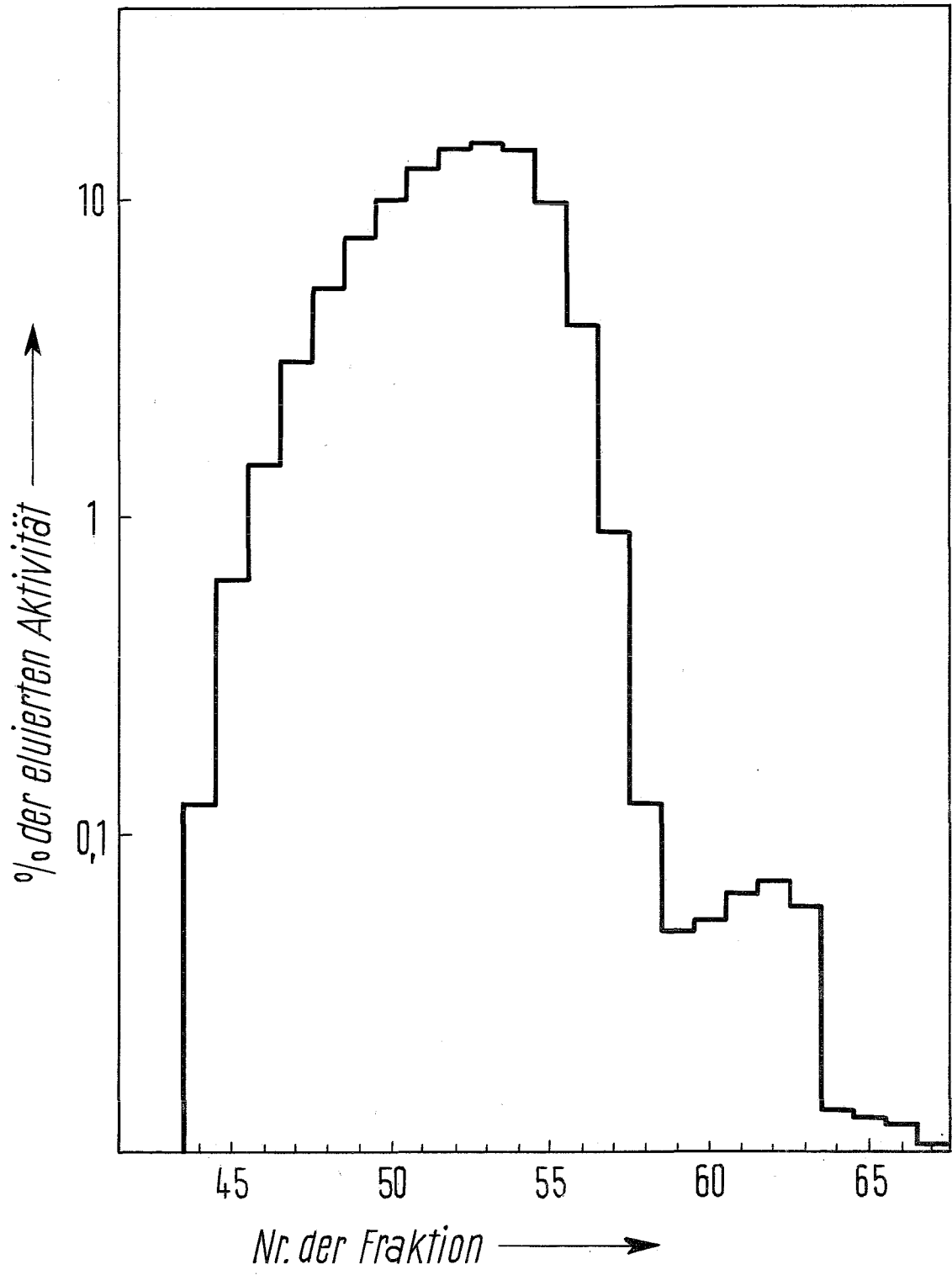


Abbildung 13

Verteilung der eluierten Aktivität auf die einzelnen Fraktionen nach einer Gelfiltration von $\text{Na}_3\text{CaDTPA-1-}^{14}\text{C}$ (Geigy) über Sephadex G 10. Betthöhe 143 cm, Durchmesser 1,4 cm, Fraktionsgröße 1,8 ml.

