

Entwicklung radioimmunologischer Methoden zur Bestimmung von Glykosiden des Digitoxigenins, g-Strophanthidins und k-Strophanthidins mit Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Digitoxins und g-Strophanthins

EUGEN VERSPOHL

Kurzvortrag anlässlich der Verleihung des EDENS-Preises am 23. Oktober 1974

Bei meinen bisherigen Arbeiten habe ich mich mit den Glykosiden Digitoxin und Strophanthin beschäftigt. Diese sind untrennbar mit dem Namen EDENS verbunden. Daher ist es für mich eine besondere Auszeichnung, heute den EDENS-Preis zu erhalten. In seinem 1916 erschienenen Buch „*Die Digitalisbehandlung*“ hatte Professor EDENS schon die Vorzüge und Nachteile der Therapie mit Glykosiden beschrieben, entsprechend den methodischen Möglichkeiten und Erkenntnissen seiner Zeit. Heute stehen uns im Gegensatz zu damals rein isolierte Glykoside zur Therapie zur Verfügung, und die Untersuchungsmethoden wurden entsprechend verfeinert. Dieses letztgenannte Ziel wurde mit meiner Arbeit verfolgt. Gestatten Sie mir, daß ich Ihnen eine kurze Zusammenfassung vortrage.

Zunächst zur Durchführung der Methode:

Für eine radioimmunologische Bestimmung benötigt man

1. die zu bestimmende Substanz (hier Glykosid),
2. die „gleiche“ Substanz in radioaktiv markierter Form (hier tritiiertes Glykosid) und
3. einen Antikörper gegen das Glykosid, auch Antiserum genannt.

Da die in den Versuchen verwendeten Glykoside Digitoxin, g-Strophanthin und Convallatoxin aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts bei Injizierung keine Antikörperbildung auslösen, mußte ein Umweg beschritten werden: Die Glykoside wurden mit Hilfe der Perjodatreaktion nach MALAPRADE mit ihren endständigen Zuckergruppen an Humanalbumin gebunden, um damit höhermolekulare Konjugate zu erhalten. Zur Prüfung dieser Konjugate wurden dünnschichtchromatographische Analysen durchgeführt mit dem Ergebnis, daß sich das Sterangerüst der drei verwendeten Glykoside Digitoxin, g-Strophanthin und Convallatoxin während der Antigendarstellung nicht verändert hat, was für die später noch erwähnte Spezifitätsprüfung der Antikörper von Bedeutung ist. Die spektrophotometrische Prüfung der hergestellten Antigene zeigte, daß bei der Antigendarstellung eine, wenn auch verschieden starke Bindung der Glykoside an Humanalbumin erfolgt. Der Lactonring ist bei allen Antigenen mit Hilfe der Raymond-Reaktion nachweisbar.

