

Biochemie der Metallocene, II Organ-Verteilung und Thymus-Anreicherung von [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen

Biochemistry of Metallocenes, II

Organ-Distribution and Thymus Affinity of Cinnamoyl- ^{103}Ru Ruthenocene

M. Wenzel, R. Herken und W. Klose

Biologisch-Chemische Abteilung, Pharmazeutisches Institut und Anatomisches Institut
der Freien Universität Berlin

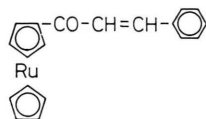
(Z. Naturforsch. **32 c**, 473–481 [1977]; eingegangen am 27. Januar/17. März 1977)

Metallocene, Ru, Radiopharmaceutical, Thymus, Phagocytosis

Metallocenes, labelled with ^{103}Ru , are potential radiopharmaceuticals for use in nuclear medicine diagnosis. Ruthenocene derivatives with oxopropene side-chains were administered to mice and rats to study their biochemical properties. Excretion rates and organ distributions of $^{103}\text{RuCl}_3$ and Cinnamoyl- ^{103}Ru ruthenocene were very different. While $^{103}\text{RuCl}_3$ was relatively evenly distributed in the body, the metallocene derivative was concentrated in liver, lungs and spleen after intravenous (i.v.) injection. After i.p. injection however a high thymus affinity was observed and autoradiography proved that the site of ^{103}Ru accumulation was in thymocytes. The thymus affinity can be diminished by corticoid pretreatment and raised by inhibition of phagocytosis (BeSO_4). The mechanism of accumulation in the thymus and a possible clinical application are discussed.

Mit γ -Strahlern markierte Metallocene sind von potentielltem Interesse für die Nuklear-Medizin ^{1, 2}. Über die biochemischen Eigenschaften dieser metallorganischen Verbindungen ist nur wenig bekannt ^{3–5a}.

Angesichts dieses Sachverhalts beschreiben wir im folgenden Untersuchungen zur Organ-Verteilung von verschiedenen substituierten Oxopropen-Derivaten des Ruthenocens in Sonderheit von [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen (**I**), das eine bemerkenswert hohe Thymus-Affinität aufweist.



Diese ^{103}Ru -markierten Metallocen-Derivate bieten damit erstmals die Möglichkeit, den Thymus einer szintigraphischen Darstellung zugänglich zu machen. Bisher steht nämlich der nuklearmedizinischen Diagnostik keine radioaktive Verbindung zur Verfügung, die sich im Thymus anreichert.

Alle Metallocen-Derivate wurden von uns im Rahmen eines Programms „Biochemie der Metallocene“ synthetisiert und mit dem γ -Strahler ^{103}Ru markiert.

Requests for reprints should be sent to Prof. Dr. M. Wenzel, Freie Universität Berlin, Fachbereich Pharmazie (FB 22), Institut für Pharmazie (WE 1), Königin-Luise-Str. 2/4, D-1000 Berlin 33.

Über Synthese und Biochemie anderer radioaktiver Metallocene wurde bereits früher berichtet ^{1, 2, 4–5a}.

Im Rahmen dieser Arbeit werden auch Problemkreise angeschnitten, die mit der Struktur und Funktion des Thymus zusammenhängen.

Material und Methoden

Herstellung von Oxo-propenyl-Derivaten des Ferrocens

Durch Kondensation der aktivierten CH_3 -Gruppe von Acetyl-Verbindungen mit Aldehyden in 50% Äthanol wurden Metallocene mit einer substituierten Oxo-propen-Seitenkette der allgemeinen Formel



hergestellt ^{13–15}.

Herstellung von Cinnamoyl-ferrocen ¹⁴

900 mg (2,9 mmol) Acetyl-ferrocen, 450 mg (3,9 mmol) Benzaldehyd und 0,2 g NaOH werden in 5 ml 50prozentigem Äthanol 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach weiteren 3 h Stehen bei 0 °C wird von dem tiefroten Niederschlag abgesaugt und aus Benzol/Petroläther (1 : 1) umkristallisiert. Ausbeute: 65%; Fp. 136–138 °C. $\epsilon_{500} = 1,9 \times 10^3$, $\epsilon_{308} = 2,2 \times 10^4$.