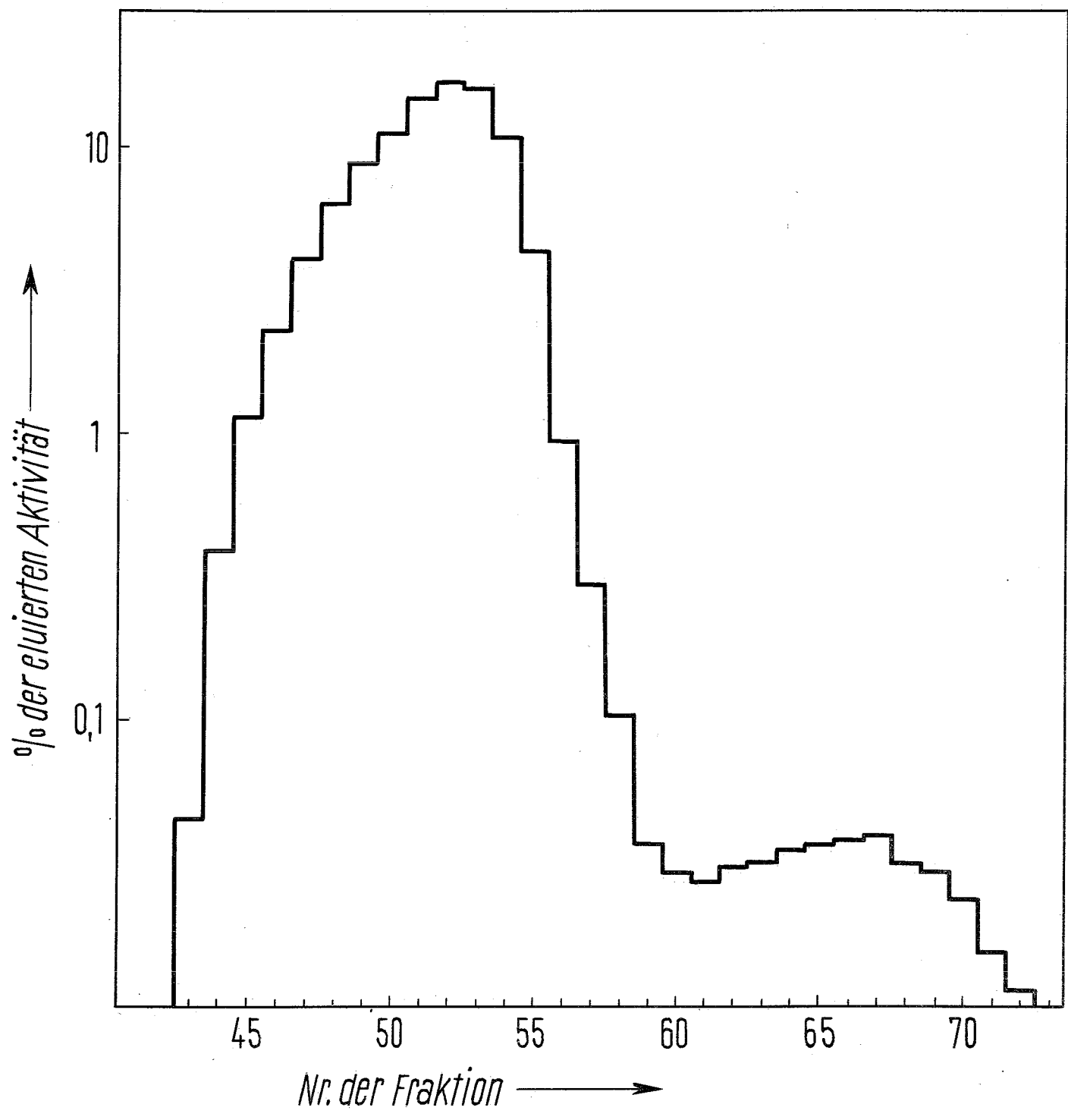


Abbildung 14

Verteilung der eluierten Aktivität auf die einzelnen Fraktionen nach einer Gelfiltration von $\text{Na}_4\text{ÄDTA-äthylen-}^{14}\text{C}$ über Sephadex G 10. Betthöhe 143 cm, Durchmesser 1,4 cm, Fraktionsgröße 1,8 ml.