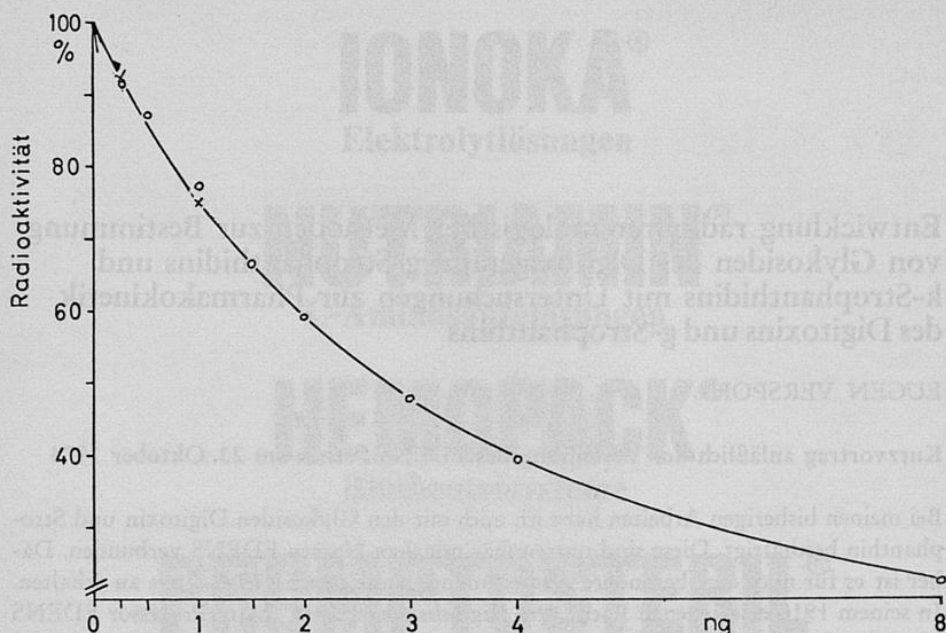


Abb. 1: Eichkurve zur radioimmunologischen Bestimmung von Glykosid (Verwendung von 3 ng ^3H -Glykosid)

Diese geprüften Konjugate hatten Antigeneigenschaften und lösten an Kaninchen nach Behandlung eine Antikörperbildung aus. Die erhaltenen Antisera sind nicht nur gegen das Antigen gerichtet, sondern auch gegen das Hapten, also das Glykosid.

Lassen Sie mich an dieser Stelle kurz das Prinzip der Methode beschreiben:

Einer glykosidfreien Probe wird eine konstante Menge ^3H -Glykosid und soviel Antiserum zugesetzt, daß ca. 50 % des markierten Glykosids gebunden werden. In diesem Ansatz liegt ^3H -Glykosid in ungebundener und in an Antikörper gebundener Form vor. Diese beiden Komponenten werden durch dextranbeschichtete Aktivkohle getrennt. Der Dextranmantel der Kohleteilchen ist nur für die relativ kleinen Moleküle des freien Glykosids, nicht aber für die großen Moleküle des an Antikörper gebundenen Glykosids durchlässig. Das freie markierte Glykosid wird an Kohle adsorbiert und abzentrifugiert; die Radioaktivität des Überstandes wird bestimmt und dient als Bezugswert.

Werden den Plasmaproben zusätzlich ansteigende Mengen unmarkierten Glykosids zugesetzt, so konkurrieren diese mit dem markierten Glykosid um die Bindung an den Antikörper; die Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes nimmt ab. Wird die Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes gegen ansteigende Mengen des zugesetzten unmarkierten Glykosids aufgetragen, so erhält man Eichkurven, aus denen die Konzentration des unmarkierten Glykosids einer Versuchsprobe abgelesen werden kann (Abb. 1).

Zur Durchführung der radioimmunologischen Bestimmung der drei Glykoside wurde

die für den erwünschten Meßbereich notwendige Menge an Antiserum und dessen Bindungskapazität für Glykoside bestimmt. Nur so ist es möglich, die Menge des ^3H -Glykosids und des Antiserums in den Ansätzen aufeinander abzustimmen. Dabei muß der Zusatz an ^3H -Glykosid so gewählt werden, daß gerade eine maximale Sättigung der Antikörper erfolgt. Wenn nämlich z. B. das markierte Glykosid nicht alle Bindungsstellen am Antikörper „besetzt“, so kann zugegebenes unmarkiertes Glykosid das radioaktive Glykosid von den Bindungsstellen nicht verdrängen; man erhält folglich keine Eichkurve. In meiner Arbeit konnte ferner gezeigt werden, daß – unter Einhaltung der genannten Vorbedingungen – die jeweilige, erzielte Eichkurve mit mathematischen Berechnungen übereinstimmt.

