Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie sind wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

[1] G. KOTHE, E. OHMES, J. BRICKMANN u. H. ZIMMERMANN, Angew. Chem. **83**, 1015 [1971].
[2] W. SCHLENK u. M. BRAUNS, Ber. dtsch. chem. Ges. **48**, 725 [1915].
[3] E. MÜLLER u. I. MÜLLER-RODLOFF, Liebigs Ann. Chem. **517**, 134 [1935].
[4] Bei der Aufnahme des in Abb. 2 wiedergegebenen Spektrums einer von +60 °C abgeschreckten toluolischen Lösung von **1** wurde die Modulationsamplitude so gewählt, daß neben den Triplett-Signalen auch die HF-Struktur des H_0-Signals sichtbar ist.
[5] R. SCHMIDT u. H.-D. BRAUER, Angew. Chem. **83**, 498 [1971]; Angew. Chem. internat. Edit. **10**, 506 [1971].
[6] K. HALBACH, Phys. Rev. **119**, 1230 [1960].
[7] Bezüglich der gewählten Bezeichnung M_X siehe nächstes Kapitel.
[8] K. ZIEGLER u. L. EWALD, Liebigs Ann. Chem. **473**, 163 [1929].
[9] Bisher ist es nicht gelungen, die HF-Struktur des H_0-Signals zu analysieren.
[10] K. SCHEFFLER u. H. B. STEGMANN, Elektronenspinresonanz, S. 231, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1970.
[11] H. LANGKAMP, W. TH. NAUTA u. C. MACLEAN,, Tetrahedron Letters [London] **1968**, 249.
[12] H. A. STAAB, H. BRETSCHNEIDER u. H. BRUNNER, Chem. Ber. **103**, 1101 [1970].
[13] R. KUHN u. H. TRISCHMANN, Mh. Chem. **97**, 525 [1966].
[14] J. STAAB u. H. L. SCHLÄFER, Z. physik. Chem. N.F. **50**, 200 [1966].

Liganden- und Isotopenaustausch im System: Serumproteine — Zink — Polyaminopolycarbonsäuren

Ligand and Isotope Exchange in the System: Serum Proteins – Zinc – Polyaminopolycarbonic Acids

G. SEGEWITZ

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, D-7500 Karlsruhe 1, Postfach 3640

(Z. Naturforsch. **27 b**, 1370—1375 [1972]; eingegangen am 14. Juli 1972)

Zinc, Radiozinc, Proteins, Ethylenediaminetetraacetate, Diethylenetriaminepentaacetate

In vitro-studies show that the Ca-chelates of EDTA and DTPA are equally effective in removing Zn from the proteins and that the Zn-protein pool is composed of several fractions with different stabilities. Only a small fraction of the protein-bound Zn can be labelled by ^{65}Zn in vitro and, as to the mobilization of ^{65}Zn, Ca-DTPA was found to be 20 times more effective than equimolar Ca-EDTA. The isotope exchange between Zn-DTPA and protein-bound ^{65}Zn is an extremely fast reaction whereas in the case of Zn-EDTA a sluggish exchange takes place. The analysis of the results led to conclusion that the ligand and isotope exchange reactions in the case of EDTA proceed via the free Zn^{2+}-ion; with the high-dentate DTPA, however, the formation of ternary and mixed complexes plays an important role. The implications of the findings as related to the toxicity of the Ca-chelates are discussed.

Die Ca-Chelate bestimmter synthetischer Polyaminopolycarbonsäuren, Äthylendiamintetraacetat (ÄDTA) und insbesondere Diäthylentriaminpentaacetat (DTPA), haben sich im Verlauf der letzten Jahre als Antidote der Wahl bei Vergiftungen mit stabilen und radioaktiven Metallionen erwiesen (Literatur bei 1). Um therapeutisch befriedigende Resultate zu erzielen, müssen in der Regel höhere Dosen über längere Zeitspannen verabreicht werden. In diesem Falle haben sich jedoch beim Menschen und bei Versuchstieren toxische Nebenwirkungen gezeigt. Es liegt nahe, die Toxizität auf die Bindung essentieller Spurenmetalle zurückzuführen. Unter dem Einfluß der Ca-Chelate kommt es zu einer deutlich positiven Zn-Bilanz, während die Ausscheidung anderer Spurenmetalle in wesentlich geringerem Maße intensiviert wird (Literatur bei 1 – 3). Für die pathogenetische Relevanz der Zn-Bindung spricht weiterhin, daß das im Vergleich zu Ca-DTPA stabilere Zn-Chelat des DTPA eine stark herabgesetzte Toxizität aufweist [4–9].