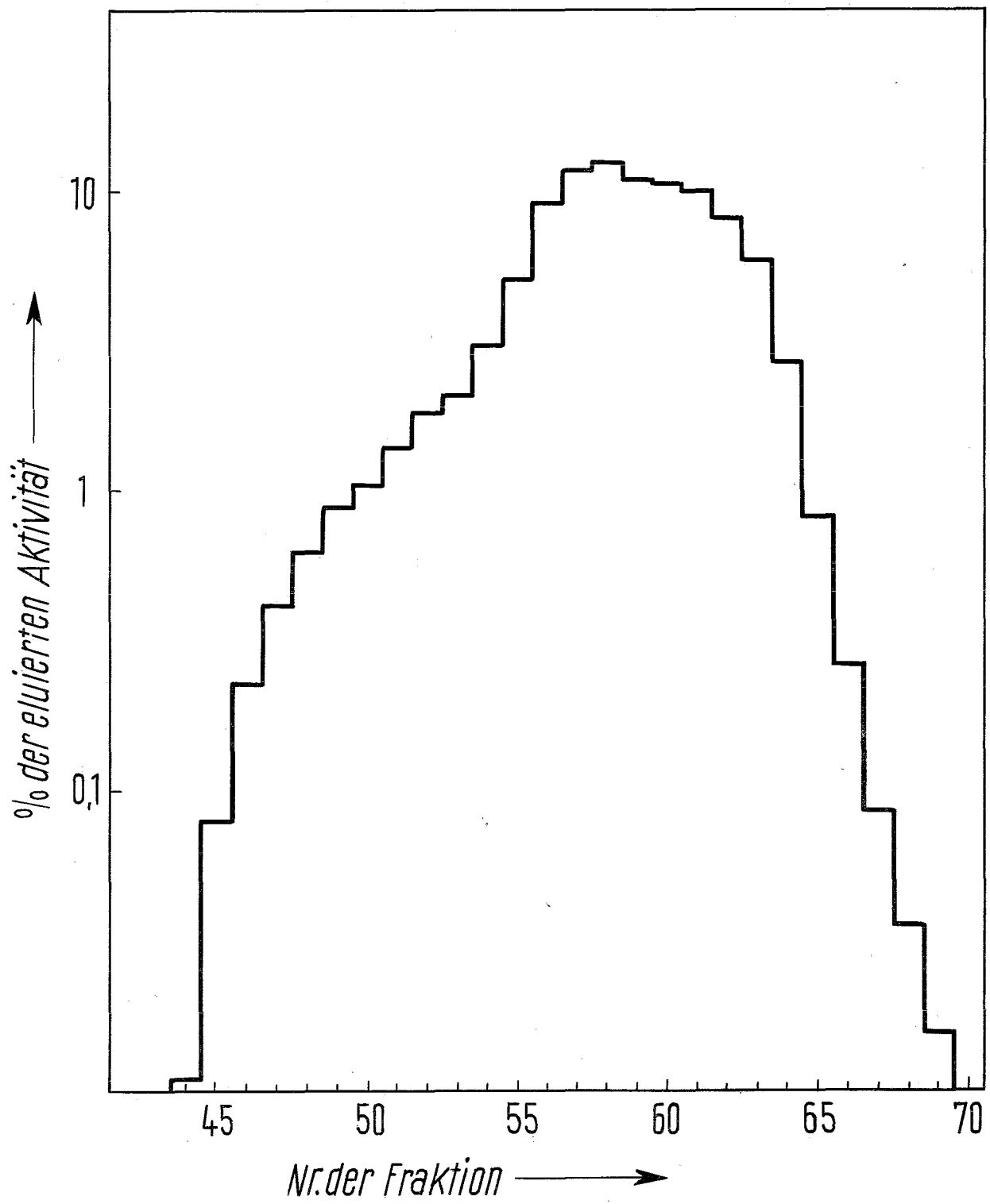


Abbildung 15

Verteilung der eluierten Aktivität auf die einzelnen Fraktionen nach einer Gelfiltration von $\text{Na}_5\text{DTPA-1-}^{14}\text{C}$ (Schweer) über Sephadex G 10. Betthöhe 143 cm, Durchmesser 1,4 cm, Fraktionsgröße 1,8 ml.