Herstellung von [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen ¹³

Die ^{103}Ru -markierten Ruthenocene wurden generell nach ref. 1 synthetisiert und aufgearbeitet. Eine



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

methanolische Lösung mit 20 mg Cinnamoyl-ferrocen wird mit 500 μCi RuCl_3 (spez. Akt. 500 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) in einer Ampulle (Länge 30 mm, ϕ 8 mm) vorsichtig eingedampft, die Ampulle unter Vakuum zugeschmolzen und anschließend 45 min bei 180 °C erhitzt. Danach wird der Ampullen-Inhalt mit Äthanol eluiert und zum Abtrennen von ^{103}Ru -Ionen auf eine Kieselgel-Säule (Länge 10 cm, ϕ 1 cm) gegeben. Nach Eluation mit Benzol/Methanol (8 : 1) erhält man das gewünschte [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen vermischt mit Cinnamoyl-ferrocen als Träger. Endreinigung bzw. Reinheits-Kontrolle erfolgt durch Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel-Fertigplatten (Fa. E. Merck, Darmstadt) mit anschließender Direkt-Messung nach ref. 16.

Laufmittel: Benzol/Methanol (8 : 2) mit R_F 0,49. Radiochemische Ausbeute: 21%. Spezifische Aktivität: 3,9 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$. *

* μmol = Summe aus Ruthenocen- und Ferrocen-Derivat. (Alle Dosierungs-Angaben gehen immer von der so definierten spezifischen Aktivität aus.)

Direkt-Messung von Radio-Chromatogrammen

Die Messung der ^{103}Ru -markierten Verbindungen auf DC-Platten erfolgte mit dem „Dünnschicht-Scanner II“ (Fa. Labor Prof. Berthold, Wildbad, Germany) nach den in ref. 17 ausführlich beschriebenen Methoden.

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten geschlechtsreife CFL-Mäuse (ca. 25–28 g) und Wistar-Ratten der Fa. Hagemann (Extertal). Die Tiere erhielten Albumin-Preßlinge und Wasser ad libitum. Infantile Mäuse (ca. 9 g) bzw. infantile Ratten (ca. 9 g) hatten ein Alter von 21 bzw. 6 Tagen.

Injektion des radioaktiven Materials

[^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen (stets mit einem Überschuß aus Cinnamoyl-ferrocen gemischt) wurde in 60 °C warmem Propylenglykol gelöst. Sowohl bei i. p. als auch bei i. v. Gabe wurden 50 μl dieser Lösung mit der bei den Experimenten angeführten Dosis injiziert.

Radioaktivitäts-Messungen der Tiere und Organe

Der Gehalt der Mäuse an ^{103}Ru wurde *in vivo* durch Ganzkörper-Messung in einem entsprechend großen Bohrloch eines 3' \times 3' großen NaJ-Kristalls bestimmt. Zählausbeute: 20,5%.

Die Radioaktivitäts-Messung der den getöteten Tieren entnommenen und gewogenen Organe wurde in einem Gamma-Probenwechsler (Fa. Berthold, Wildbad) mit einer Zählausbeute von 19% ausge-

führt. Alle Radioaktivitäts-Messungen sind entsprechend der Halbwertszeit von ^{103}Ru (39,5 Tage) korrigiert worden.

Gewinnung von Peritoneal-Zellen

7 Mäusen wurden je Maus 5 ml Hanks-Puffer i. p. injiziert, 5 min der Bauch palpiert und anschließend die Flüssigkeit aus der Peritoneal-Höhle entnommen. Nach Abzentrifugieren bei 200 $\times g$ werden die Peritoneal-Zellen (aus 7 Mäusen 0,12 ml \triangleq ca. 2 \times 10⁷ Zellen) 1mal mit 3 ml Hanks-Lösung gewaschen.