Die Hypothese, daß die Toxizität auf einer Mobilisierung von Zn beruht, stößt bei einer quantitativen

Sonderdruckanforderungen an Dr. G. SEGEWITZ, Kernforschungszentrum Karlsruhe, Institut für Strahlenbiologie, *D-7500 Karlsruhe 1*, Postfach 3640.

Überprüfung jedoch auf gewisse Komplikationen: Die Stabilitätskonstante des Zn-Chelats von ÄDTA beträgt $10^{16,26}$, die des DTPA $10^{18,40}$, während die der Ca-Chelate des ÄDTA und DTPA mit den Werten von $10^{10,85}$ bzw. $10^{10,89}$ praktisch identisch sind [10, 11]. Die sog. Effektivitätskonstante [1], in der die im biologischen Milieu konkurrierenden Ca^{2+}- und H^+-Ionen berücksichtigt werden, ist für Zn-DTPA rund 90-mal größer als die des Zn-ÄDTA, und es sollte demzufolge auch eine entsprechend höhere Effektivität des DTPA erwartet werden. Tatsächlich ist jedoch DTPA, was die Intensivierung der Zn-Ausscheidung betrifft, nur 20-mal wirksamer als ÄDTA und bezüglich der Toxizität nur 2-mal wirksamer [6]. Überraschend ist schließlich, daß bei Verabfolgung von ^{65}Zn-DTPA wesentlich mehr ^{65}Zn reteniert wird als im Falle von ^{65}Zn-ÄDTA [12, 13].

In der vorliegenden Arbeit sollten die Ursachen für die erwähnten Diskrepanzen durch in vitro-Untersuchungen im Blutserum abgeklärt werden. Das Serum ist für unsere Fragestellung besonders geeignet, weil die Chelate sich praktisch ausschließlich im extrazellulären Wasser verteilen und somit ihre Wechselwirkung mit dem durch die Serumproteine gebundenen Zn die primäre Reaktion sein sollte.

Methodik

Es wurde lipoidarmes Humanserum verwendet, das bis zu seiner Verwendung bei -10 °C gelagert wurde. In einem speziellen Versuch verwendeten wir Cohnsche Fraktionen, und zwar Albumin (krist., reinst 98%), α-Globulin (lyophil., rein $>95\%$), β-Globulin (lyophil., rein $>95\%$) und γ-Globulin (lyophil., rein $>98\%$). Die Fraktionen (Serva) wurden in 1-proz. ultrareiner NaCl gelöst.

Die Chelate wurden durch entsprechende Ansätze von Na_2H_2ÄDTA, H_5DTPA (Fluka), NaOH, $CaCl_2$ bzw. ZnO hergestellt, wobei alle Chemikalien den p.a.-Reinheitsgrad hatten. Die Lösungen der Chelate stellten wir mit 1 bzw. 0,1 N NaOH oder HCl auf den pH-Wert des Serums 7,4 ein. Durch komplexometrische Titration prüften wir die Lösungen auf Äquivalenz von Metall und Chelatbildner.

Die Stammlösung des trägerfreien $^{65}ZnCl_2$, 1 mCi in 0,1 M HCl (The Radiochemical Centre, Amersham) wurde mit tridestilliertem Wasser verdünnt und mit HCl auf einen pH-Wert von 3 – 4 eingestellt.

Die Bestimmung des stabilen Zn im Serum erfolgte mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrophotometrie, die durch andere Kationen oder Anionen nicht gestört wird. Die Untersuchungen wurden mit einem Absorptionsspektrophotometer und einer Zinkhohlkathodenlampe (FL 175 C 24b) von Hilger & Watts durchgeführt und die Absorptionswerte der Eich- und Probelösungen mit einem an die Meßvorrichtung angeschlossenen Schreiber (Honeywell) registriert. Die Erfassungsgrenze beträgt 0,02 μg Zn·ml^{-1}. Als optimal wurde folgende Einstellung der Apparatur ermittelt: Wellenlänge: 213,9 nm, Stromstärke beim Betrieb der Zinkhohlkathodenlampe: 10 mA, Spaltbreite: 0,3 mm, Verhältnis des Preßluft-Acetylengemisches der Flamme (l·min^{-1}): 9,0 + 3,0 : 1,1. Als Eichlösungen dienten Lösungen mit Konzentrationen von 0,1 bis 1,5 μg Zn·ml^{-1}, die aus metallurgisch sauberem Zn-Pulver (Merck) und 6 N HCl (ultrarein) hergestellt und mit 1-proz. Na_2H_2ÄDTA-Lösung verdünnt wurden.