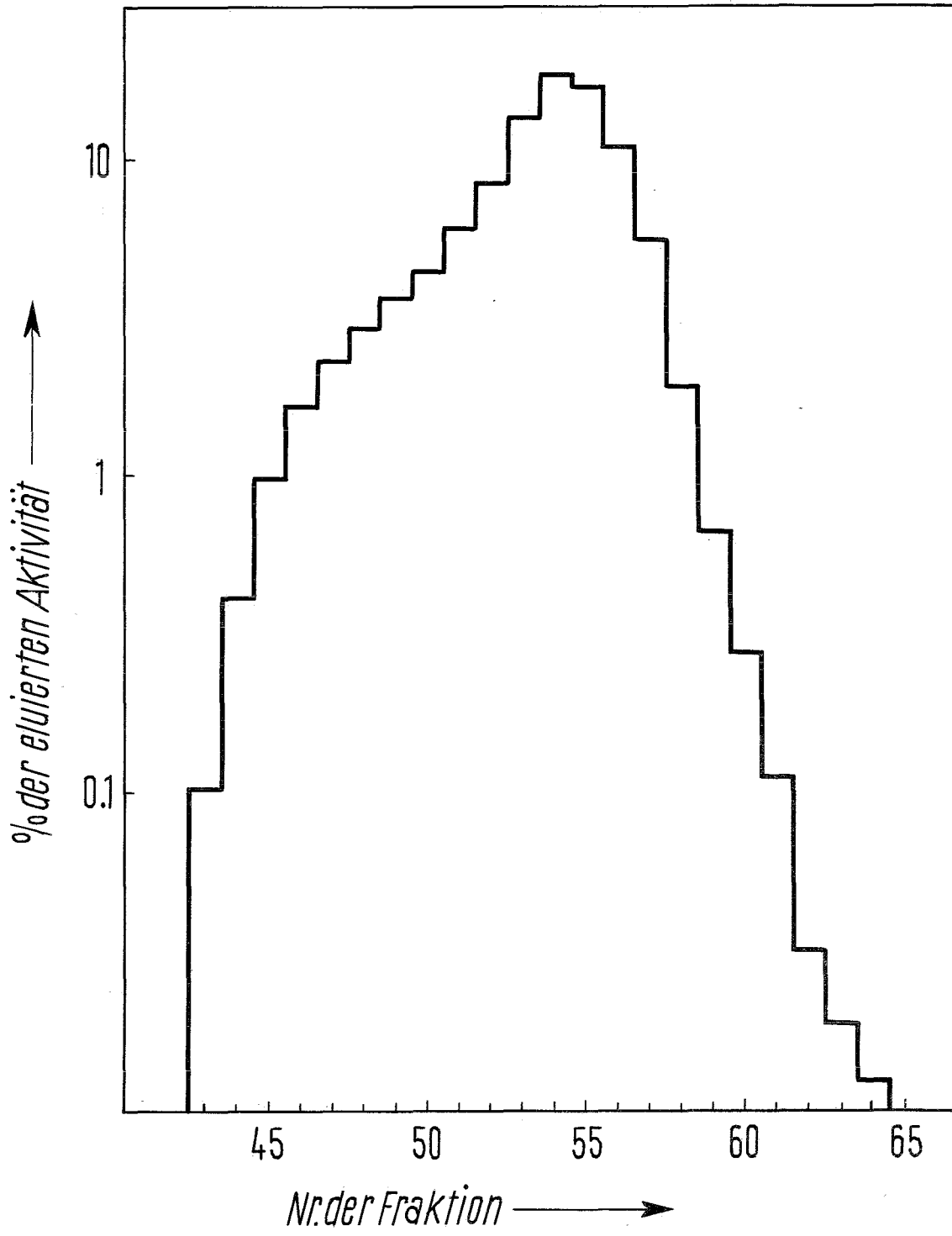


Abbildung 16

Apparatur zur Bestimmung der ausgeatmeten $^{14}\text{CO}_2$ -Menge nach Havlíček et al.