Inkubation von Peritoneal-Zellen mit [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen

Inkubiert man 1 ml einer 0,5prozentigen Suspension von Peritoneal-Zellen in Hanks-Puffer unter Zusatz von 0,5 μmol (\sim 1 μCi) [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen (gelöst in 0,05 ml Äthanol) bei 37 °C, so werden in 20 Minuten etwa 56% der eingesetzten Radioaktivität von den Zellen aufgenommen. Nach 2maligem Waschen und Abzentrifugieren geben die Zellen nur 4% der Radioaktivität ab. Die Zellen enthalten also noch 52% (d. h. 0,25 μmol) an [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen. Diese radioaktiven Zellen wurden in 0,5 ml Hanks-Medium resuspendiert, von der 1prozentigen Zellsuspension wurde je Maus ca. 0,05 ml in die Schwanzvene injiziert.

Bestimmung der Organverteilung mit Hilfe der Ganzkörper-Autoradiographie

Die Ganzkörper-Autoradiographien wurden in der Isotopen-Abteilung der Schering-AG durchgeführt. * Nach i. p. und i. v. Injektion wurden die Bestimmungen nach 24 Stunden vorgenommen. Methodisch wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die mit Äther betäubten Tiere wurden in eine Mischung aus Aceton und Trockeneis eingefroren und anschließend 24 Stunden in der Kühltruhe gehalten. Hierbei verflüchtigt sich das Aceton. Nach dem Entfernen der Extremitäten und Einbetten des Rumpfes in Schabefleisch wurden im Kryostaten 20 μm starke Längsschnitte erstellt und auf Folienmaterial (Scotch-Type der Fa. Drein) aufgezogen. Nach dem Trocknen der Schnitte in der Kühltruhe folgte das Auflegen des Filmes (Codirex-Röntgenfilm), die Exposition (im Durchschnitt 14 Tage) und das Entwickeln. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und in Eukit eingedeckt.

Bestimmung der Aktivitätsverteilung mit Hilfe der Mikroautoradiographie

Die Organe wurden in Methanol/Eisessig fixiert. Nach dem Einbetten der Organe in Paraplast wur-

* Für diese Möglichkeit haben wir Dr. P. E. Schulze (Schering AG, Berlin) zu danken.

den 5 μm starke Serienschritte hergestellt und die Präparate entparaffiniert. Das Aufbringen der Ilford K 5-Emulsion erfolgte nach der Dipping-Methode im Verhältnis Emulsion/Wasser 1:1. Die Präparate wurden in lichtundurchlässigen Boxen bei 4 °C exponiert. Nach dem Entwickeln in Amidol⁰ und der Zwischenwässerung wurde mit Natriumthiosulfat fixiert. Anschließend wurden die Präparate 2 Stunden gewässert und in Eukit⁰ eingedeckt.

Ergebnisse

Exkretion von $^{103}\text{RuCl}_3$ - und ^{103}Ru -markierten Ruthenocen-Derivaten

Abb. 1 gibt einen Vergleich der Exkretion von $^{103}\text{RuCl}_3$ und von Derivaten des [^{103}Ru]Ruthenocens mit einer Oxo-propen-Seitenkette. Danach wird bei Mäusen in Ionenform appliziertes ^{103}Ru nur sehr langsam aus dem Organismus eliminiert. (Biol. Halbwertszeit 195 h.) Die Ausscheidung der radioaktiven Metallocen-Derivate ist wesentlich schneller (Biol. Halbwertszeit ca. 15 h), erreicht aber nicht die Werte hydrophiler Metallocen-Derivate wie z. B. von [^{103}Ru]Ruthenocen-carbonsäure oder [^{103}Ru]Acetyl-ruthenocen^{4, 5}.