Die Bestimmung der ^{65}Zn-Aktivität der Proben erfolgte mit Hilfe eines NaJ(Tl)-Bohrlochkristalls und eines γ-Spektrometers (Baird Atomic, Modell 707) im 1,11 MeV-Peak.

Die Trennung der Serumproteine von den Chelaten erfolgte mittels der Gel-Filtration über Sephadex G-25 fine; als Elutionspuffer diente 0,2 M Tris/HCl in 1 M NaCl (pH 7,4; $\mu = 0{,}01$). Die Dimension der Säule betrug 70 × 2,4 cm, das Gelvolumen 450 ml, die Elutionsgeschwindigkeit 90 ml·h^{-1}, die Fraktionsgröße 1,8 – 2,0 ml.

Ergebnisse

Die erste Versuchsreihe prüfte die Wirksamkeit verschiedener Konzentrationen der Ca-Chelate bezüglich der Mobilisation von *stabilem* Zn. Die Versuchsanordnung war folgende: 2 ml Humanserum und Chelatlösung wurden bei Zimmertemperatur gemischt und nach 5 Min. säulenchromatographisch aufgetrennt. Der Zn-Gehalt des in dieser Versuchsreihe verwendeten Serums betrug $(1{,}52 \pm 0{,}06)$ μg·ml^{-1}. Die Zn-Recovery nach erfolgter Trennung machte im Durchschnitt 98% aus; die von den Serumproteinen gebundene Zn-Menge wurde in % der jeweiligen Recovery ausgedrückt. Die in Abb. 1 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß beide Liganden gleich wirksam sind. In dem Konzentrations-

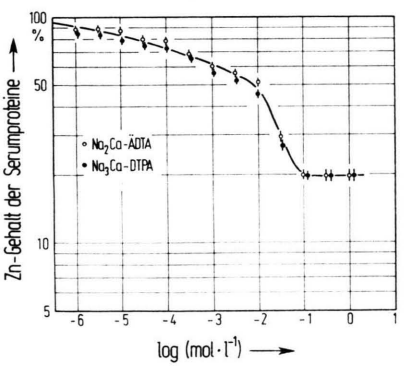

Abb. 1. Abhängigkeit der Mobilisation von stabilem Zn von der Konzentration der Ca-Chelate. Geometrische Mittel von je 6 Einzelwerten und Standardfehler.

bereich $1 \cdot 10^{-6}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ M ist die Effektivität der Chelatbildner sehr gering, zumal rund 10% Zn des Serums so locker gebunden sind, daß sie bei der Auftrennung auch ohne Chelatbildner aus den Proteinen entfernt werden. Dies macht es plausibel, warum die Kurve in Abb. 1 100% nicht erreicht. Weiterhin ist aus der Abb. 1 zu entnehmen, daß eine bestimmte Zn-Fraktion, die rund 20% ausmacht, nicht durch die in hohem Überschuß vorliegenden Chelatbildner mobilisiert werden kann. Wird die Auftrennung nach längerer Inkubation der Ansätze (bis zu 2 Stdn.) vorgenommen, ergibt sich ein gleiches Mobilisationsausmaß wie in Abb. 1; auf die Wiedergabe der entsprechenden Daten wird verzichtet.

Die Ergebnisse des Versuchs legten es nahe, die Mobilisation von stabilem Zn aus den sog. C o h n-schen Fraktionen zu untersuchen. Bei Auftrennung von 1-proz. Lösungen der C o h n schen Fraktionen, die bezüglich der Ca-Chelate 0,1 M waren, verhielten die einzelnen Proteine sich unterschiedlich, indem die Mobilisation aus den β- und γ-Globulinen erheblich größer ist als aus Albumin und α-Globulin (Tab. I).

Tab. I. Zn-Gehalt der C o h n schen Fraktionen vor und nach Einwirkung von Ca-ÄDTA und Ca-DTPA (in % der Ausgangsmenge). Arithmetische Mittel von je 3 Einzelwerten und Standardfehler.