1. Exsikkator mit Drahtnetz, auf dem sich eine Ratte über Kieselgel befindet.
2. Trockenflasche mit Kieselgel zur Entwässerung der Expirationsluft.
3. Waschflasche mit Methanol zur Sättigung der Luft.
4. Absorptionsgefäße
5. Verbindungsstücke aus Gummi- bzw. PVC-Schlauch.

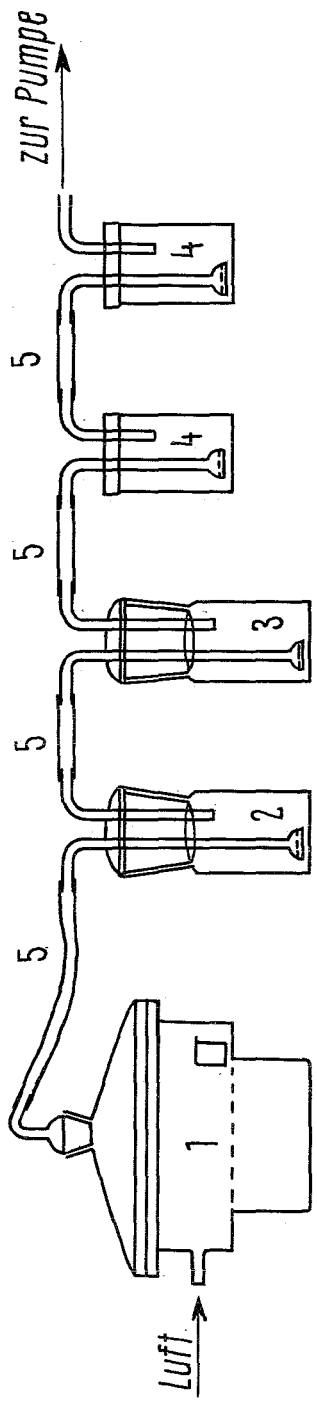


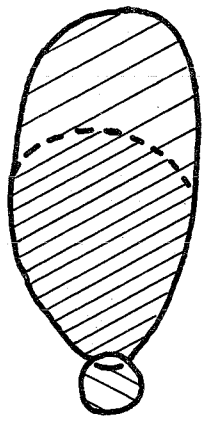
Abbildung 17

Hochspannungselektropherogramm von Injektionslösungen.

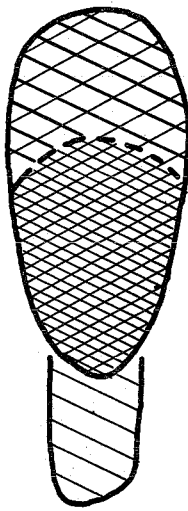
1. Von ÄDTA-2-¹⁴C abgetrennte Verunreinigung
2. Gereinigte ÄDTA-2-¹⁴C
3. Ungereinigte ÄDTA-2-¹⁴C, je 6 µl aufgetragen

\\ radioaktiv

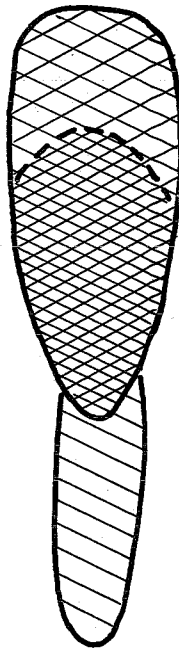
/// mit Sprühreagenz anfärbbar



•
1



•
2



•
3

Abbildung 18

Veratmung von gereinigter und ungereinigter ÄDTA-äthylen- ^{14}C und DTPA- ^{14}C -Schweer in vivo. Einfache Standardfehler der Mittelwerte.