Um den praktischen Wert der Methode anzugeben, wurde die Spezifität der radioimmunologischen Methode geprüft. Sie ergab, daß Fremdglykoside die Bestimmung wenig stören. Östradiol, eine den Glykosiden chemisch ähnliche Verbindung mit Sterangerüst, stört die radioimmunologische Bestimmung selbst in 500fach höherer Konzentration nicht. Veränderungen am Glykosidmolekül haben im einzelnen folgenden Einfluß auf die Antigen-Antikörper-Reaktion:

1. Digitoxin-Antiserum bindet das dem Digitoxin chemisch ähnliche Digoxin stärker als g-Strophanthin und Convallatoxin. G-Strophanthin-Antiserum besitzt andererseits eine relativ hohe Affinität zu Convallatoxin. Umgekehrt bindet Convallatoxin-Antiserum von den Fremdglykosiden bevorzugt g-Strophanthin, was an der chemischen Ähnlichkeit zwischen g-Strophanthin und Convallatoxin liegen könnte.
2. Verbindungen mit verändertem Lactonring (Hydrierung des Lactonrings oder ein δ -Lactonring anstelle eines γ -Lactonrings) werden schwach gebunden. Eine Verbindung ohne Lactonring (Östradiol) besitzt keine nachweisbare Affinität zu den Antikörpern.
3. Aglykone werden schwächer gebunden als die entsprechenden Glykoside.
4. Veränderungen an der Zuckerkette bei gleichem Aglykon verändern die Affinität zum Antikörper geringgradig um $\pm 15\%$.

Trotz der hohen Spezifität der Antikörper lassen sich mit ihnen auch Fremdglykoside, d. h. Glykoside, die nicht zur Bildung der Antikörper verwendet wurden, bestimmen, wenn den Ansätzen ^3H -markiertes Fremdglykosid anstelle des spezifischen ^3H -markierten Glykosids zugesetzt wird. So lassen sich beispielsweise mit Digitoxin-Antiserum Digoxin, g-Strophanthin und Convallatoxin, mit g-Strophanthin-Antiserum Digitoxin, Digoxin und Convallatoxin und mit Convallatoxin-Antiserum Digitoxin, Digoxin und g-Strophanthin bestimmen, wenn etwa vierfach höhere Mengen an Antiserum und die betreffenden ^3H -markierten Fremdglykoside eingesetzt werden.

Nach den methodischen Erläuterungen nun zu einigen mit dieser Methode erzielten Ergebnissen:

An Hunden führten die Untersuchungen zu folgenden Ergebnissen:

1. Im Verlauf einer intravenösen Infusion von g-Strophanthin erfolgt innerhalb von etwa einer Stunde ein annähernd linearer Anstieg des g-Strophanthin-Spiegels im Blutplasma bis zum Herzstillstand. Der Plasmaspiegel liegt beim Auftreten toxischer Arrhythmien bei 195 ng/ml und beim tödlichen Herzstillstand bei 300 ng/ml g-Strophanthin.