Fraktion	μg Zn · ml^{-1}	Ca-ÄDTA	Ca-DTPA
Albumin	1,17	21,50 ± 0,86	9,16 ± 1,14
α-Globulin	0,38	20,84 ± 1,08	12,26 ± 0,76
β-Globulin	0,12	1,24 ± 0,28	0,92 ± 0,21
γ-Globulin	0,10	0,86 ± 0,16	0,52 ± 0,18

In der nächsten Versuchsreihe wurde die Wirksamkeit verschiedener Konzentrationen der Ca-Chelate bezüglich der Mobilisation von *radioaktivem* ^{65}Zn untersucht. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie im Falle von stabilem Zn, mit der Ausnahme, daß das Serum zuvor mit trägerfreiem ^{65}Zn markiert wurde: 2 ml Serum, dessen Zn-Gehalt (1,48 ± 0,05) μg·ml^{-1} betrug, wurden mit 20 μl einer trägerfreien $^{65}ZnCl_2$-Lösung mit einer Aktivität von 0,8 – 1,0 μCi pro ml Serum versetzt, 15 Min. bei Zimmertemperatur stehengelasssen, anschließend 2 ml Chelatlösung zugegeben und nach einminütigem Umrühren säulenchromatographisch aufgetrennt. Die ^{65}Zn-Recovery nach erfolgter Trennung betrug im Durchschnitt 97,5%. Die im Serum gebundene ^{65}Zn-Menge wurde wiederum in % der jeweiligen Recovery ausgedrückt. Die in Abb. 2 wiedergegebenen

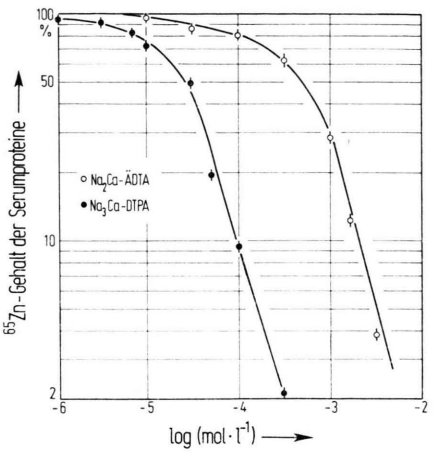

Abb. 2. Abhängigkeit der Mobilisation von ^{65}Zn von der Konzentration der Ca-Chelate. Geometrische Mittel von je 6 Einzelwerten und Standardfehler.

Ergebnisse zeigen im Gegensatz zur Mobilisation von stabilem Zn, daß Ca-DTPA eindeutig wirksamer als Ca-ÄDTA ist und daß im höheren Konzentrationsbereich sich kein Plateau einstellt. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer der Ansätze bis zu 4 Stdn. hatte wiederum keinen Einfluß auf das Ausmaß der ^{65}Zn-Mobilisation.

In den weiteren Versuchsreihen wurde die Wirksamkeit verschiedener Konzentrationen der Zn-Chelate bezüglich der Mobilisation von ^{65}Zn aus dem Serum, d. h. die Frage des Isotopenaustausches untersucht. Der Zn-Gehalt des Serums betrug (1,39 ± 0,07) μg·ml^{-1}. Die Versuchsanordnung war in allen anderen Beziehungen identisch mit denen der vorangehenden Versuche (Abb. 2). Erfolgt die säulenchromatographische Trennung sofort nach Zugabe der Zn-Chelate, findet, wie Abb. 3 zeigt, im Falle von

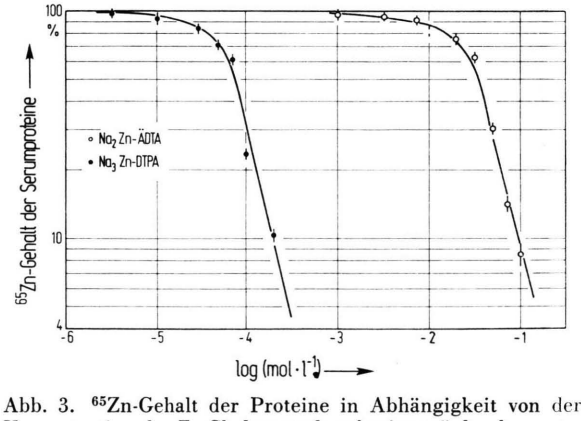

Abb. 3. ^{65}Zn-Gehalt der Proteine in Abhängigkeit von der Konzentration der Zn-Chelate nach sofortiger säulenchromatographischer Trennung. Geometrische Mittel von je 6 Einzelwerten und Standardfehler.