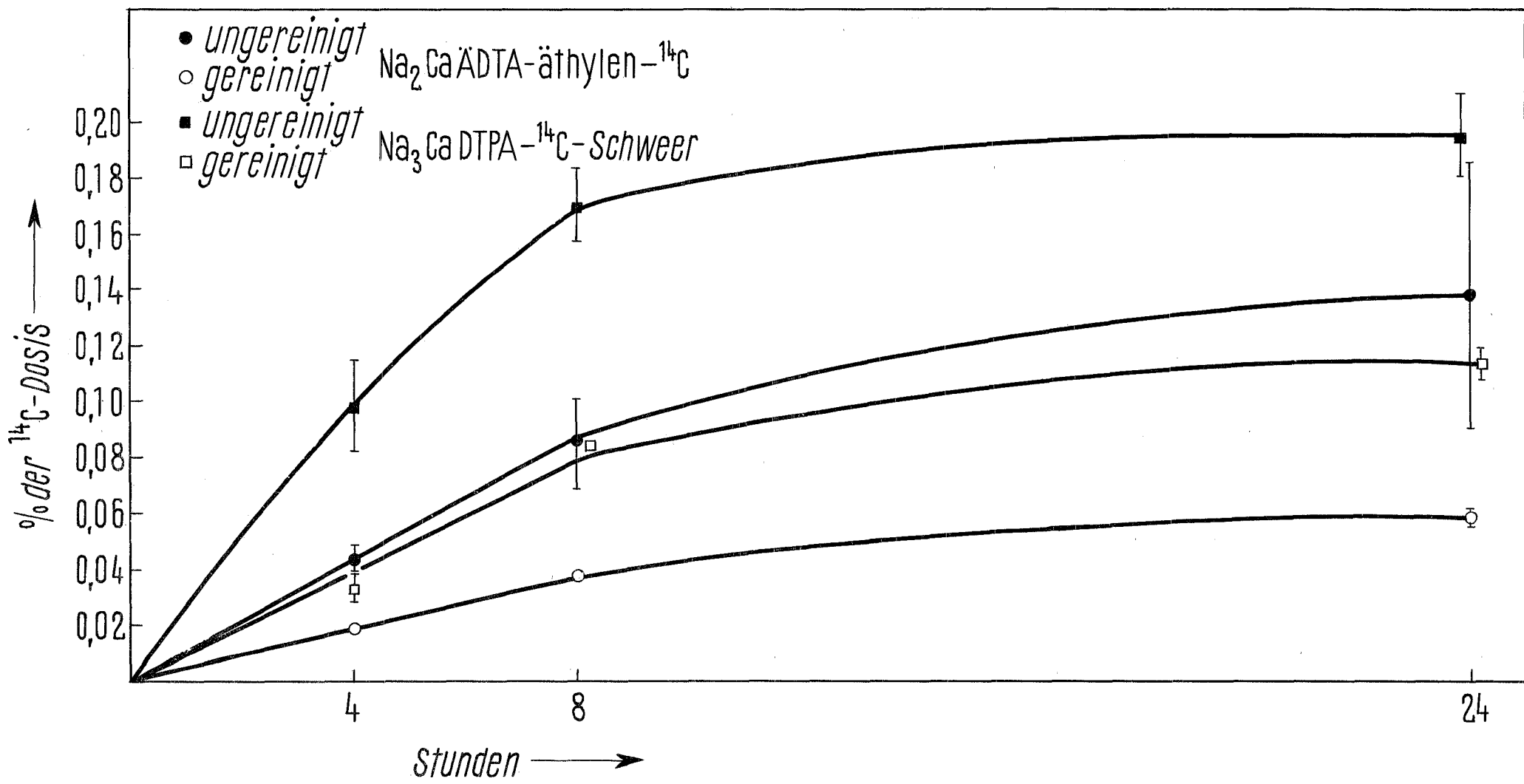


Abbildung 19

Veratmung gereinigter $\text{ÄDTA-1-}^{14}\text{C}$, $\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$ und $\text{DTPA-}^{14}\text{C}$ -Geigy in vivo. Einfache Standardfehler der Mittelwerte.