Wie separate Untersuchungen mit [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen bei Ratten und Mäusen gezeigt haben, wird im Urin relativ wenig ^{103}Ru -Aktivität aus-

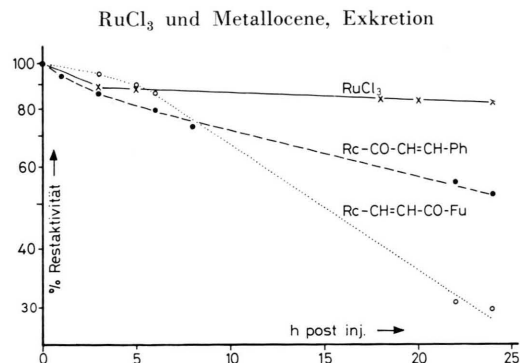


Abb. 1. Exkretion von ^{103}Ru nach i.v.-Injektion von RuCl_3 und Ruthenocen-Derivaten bei Mäusen. Die Dosierung entspricht den Angaben in Tab. I. Ordinate: Restaktivität im Ganztier in % der inj. Dosis.

geschieden (im Zeitraum 0–24 h etwa 2–3% der injizierten Dosis). Der größere Anteil der Exkretion dieser Verbindung verläuft über die Galle: In den Faeces findet sich etwa 30–40% der injizierten Dosis (Zeitraum 0–24 h). Meerschweinchen scheiden dagegen etwa 50% der Gesamt-Elimination mit dem Urin aus, was auf eine unterschiedliche Metabolisierung des Metallocens hindeutet. Ausführlich wird über die Metabolisierung von Cinnamoyl-ruthenocen an anderer Stelle berichtet.

Tab. I. Organverteilung ^{103}Ru -markierter Verbindungen in Mäusen. Unterschiedliche Thymus-Anreicherung nach i.p. und i.v. Injektion. 24 h nach Injektion der markierten Verbindungen wurden die Tiere getötet, die Organe entnommen und anschließend Gewicht und Radioaktivität bestimmt ($n = 7$ CF1 Mäuse ♀). Die Zahlen geben die Mittelwerte an. Für Thymus und Muskel $\bar{x} \pm \sigma$. Muskulatur wurde aus dem hinteren Oberschenkel entnommen.

Substanz	Dosis [$\mu\text{mol/kg}$]	^{103}Ru -Aktivität in den Organen [% inj. Dosis/g]								Thymus	
		Muskel	Blut	Lunge	Leber	Niere	Neben-niere	Milz	Thymus	Muskel	
RuCl_3	i.p.	1,5 $\pm 0,2$	5,2	3,6	6,8	10,0	5,2	4,8	2,8 $\pm 1,2$	1,9	
	i.v.	1,6 $\pm 0,3$	5,7	5,3	5,6	7,9	5,4	4,4	1,9 $\pm 0,6$	1,2	
$\text{Rc}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$	i.p.	0,16 $\pm 0,02$	0,26	0,59	8,0	2,2	3,6	1,9	13,4 ± 2	84	
	i.v.	0,20 $\pm 0,03$	0,22	15,3	19,4	0,86	2,7	10,5	0,31 $\pm 0,1$	1,6	
$\text{Rc}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{Ph}$	i.p.	0,07 $\pm 0,01$	0,20	1,23	5,7	0,70	1,5	1,7	1,2 $\pm 0,3$	17	
	i.v.	0,12 $\pm 0,02$	0,16	26	6,6	0,71	1,4	1,7	0,36 $\pm 0,06$	3	
$\text{Rc}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{Fu}$	i.p.	0,25 $\pm 0,03$	0,45	2,6	9,2	2,7	1,8	3,3	5,9 $\pm 0,8$	24	
	i.v.	0,24 $\pm 0,04$	0,60	9,0	5,1	3,2	4,1	3,3	0,22 $\pm 0,01$	0,9	

Tab. II. Unterschiedliche Thymus-Affinität von $[^{103}\text{Ru}]$ Cinnamoyl-ruthenocen bei adulten und infantilen Tieren. Pro Versuch je 7 CF1 Mäuse bzw. Wistar-Ratten. Dosis: $2\ \mu\text{mol/kg}$ i.p., getötet nach 24 h.