Zn-ÄDTA erst bei einem sehr hohen Überschuß des Liganden eine Mobilisation von ^{65}Zn aus den Serumproteinen statt, während Zn-DTPA in einem erheblich niedrigerem Konzentrationsbereich bereits wirksam ist. Im Gegensatz zu den Ca-Chelaten, bei denen das Ausmaß der ^{65}Zn-Mobilisation von der Inkubationsdauer der Ansätze unabhängig war, spielt der Zeitfaktor im Falle des Isotopenaustausches bei ÄDTA eine entscheidende Rolle, während er für DTPA praktisch bedeutungslos bleibt. Diesen Feststellungen liegen Versuche zugrunde, in denen die Auftrennung nach unterschiedlich langer Inkubation der Ansätze (bis 48 Stdn.) bei Zimmertemperatur vorgenommen wurde. Die Kinetik für den Isotopenaustausch mit Zn-ÄDTA folgt einer Exponentialfunktion. Wie Tab. II zu entnehmen ist, nimmt der Interzept für $t = 0$ mit steigender Chelatkonzentration ab, während der Exponent zunimmt.

Tab. II. Kinetik des Isotopenaustausches zwischen Zn-Chelaten und proteingebundenem ^{65}Zn. Parameter und Standardfehler der Funktion $R_{(t)} = R_{(0)} e^{-\lambda t} \cdot R_{(t)}$ und $R_{(0)}$: proteingebundenes ^{65}Zn in %. t: Stunden.

Chelatkonzentration [mol · l^{-1}]	$R_{(0)}$	λ
		Zn-DTPA
3×10^{-5}	83,14 (82,13—84,15)	~ 0
7×10^{-5}	59,62 (58,61—60,83)	~ 0
1×10^{-4}	21,29 (20,28—22,30)	~ 0
		Zn-ÄDTA
3×10^{-3}	92,45 (91,43—93,47)	$-0{,}047 \pm 0{,}006$
1×10^{-2}	83,45 (82,42—84,48)	$-0{,}225 \pm 0{,}003$
3×10^{-2}	59,63 (58,51—60,75)	$-6{,}517 \pm 0{,}311$

Diskussion

Um die Mobilisation von stabilem Zn aus den Serumproteinen deuten zu können, ist es angebracht, die Frage zunächst in einer allgemein gültigen, semiquantitativen Form zu analysieren.

Bezeichnen wir mit $[M]_t$ und $[L]_t$ die Konzentrationen *aller* Metall- bzw. Chelatspezies. Die Konzentration des Metallchelats [ML] hängt von der Stabilitätskonstante

$$K = \frac{[ML]}{[M]\,[L]} \qquad (1)$$

sowie von $[M]_t$ und $[L]_t$ ab. Dabei sind [M] und [L] gleich $[M_t - ML]$ bzw. $[L_t - ML]$, so daß (1) auch als

$$K' = \frac{[ML]}{[M_t - ML]\,[L_t - ML]} \qquad (2)$$

geschrieben werden kann. Die Formulierung (2) wird den Verhältnissen in einem biologischen System gerecht, indem $[M_t - ML]$ nicht nur die Konzentration freier Metallionen [M] allein, sondern auch die aller anderen Spezies, z. B. der Verbindungen von M mit biologischen Liganden, wiedergibt; für $[L_t - ML]$ gilt sinngemäß das gleiche, d. h. es wird auch der Konkurrenz von Ca^{2+} Rechnung getragen. Da bei dieser Betrachtung konkurrierende Reaktionen impliziert sind, hat K' eine andere Bedeutung als K, indem K' die sog. conditional Stabilitätskonstante ist [14]. Sind K', $[M]_t$ und $[L]_t$ bekannt, dann läßt sich [ML] als Unbekannte aus (2) berechnen. In Abb. 4 ist eine nach (2) berechnete Kurvenschar wiedergegeben, welche die Abhängigkeit der chelierten Metallfraktion von $[L]_t$ und der sog. Instabilitätskonstante $1/K'$ zeigt. Die gestrichelte Vertikale gibt die äquimolare Konzentration $[L]_t = [M]_t$ wieder, und die Kurven sind in bezug auf n, den Exponenten von $[L]_t$, $[M]_t$ und $1/K'$, normiert.