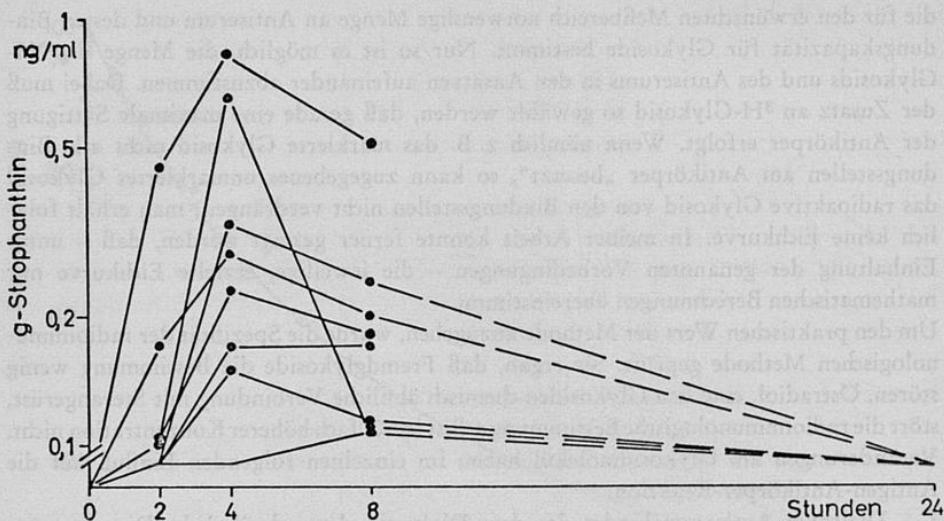


Abb. 2a: g-Strophanthin-Konzentration im Blutplasma nach einmaliger oraler Gabe von 8 mg g-Strophanthin