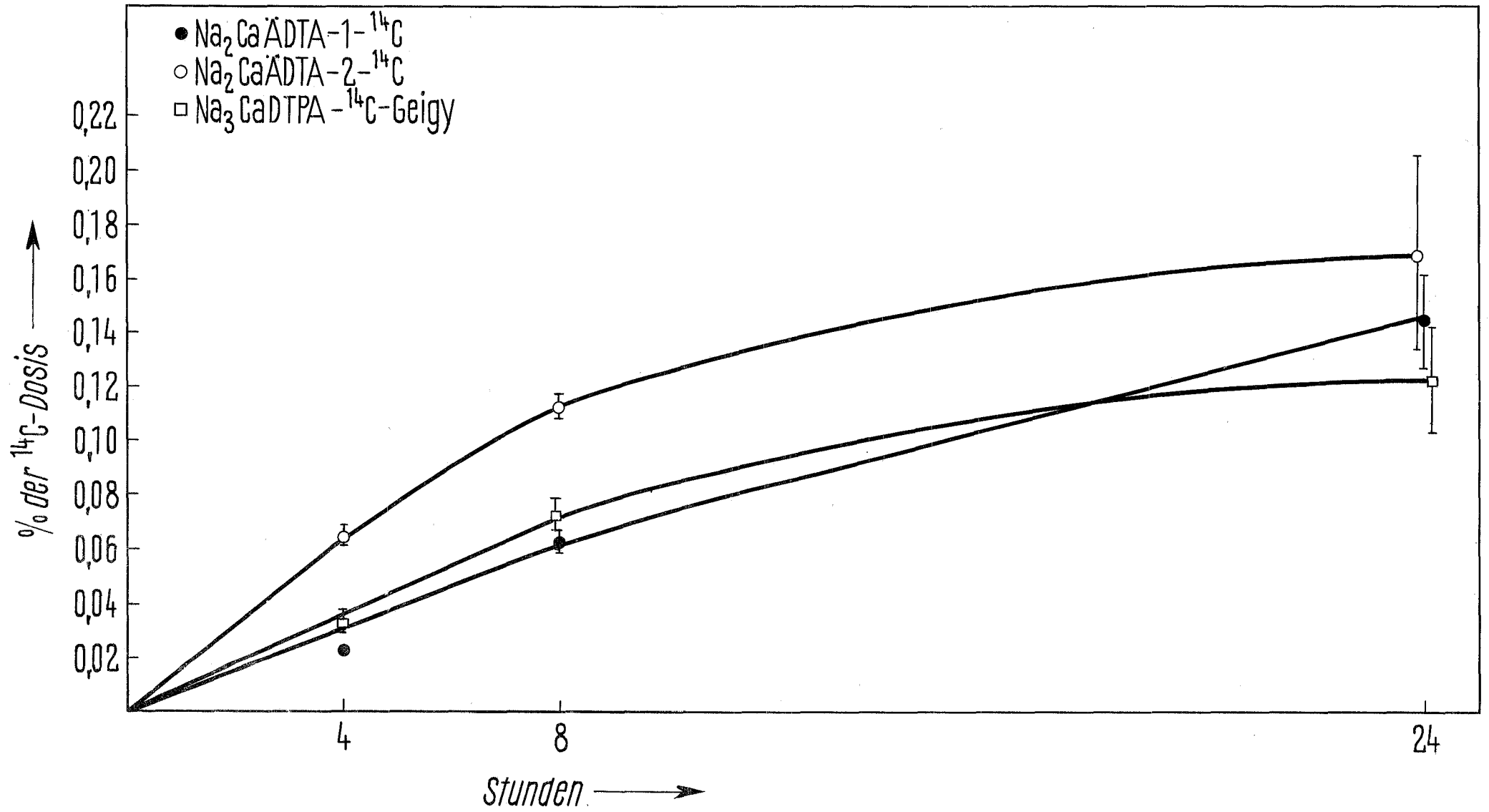


Abbildung 20

Veratmung ungereinigter ÄDTA-1-¹⁴C, ÄDTA-2-¹⁴C und DTPA-¹⁴C-Geigy in vivo. Einfache Standardfehler der Mittelwerte.