Die in Abb. 1 wiedergegebene Abhängigkeit der Mobilisation des stabilen Zn von der Chelatkonzentration zeigt ein deutliches Plateau bei rund 20% des proteingebundenen Zn; es handelt sich offensicht-

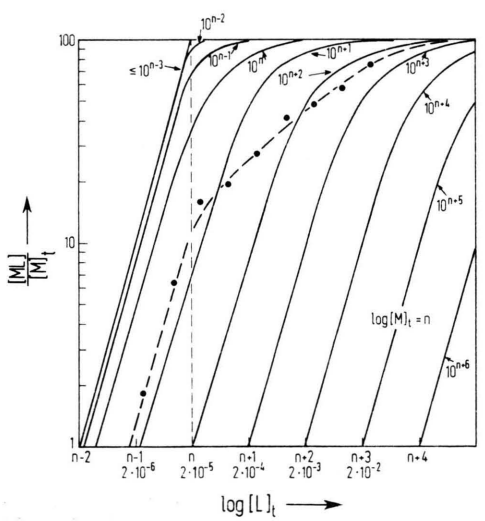

Abb. 4. Experimentell ermittelte Konzentrationsabhängigkeit der Zn-Mobilisation durch Ca-Chelate (—●—) im Vergleich zu theoretisch berechneten Kurven. Bzgl. Einzelheiten s. Text.

lich um eine so fest gebundene Fraktion, daß selbst hohe Chelatkonzentrationen unwirksam bleiben. Subtrahiert man diese Fraktion von den experimentellen Punkten der Abb. 1, erhält man die in Abb. 4 eingezeichnete Konzentrationsabhängigkeit von $\frac{[ZnL]}{[Zn]}$. die in zwei Beziehungen von den theoretisch geforderten Verhältnissen abweicht: 1. Das Verhältnis gleichwirksamer Konzentrationen $[ÄDTA]_t/[DTPA]_t$ ist 1, obwohl das Verhältnis der eingangs erwähnten effektiven Stabilitätskonstanten $K'_{DTPA}/K'_{ÄDTA} = 90$ ist. 2. Die experimentelle Kurve zeigt bei höheren Chelatkonzentrationen einen eindeutig flacheren Verlauf als die theoretisch berechneten Kurven.

Der Berechnung der theoretischen Kurven liegt die Annahme zugrunde, daß das zu mobilisierende Metall in einer homogenen Form vorliegt, d. h. daß die Bindungsstabilität seiner Proteinkomplexe quantitativ durch *eine* Konstante gekennzeichnet werden kann. Diese Voraussetzung ist jedoch, wie die Versuche mit den C o h n schen Fraktionen zeigen (Tab. I), nicht erfüllt. Die Heterogenität bezüglich der Bindungsstabilität von Zn muß sich aber, wovon man sich rechnerisch leicht überzeugen kann, in einer Abflachung der Kurven manifestieren [15]. Eine Erklärung des Befundes, daß beide Ca-Chelate gleichwirksam sind, kann von folgender Überlegung ausgehen: Die Stabilitätskonstante K, die definitionsgemäß auch in K' enthalten ist, gilt nur für die Chelierung *freier* Metallionen und impliziert somit einen Mobilisationsmechanismus über die freien Zn-Ionen. Grundsätzlich ist aber auch eine Mobilisation über die Bildung eines intermediären ternären Chelats: Protein-Zn-Polyaminopolycarbonsäure denkbar. Da bei der Bildung eines ternären Komplexes nicht alle Ligandenatome des Chelatbildners, sondern nur eine begrenzte Anzahl beteiligt sind (dies gilt in besonderem Maße für Zn mit der niedrigen Koordinationszahl 4), sollten keine wesentlichen Unterschiede der Effektivität von ÄDTA und DTPA auftreten. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die Bildung ternärer Komplexe auch im Falle der Zn-haltigen Carboanhydratase wahrscheinlich gemacht werden konnte [16].