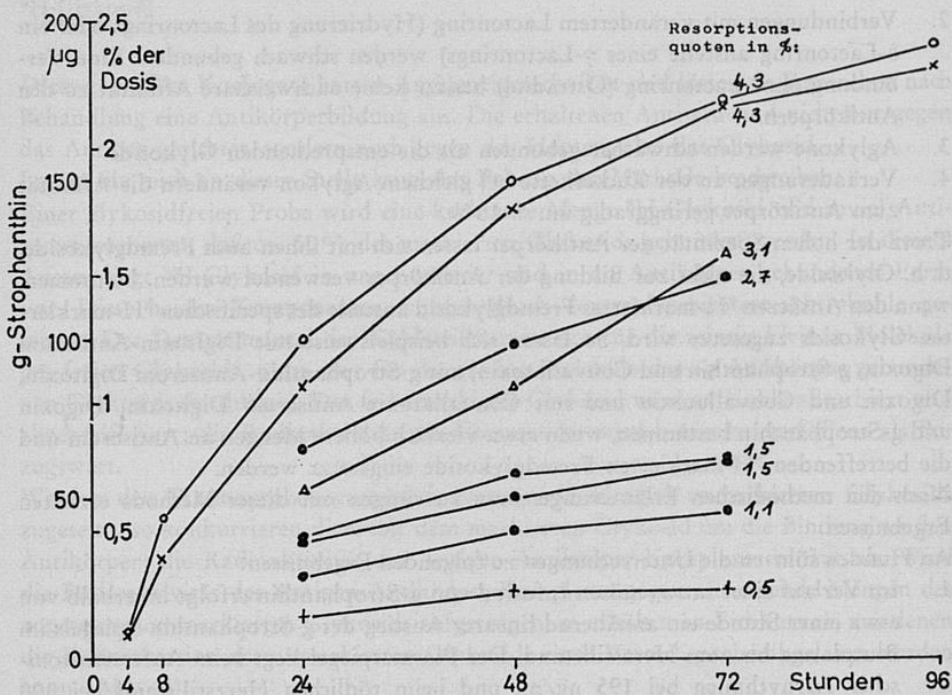


Abb. 2b: Eliminationssummenkurve nach Gabe von 8 mg g-Strophanthin oral

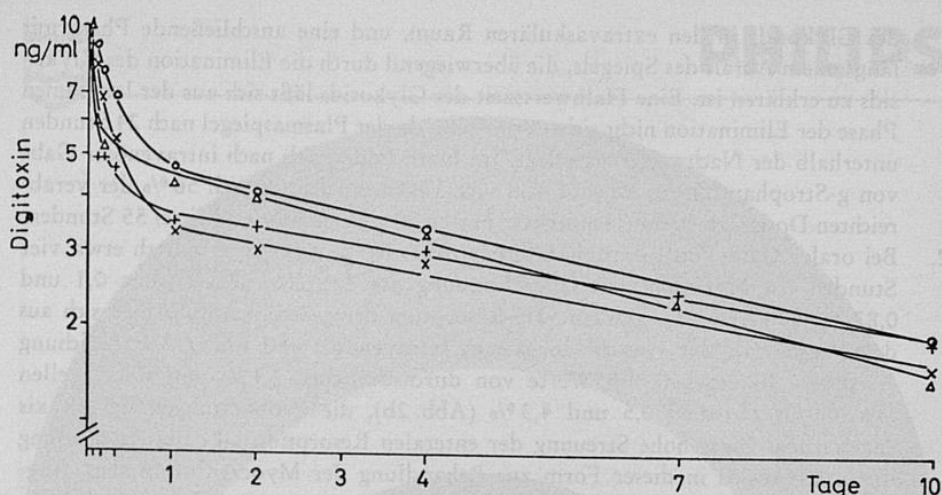


Abb. 3a: Digitoxin-Konzentration im Blutplasma nach einmaliger oraler Gabe von 0,5 mg Digitoxin

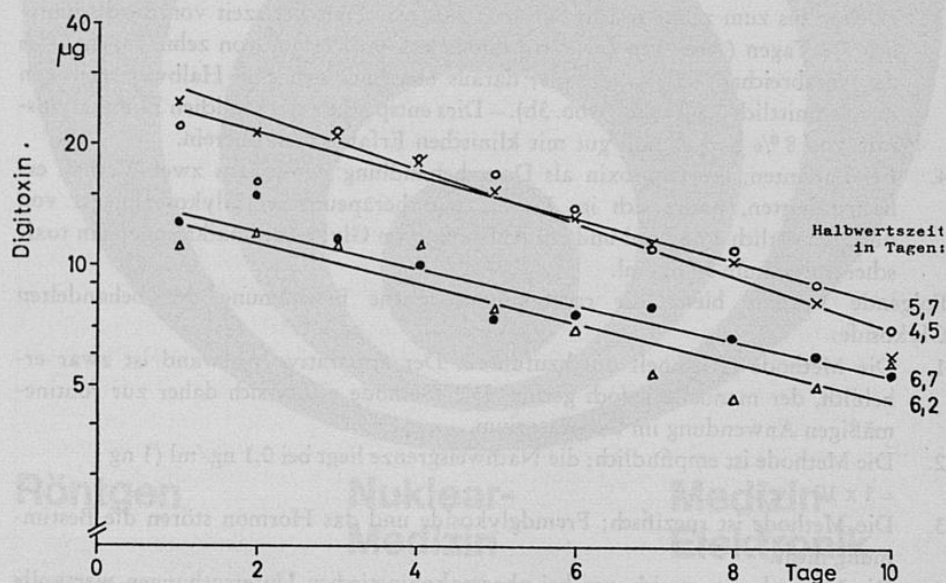


Abb. 3b: Renale Digitoxinausscheidung (μg) nach Gabe von 0,5 mg Digitoxin oral

2. Nach schneller intravenöser Injektion von g-Strophanthin fällt der Plasmaspiegel innerhalb einer Stunde steil ab und folgt danach einer langsamen Eliminationskinetik.

Pharmakokinetische Untersuchungen am Menschen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Nach intravenöser Injektion von g-Strophanthin findet sich bis zur vierten Stunde ein schneller Abfall des Glykosidspiegels im Plasma, bedingt durch die Verteilung

des Glykosids in den extravaskulären Raum, und eine anschließende Phase mit langsamem Abfall des Spiegels, die überwiegend durch die Elimination des Glykosids zu erklären ist. Eine Halbwertszeit des Glykosids läßt sich aus der langsamen Phase der Elimination nicht sicher ermitteln, da der Plasmaspiegel nach 24 Stunden unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Im Harn finden sich nach intravenöser Gabe von g-Strophanthin im Verlauf von vier Tagen durchschnittlich 56 % der verabreichten Dosis. Die hieraus berechnete Halbwertszeit beträgt im Mittel 55 Stunden.