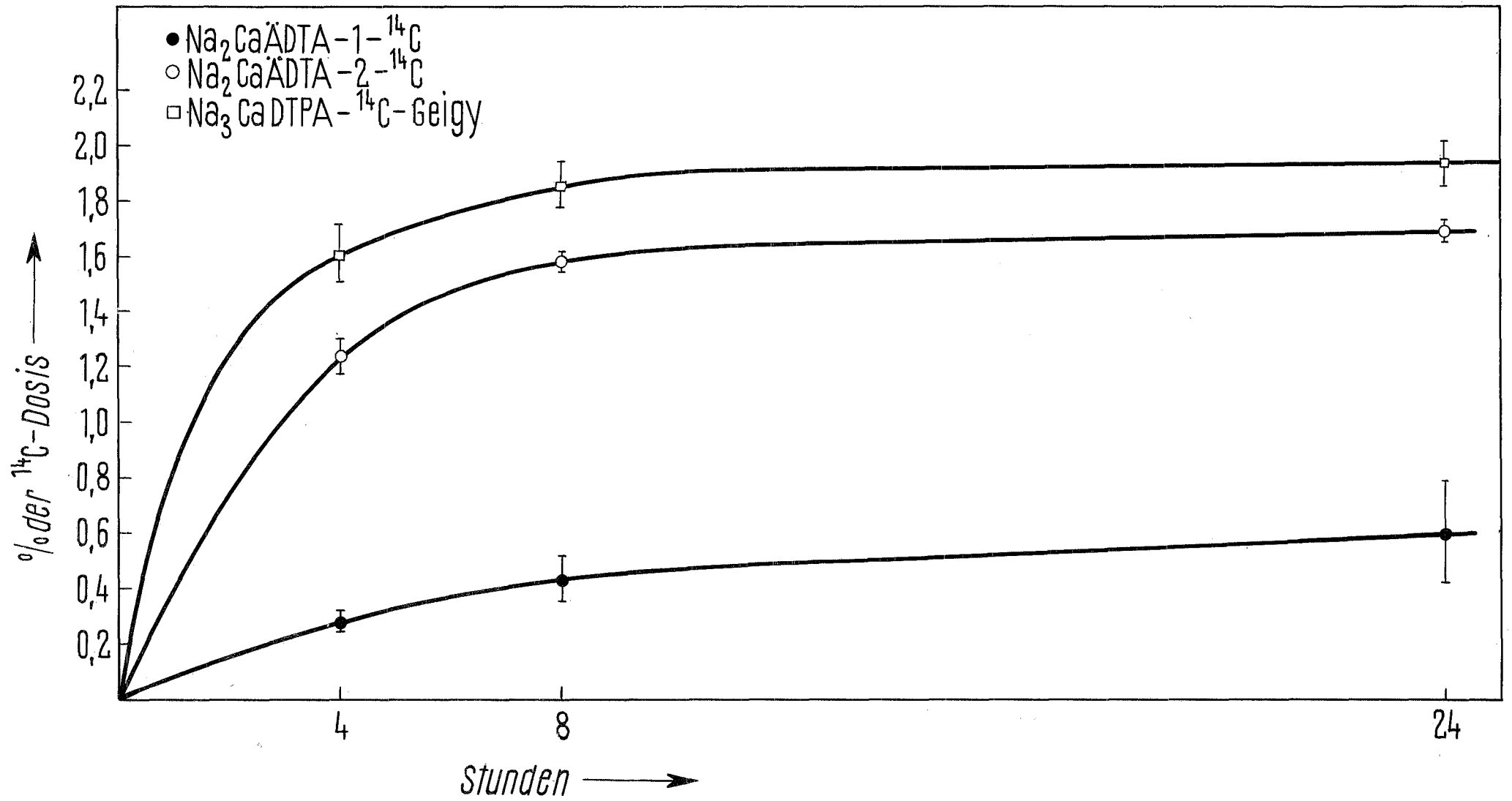


Abbildung 21

Veratmung der abgetrennten Verunreinigungen von $\text{ADTA-1-}^{14}\text{C}$, $\text{ADTA-2-}^{14}\text{C}$ und $\text{DTPA-}^{14}\text{C}$ -Geigy in vivo. Einfache Standardfehler der Mittelwerte.