Bei der Mobilisation von ^{65}Zn (Abb. 2) liegen grundsätzlich andere Verhältnisse vor, indem 1. DTPA etwa 20-mal wirksamer als ÄDTA ist, 2. beide Ca-Chelate wirksamer als bei der Mobilisation von stabilem Zn sind und 3. die Konzentrationsabhängigkeit der Mobilisation mit den theoretisch zu erwartenden Kurven gut übereinstimmt. Wenn man auf die in Abb. 4 wiedergegebenen Verhältnisse und die vorangehenden Überlegungen zurückgreift, führen diese Befunde zu der Folgerung, daß in vitro nur ein kleiner Bruchteil des proteingebundenen Zn durch ^{65}Zn markierbar ist, daß diese Zn-Fraktion relativ locker gebunden ist und daß schließlich die Mobilisation über das freie Zn^{2+}-Ion der dominierende Mechanismus ist. Zu beantworten ist nur die Frage, warum das Verhältnis der Wirksamkeiten von DTPA und ÄDTA mit einem Wert von ~ 20 eindeutig kleiner als das Verhältnis der effektiven Stabilitätskonstanten (~ 90) ist. Abb. 4 ist zu entnehmen, daß geringere Effektivitätsunterschiede, als aufgrund der Unterschiede zwischen den Stabilitätskonstanten zu erwarten, dann auftreten können, wenn $[L]_t \leqq [M]_t$ ist. Da jedoch $[Zn]_t \sim 2 \cdot 10^{-5}\,M$ ist und davon nur ein kleiner Bruchteil mit ^{65}Zn markiert wird, ist diese Randbedingung sicherlich nicht erfüllt, und es muß nach einer anderen Erklärung gesucht werden. Zunächst wäre denkbar, daß neben der Mobilisation über das freie Zn^{2+} auch der Mechanismus der Bildung intermediärer ternärer Komplexe eine Rolle spielt. Weiterhin könnte die (anschließend zu diskutierende) Tatsache, daß der Isotopenaustausch im Falle von Zn-DTPA erheblich schneller als bei Zn-ÄDTA verläuft, eine im Vergleich zur Theorie geringere Wirksamkeit von DTPA vortäuschen: Beschreibt man die Mobilisation des radioaktiv markierten proteingebundenen Zn durch das Ca-Chelat durch

$$PZn^* + L \rightleftharpoons P + LZn^* \qquad (3)$$

und den Isotopenaustausch durch

$$LZn^* + PZn \rightleftharpoons LZn + PZn^* \qquad (4)$$

so muß, da die durch (3) mobilisierte Fraktion $[LZn^*] < [PZn]_t$ ist, Reaktion (4) nach rechts ablaufen, und die eigentliche Mobilisation wird dadurch gewissermaßen maskiert.

Daß der Isotopenaustausch im Falle von Zn-DTPA erheblich schneller als bei Zn-ÄDTA abläuft und ein Gleichgewicht sich in sehr kurzer (in unserer Versuchsanordnung nicht nachweisbaren) Zeit einstellt, wurde bereits früher beschrieben [17] und hat aller Wahrscheinlichkeit nach die Bildung eines gemischten Komplexes

$$PZn^* + LZn \rightleftharpoons PZn^*LZn \rightleftharpoons PZn + LZn^* \qquad (5)$$

als Ursache, während der langsame Ablauf bei Zn-ÄDTA auf einer über das freie Zn^{2+} ablaufenden

Reaktion beruhen könnte. Es ist ohne weiteres denkbar, daß die sterische Anordnung der beiden Zn-Atome in dem gemischten Komplex nach (5) ihren Austausch in starkem Maße begünstigt. Für die Bildung des postulierten gemischten Komplexes spricht, daß DTPA im Vergleich zum 6-zähnigen ÄDTA 8 Ligandenatome besitzt und dadurch in der Lage ist, ein relativ stabiles Zn_2-DTPA zu bilden [11, 15].

Die ^{65}Zn-Aktivität des Zn-DTPA beträgt laut Tab. II für die drei untersuchten Konzentrationen 17, 40 bzw. 79%. Geht man von der Annahme aus, daß das gesamte proteingebundene $\sim 2 \cdot 10^{-5}$ M Zn sich am Isotopenaustausch beteiligt, müßte im Gleichgewicht, d. h. bei gleicher spezifischer Aktivität aller Zn-Fraktionen, eine Aktivität von 60, 78 bzw. 83% erwartet werden. Diese Werte sind höher als die experimentell erhaltenen. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß nach den in Abb. 2 wiedergegebenen Resultaten nur ein kleiner Bruchteil des proteingebundenen Zn in vitro mit ^{65}Zn markierbar ist. Dementsprechend müßte die ^{65}Zn-Aktivität von Zn-DTPA noch höher sein, als oben angegeben. Die Ursache für diese Diskrepanz ist nicht klar, und es kann im Moment nur eine Erklärung vorgeschlagen werden, derzufolge 1. die Bildung gemischter Komplexe nach Reaktion (5) die ^{65}Zn-Markierung von proteingebundenen Zn-Fraktionen, die duch ionogenes ^{65}Zn nicht markierbar sind, ermöglicht und 2. da [ZnDTPA] > [ZnP] das Gleichgewicht der Reaktion (5) verschoben ist und der gemischte Komplex bei unserer Methodik von den Proteinen nicht getrennt werden kann.