Species	Tiergewicht [g]	Thymusgewicht [%]	% der inj. Dosis/1% Tiergewicht ($\bar{x} \pm \sigma$)				Thymus Muskel
			Muskel	Thymus	Leber	Milz	
Mäuse, adult	28,8	0,25	$0,069 \pm 0,04$	$7,9 \pm 2,9$	$5,3 \pm 0,7$	$5,5 \pm 0,9$	114
Mäuse, infantil	8,9	0,42	$0,088 \pm 0,03$	$2,65 \pm 1,0$	$4,1 \pm 1,0$	$2,6 \pm 1,0$	30,5
Ratten, adult ($n=5$)	160	0,20	$0,036 \pm 0,003$	$13,7 \pm 3$	$6,9 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,7$	387
Ratten, infantil	9,1	0,29	$0,062 \pm 0,008$	$0,38 \pm 0,06$	$2,2 \pm 0,4$	$0,21 \pm 0,05$	6,3

Organ-Verteilung der ^{103}Ru -Aktivität

Tab. I zeigt die Organ-Verteilung von ^{103}Ru nach Applikation von $^{103}\text{RuCl}_3$ und von verschiedenen Ruthenocen-Derivaten bei Mäusen. Nach i. v. Injektion findet man meistens eine hohe Aktivitäts-Anreicherung in der Leber, Lunge und Milz. Demgegenüber zeigt sich nach i. p. Injektion eine wesentlich andere Verteilung der ^{103}Ru -Aktivität auf die Organe. Alle hier untersuchten Verbindungen zeigen nunmehr eine Aktivitätsanreicherung im Thymus, besonders $[^{103}\text{Ru}]$ Cinnamoyl-ruthenocen. (Vergl. letzte Spalte Tab. I.) Diese Verbindung erreicht eine ^{103}Ru -Konzentration im Thymus von 13,4% der inj. Dosis/g und einen Quotienten der Aktivitätskonzentration zwischen Thymus/Muskel von 84 : 1. Vergleiche hierzu auch den Abschnitt „Autoradiographische Befunde“.

Nach i. p. oder i. v. Injektion von $^{103}\text{RuCl}_3$ ist dagegen die Radioaktivitäts-Verteilung in den einzelnen Organen relativ homogen. Auch bei sehr hoher Dosierung bleibt die Relation der Aktivitäts-Konzentration Thymus/Muskel niedrig. Diese relativ gleichmäßige Verteilung der Ruthenium-Ionen im Körper wurde bereits früher von anderen Autoren beschrieben^{6,7}.

Die hohe ^{103}Ru -Anreicherung im Thymus nach i. p. Gabe von $[^{103}\text{Ru}]$ Cinnamoyl-ruthenocen läßt sich auch bei adulten Ratten nachweisen (Tab. II). Gleichzeitig zeigt Tab. II die wesentlich geringere Thymus-Affinität infantiler Mäuse und Ratten.

Um in Tab. II die Werte für die ^{103}Ru -Anreicherung angesichts der unterschiedlichen Tiergewichte besser vergleichbar zu machen⁸, wurde hier die ^{103}Ru -Konzentration im Gewebe immer auf die Organ-Menge bezogen, die 1% des Tiergewichtes ent-