2. Bei oraler Gabe von g-Strophanthin erreicht der Blutspiegel erst nach etwa vier Stunden ein Maximum mit einer Streuung der Einzelwerte zwischen 0,1 und 0,82 ng/ml (Abb. 2a). Die enterale Resorption des g-Strophanthins läßt sich aus dem Verhältnis der Ausscheidung nach intravenöser und oraler Verabreichung errechnen. Es ergeben sich Werte von durchschnittlich 2,4 % mit individuellen Streuungen zwischen 0,5 und 4,3 % (Abb. 2b), die Beobachtungen der Praxis entsprechen. Diese hohe Streuung der enteralen Resorption läßt die Anwendung dieses Glykosids in dieser Form zur Behandlung der Myocardinsuffizienz fragwürdig erscheinen.
3. Bei oraler Gabe von Digitoxin erreicht der Blutspiegel nach ein bis zwei Stunden ein Maximum. Aus der langsamen Phase des Absinkens des Plasmaspiegels vom zweiten bis zum zehnten Tag errechnet sich eine Halbwertszeit von durchschnittlich 7,8 Tagen (Abb. 3a). Im Harn finden sich im Verlauf von zehn Tagen 24 % der verabreichten Digitoxindosis; daraus errechnet sich eine Halbwertszeit von durchschnittlich 5,8 Tagen (Abb. 3b). – Dies entspricht einer täglichen Eliminationsrate von 8 % und stimmt gut mit klinischen Erfahrungen überein.
4. Bei Patienten, die Digitoxin als Dauerbehandlung mindestens zwei Wochen erhalten hatten, findet sich im Plasma ein therapeutischer Glykosidspiegel von durchschnittlich 16 ng/ml und bei Auftreten von Glykosidintoxikationen ein toxischer Spiegel um 34 ng/ml.

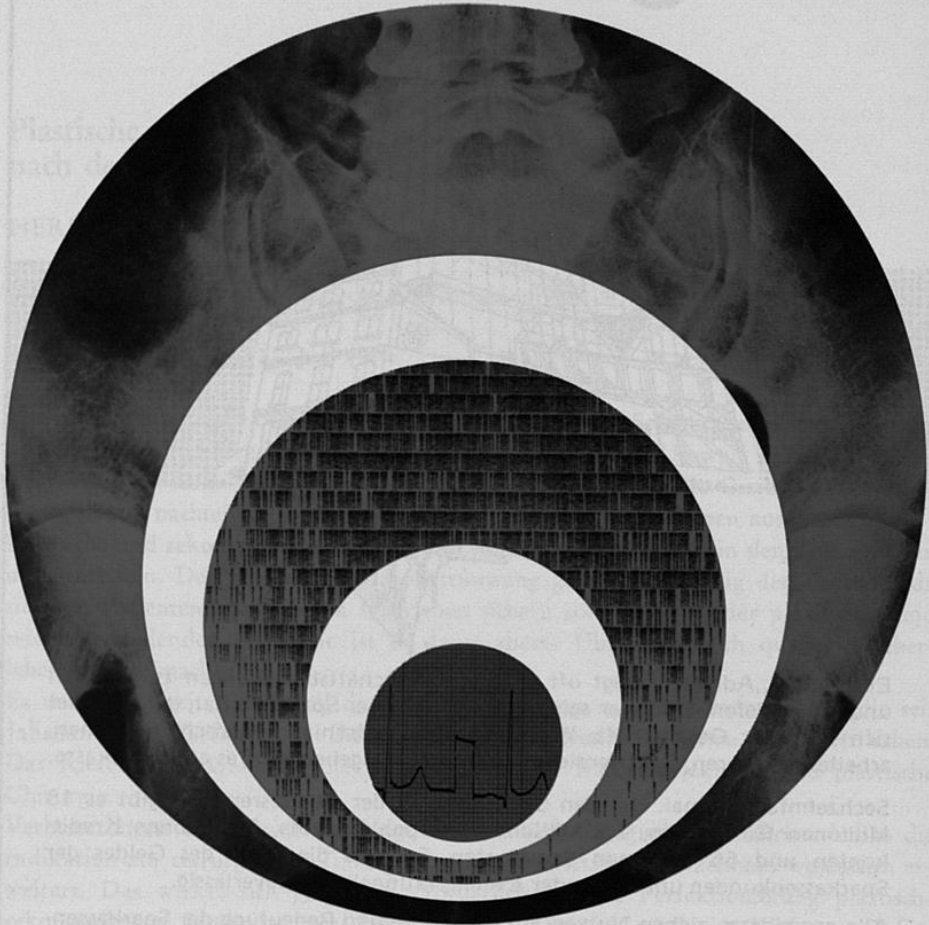
Folgende Vorteile bietet die radioimmunologische Bestimmung der behandelten Glykoside:

1. Die Methode ist schnell durchzuführen. Der apparative Aufwand ist zwar erheblich, der manuelle jedoch gering. Die Methode eignet sich daher zur routinemäßigen Anwendung im Laboratorium.
2. Die Methode ist empfindlich; die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 ng/ml ($1 \text{ ng} = 1 \times 10^{-9} \text{ g}$).
3. Die Methode ist spezifisch; Fremdglykoside und das Hormon stören die Bestimmung nicht.
4. Die Methode eignet sich, um bei pharmakokinetischen Untersuchungen wertvolle Ergebnisse zu erzielen. Da Glykoside eine geringe therapeutische Breite besitzen, ist es von Vorteil, die Dosierung nicht nur anhand des therapeutischen Effektes einzustellen, sondern auch die Blutspiegel und die renale Ausscheidung der verabreichten Glykoside zu messen. So ergeben sich Hinweise auf eine Intoxikation oder eine ungenügende Digitalisierung. Es lassen sich ferner interindividuelle und intraindividuelle Streuungen der Absorption von Glykosiden messen und zu klinischen Befunden in Beziehung setzen.

Mit meiner Arbeit hoffe ich, zur Erreichung dieser Ziele beigetragen zu haben.



PHILIPS



Röntgen

Einrichtungen
für alle Anwendungen in der
Röntgen-Diagnostik und
Therapie.

Kobalt-Bestrahlungsgeräte.
Linearbeschleuniger.

Nuklear- Medizin

Anlagen für
Lokalisations-Diagnostik,
Funktions-Untersuchungen,
in-vitro-Messungen und
Strahlungskontrolle.

Medizin- Elektronik

Medizin-elektronische
Einrichtungen für die
Patientenüberwachung,
Funktionsdiagnostik
und Therapie.



C. H. F. Müller Medizinisch-Technische Systeme

MÜLLER

Eine gute „Adresse“



Eine gute „Adresse“ trägt oft dazu bei, Geschäftsbeziehungen zu knüpfen und zu vertiefen. Und wer seine Konten bei einer Sparkasse hat, der befindet sich in guter Gesellschaft. Wo immer in Deutschland Menschen wohnen, arbeiten, studieren, Geld verdienen oder Geld ausgeben, gibt es eine Sparkasse.

Sechzehntausendmal. Bei den Sparkassen in der Bundesrepublik gibt es 18 Millionen Girokonten, 1,9 Millionen Wertpapierdepots, 8 Millionen Kreditkonten und 55 Millionen Sparkonten. So sind die Wege des Geldes der Sparkassenkunden untereinander schnell, rationell und zuverlässig.

Alle gemeinsam ziehen Nutzen aus der Größe und Bedeutung der Sparkassenorganisation. Kapitalanlagen sind sicher, Kredite sind fair, und die Konten werden von modernsten elektronischen Datenverarbeitungsanlagen geführt.

Wenn's um Geld geht



**KREISSPARKASSE
DÜSSELDORF**

Hauptstelle: Kasernenstraße 69

Telefon (0211) 8731 · Telex: 08 582 112