Anlaß für unsere Untersuchung waren die eingangs dargelegten Komplikationen für die Hypothese, daß der Wechselwirkung des endogenen Zn mit den Chelaten eine pathogenetische Relevanz für ihre Toxizität zukommt. Unser Befund, daß bei der Mobilisierung von stabilem Zn DTPA und ÄDTA gleichwirksam sind, scheint auf den ersten Blick den Sachverhalt noch mehr zu komplizieren, da in vivo DTPA bezüglich der Zn-Ausscheidung etwa 20-mal wirksamer als ÄDTA ist [2]. Das von uns untersuchte geschlossene in vitro-System unterscheidet sich jedoch in einem wesentlichen Punkt von den Verhältnissen in vivo, indem die Resorption von Zn aus dem Intestinaltrakt entfällt. Das enteral resorbierte Zn, das normalerweise zum größten Teil wieder ausgeschieden wird, sollte sich im Blutplasma bezüglich der Bindung durch Plasmaproteine und der Mobilisierbarkeit durch die Chelatbildner wie das ^{65}Zn in unserem in vitro-System verhalten. Wir können somit folgern, daß bei dem in vivo durch die Chelatbildner zur Ausscheidung gebrachten Zn es sich im wesentlichen um das enteral resorbierte Zn und zu einem erheblich geringeren Teil um das während der Biosynthese in die Proteine eingebaute Zn handelt. Für die Toxizität der Chelatbildner sollte in erster Linie die Mobilisierung der letzteren Zn-Fraktion maßgeblich sein. Daß das Verhältnis der toxischen Dosen Ca-DTPA/Ca-ÄDTA etwa 2 beträgt, d. h. >1 und <20 ist, weist darauf hin, daß die durch die Chelierung des enteral resorbierten Zn bedingte positive Zn-Bilanz insofern pathogenetisch relevant ist, als die Auffüllung des endogenen Zn-Pools verlangsamt wird. Das Verhältnis gleich toxischer Dosen (~ 2) kann somit als Resultante aus den entsprechenden Werten von 1 bzw. 20 für die Zn-Mobilisierung aufgefaßt werden, und wir glauben, durch unsere Untersuchung die erwähnten Diskrepanzen weitgehend beseitigt zu haben. Abschließend sei noch bemerkt, daß die Überlegungen, welche die Mobilisierung von Metallen aus endogenen Komplexen betreffen (Abb. 4), Möglichkeiten für die Abschätzung der Stabilität von Metallkomplexen mit endogenen Liganden eröffnen.

Herrn Prof. Dr. A. CATSCH danke ich für das Interesse an den Untersuchungen und Frau M. PETEREIT für die wertvolle technische Assistenz.

[1] A. CATSCH, Dekorporierung radioaktiver und stabiler Metallionen, K. Thiemig, München 1968.
[2] P. DVORÁK, Strahlentherapie **139**, 611 [1967].
[3] F. HAVLÍČEK, Strahlentherapie **134**, 296 [1967].
[4] H. BOEMER, Strahlentherapie **142**, 349 [1971].
[5] F. BOHNE, Strahlentherapie **143**, 106 [1972].
[6] A. CATSCH, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **24 b**, 316 [1964].
[7] A. CATSCH u. E. v. WEDELSTAEDT, Experientia **21**, 210 [1965].
[8] V. H. SMITH, BNWL-**1050**, part 1, 5. 3. [1970].
[9] K. M. WEBER, Z. ges. exp. Med. **150**, 354 [1969].
[10] G. SCHWARZENBACH et al., Helv. Chim. Acta **37**, 937 [1954].
[11] G. ANDEREGG et al., Helv. Chim. Acta **42**, 827 [1959].
[12] A. CATSCH u. D. KH. LÊ, Strahlentherapie **130**, 557 [1966].
[13] B. ROSOFF et al., J. Appl. Physiol. **30**, 12 [1971].
[14] A. RINGBOM, Complexation in Analytical Chemistry, New York-London, Interscience Publishers [1963].
[15] G. SEGEWITZ, Dissertation, Karlsruhe 1972.
[16] S. CARPY, Biochim. biophys. Acta **151**, 245 [1968].
[17] W. JAMMERS u. A. CATSCH, Naturwissenschaften **22**, 588 [1967].