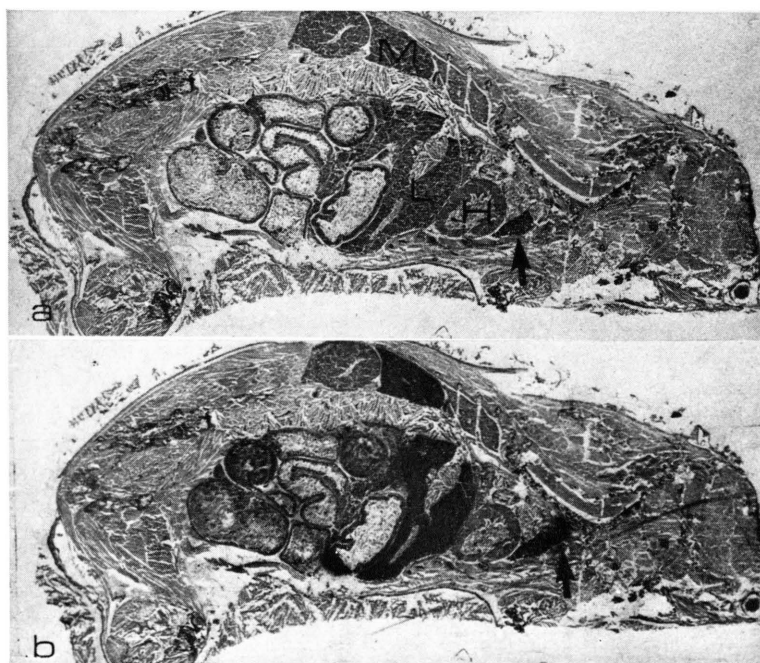


Abb. 2. Ganztier-Schnitt und Autoradiographie einer adulten Maus. a) Schnitt durch Hämatoxylin/Eosin gefärbt. b) Verteilung der ^{103}Ru -Aktivität von $[^{103}\text{Ru}]$ Cinnamoyl-ruthenocen 24 h nach i.p.-Injektion. Starke Markierung von Leber und Milz, außerdem Markierung am Rand des Thymus (Pfeil). Dosis: $15\ \mu\text{Ci/kg}$. Vergrößerung $\times 1,6$.

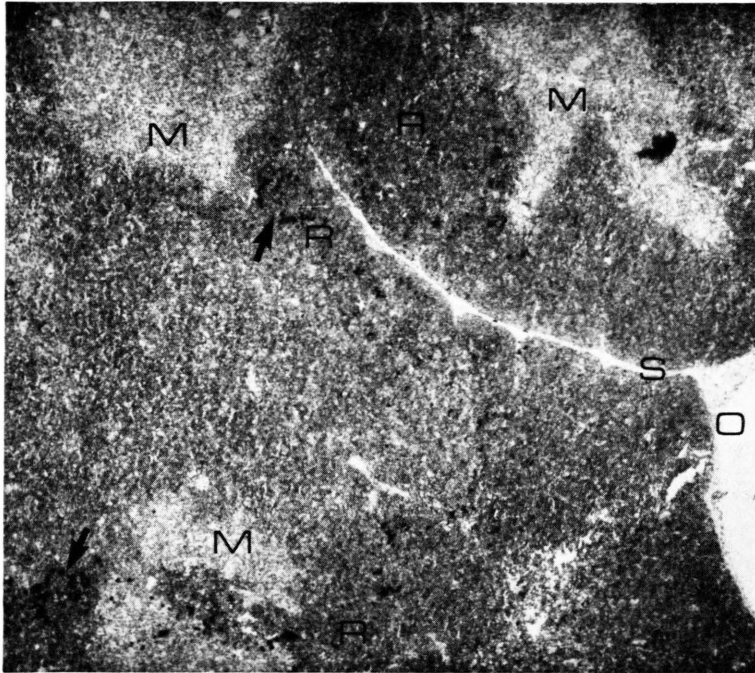


Abb. 3. Übersicht über einen markierten Bereich des Thymus. M, Mark; R, Rinde; O, äußere Oberfläche des Thymus; S, in den Thymus hineinreichendes Septum. Während besonders der Bereich der inneren Rinde eine starke, z. T. follikelartige Markierung aufweist (Pfeil), ist das Mark frei von Radioaktivität. Dosis wie in Abb. 2b. Vergrößerung $\times 168$.

spricht (% der inj. Dosis/% Tiergewicht), d. h. diese Zahlen geben den Anreicherungsfaktor für das betreffende Gewebe an.

Autoradiographische Befunde

Die selektive Anreicherung von ^{103}Ru nach Gabe von [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen in Thymus, Leber und Milz bestätigt die Ganztier-Autoradiographie in Abb. 2.

Die Verteilung der ^{103}Ru -Aktivität im Thymus-Gewebe nach i. p. Injektion des Metallocens wurde mikro-autoradiographisch untersucht. Der auffälligste Befund ist hierbei die inhomogene Verteilung im Thymus. Abb. 3.

Da die in Tab. I aufgeführten Werte für die ^{103}Ru -Konzentration im Thymus natürlich nur Mittelwerte für das Gesamtorgan ergeben, sind demnach die im Thymus vorliegenden lokalen Konzentrationen wesentlich höher. Eine Abschätzung der Relationen ist gegenwärtig nicht möglich.

In den Markierungszonen im Thymus ist nur über der inneren Rinde eine starke Markierung erkennbar, die zum Mark hin eine scharfe Begrenzung aufweist (Abb. 3). Bei stärkerer Vergrößerung wird deutlich, daß diese Markierung der inneren Rinde auf einer Markierung einzelner Lymphocyten beruht. Wegen der relativ hohen Energie der β -Strahlung

von ^{103}Ru (0,21 MeV) ist die Auflösung der Autoradiogramme begrenzt. Deswegen kann nicht sicher festgestellt werden, ob die Markierung der Lymphocyten durch eine Aufnahme der Substanz in die Zellen oder durch Assoziation an die Zellmembran bedingt ist.

Vereinzelt erkennbare Markierungen über Teile des Marks beruhen ebenfalls auf einer Markierung von Lymphocyten. Eine Entscheidung über den Mechanismus der Einwanderung der ^{103}Ru -Aktivität in den Thymus ist aus den autoradiographischen Befunden nicht ableitbar. Eine ^{103}Ru -Anreicherung in den Lymphocyten ist sowohl beim Einwandern bereits markierter Zellen als auch beim Einstrom eines nicht-zellulär-gebundenen ^{103}Ru -markierten Stoffes möglich.

Organ-Verteilung nach Vorbehandlung (Inhibierung des RES)

Die hohe ^{103}Ru -Anreicherung im Thymus von erwachsenen Mäusen wird reduziert, wenn die Tiere vor Injektion von ^{103}Ru -Cinnamoyl-ruthenocen inaktives Cinnamoyl-ferrocen erhalten, vgl. Tab. III. Dagegen läßt sich durch eine nachträgliche Gabe der inaktiven Verbindung die ^{103}Ru -Aktivität aus dem Thymus nicht verdrängen.

Tab. III. Thymus- und Organ-Affinität für $[^{103}\text{Ru}]$ Cinnamoyl-ruthenocen nach Vorbehandlung. Je Versuch 7 CF 1 Mäuse ♂; 24 h nach i.p. Injektion der angegebenen Dosis der ^{103}Ru -markierten Substanz wurde die im Körper verbliebene Radioaktivität gemessen und anschließend die Tiere getötet. Cinn.Fc = Cinnamoyl-ferrocen.

Ziel der Vorbehandlung	Vorbehandlung *	μmol je kg	Rest-akt. im Körper [%]	^{103}Ru -Aktivität in den Organen [% inj. Dosis/g] ($\bar{x} \pm \sigma$)					Relative Thymus-Affinität [%]
				Muskel	Lunge	Leber	Milz	Thymus	
	(Kontrolle)	2,1	43 ± 3	0,16 $\pm 0,02$	0,59 $\pm 0,3$	8,0 $\pm 1,5$	1,9 $\pm 0,4$	13,4 ± 2	=100%
RES-Blockade	3 \times je 1 μmol Cinn. Fc/kg i.p. $t = -5, -4, -3$ Tage	2	54 ± 9	0,23 $\pm 0,05$	1,3 $\pm 0,2$	15,9 ± 3	6,7 $\pm 1,3$	2,8 $\pm 0,9$	21
	8 μmol Cinn. Fc/kg i.p. $t = -1$ h	0,3	22 ± 4	0,09 $\pm 0,02$	1,1 $\pm 0,2$	7,0 $\pm 0,3$	1,2 $\pm 0,2$	1,7 $\pm 0,5$	13
	100 mg Prednisolon i.m. $t = -2$ Tage	1	29 ± 5	0,30 $\pm 0,03$	0,95 $\pm 0,1$	6,4 $\pm 0,9$	2,3 $\pm 0,3$	4,6 $\pm 0,8$	34
Thymus-Suppression ⁹	2 ml 1% Casein i.p. $t = -3$ Tage	1,6	20 ± 3	0,12 $\pm 0,02$	0,83 $\pm 0,1$	6,6 $\pm 1,1$	2,6 $\pm 0,4$	2,5 $\pm 0,8$	19
Stimulierung der Makrophagen-Einwanderung									
Inhibierung der Phagocytose ¹⁰	0,5 mg BeSO_4/kg i.v. $t = -24$ h	2	90 ± 9	0,26 $\pm 0,04$	1,0 $\pm 0,2$	13,3 ± 3	14,8 ± 4	30 ± 7	224
Gesicherter zellulärer Transport	i.v. Injektion von radioakt. Peritoneal-Zellen **	0,3	55 ± 7	0,07 $\pm 0,01$	22,6 ± 4	29,4 ± 5	20,5 ± 3	1,1 $\pm 0,3$	8

* $t=0$ Zeitpunkt der Injektion der ^{103}Ru -Verbindung. ** Vgl. Methodik.

Ein möglicher Mechanismus für den Transport der ^{103}Ru -Aktivität aus der Peritoneal-Höhle nach i. p. Applikation des radioaktiven Metallocens wäre eine Phagocytose durch Makrophagen mit anschließender Wanderung markierter Zellen in das RES und insbesondere in den Thymus. Dann müßte eine durch Corticoide ausgelöste Involution des lymphatischen Gewebes und auch des Thymus ⁹ eine verminderte Thymus-Anreicherung bewirken. Einen umgekehrten Effekt sollte man durch eine Stimulation der Makrophagen-Einwanderung in die Bauchhöhle durch Casein erwarten.

Nach Tab. III zeigen Prednisolon-behandelte Mäuse tatsächlich eine verminderte ^{103}Ru -Konzentration im Thymus. Da sich gleichzeitig das Thymus-Gewicht auf etwa 1/3 der Kontroll-Werte vermindert, fällt unter Corticoid-Zufuhr die ^{103}Ru -Aktivität im Gesamtorgan auf 1/10 der Kontrolle.

Überraschenderweise reduziert auch eine Casein-induzierte Leukapherese die ^{103}Ru -Konzentration im Thymus.

Nach Vacher *et al.* inhibieren Beryllium-Salze bei Ratten und Mäusen die Phagocytose ¹⁰. Wie Tab. II zeigt, hat Beryllium-Sulfat in unserem System ebenfalls einen starken Effekt: Die ^{103}Ru -Konzentration im Thymus steigt (auf 30% der inj. Dosis/g).

Gleichzeitig findet man eine verringerte ^{103}Ru -Elimination.

Markiert man aus dem Bauchraum ausgespülte Makrophagen mit $[^{103}\text{Ru}]$ Cinnamoyl-ruthenocen *in vitro* und injiziert die markierten Zellen i. v., so ist die ^{103}Ru -Konzentration im Thymus sehr gering. Die höchste Konzentration wird in Lunge, Milz (und Leber) gefunden.

Diskussion

Metallocene als Radiopharmaka in der Nuklear-Medizin?

Metallocene sind variationsfähige metall-organische Verbindungen, die sich leicht mit γ -Strahlern markieren lassen ^{1, 2}. Bei der Entwicklung von Radiopharmaka für die Nuklear-Medizin ist die damit gegebene Kombinations-Möglichkeit besonders interessant. Sie gestattet nämlich:

- 1) eine Auswahl der γ -Strahler gemäß den klinischen Erfordernissen. Gewünscht werden: a) minimale Strahlenbelastung (d. h. möglichst kleine Halbwertszeit); b) gutes szintigraphisches Auflösungsvermögen (d. h. Strahlungs-Energie < 500 keV);

- 2) eine Auswahl der chemischen Struktur des Gesamt-Moleküls entsprechend den gewünschten biologischen Eigenschaften. So ist, im Gegensatz zu der Entwicklung von Radiopharmaka durch Chelat-Bildung, mit Metallocen nicht nur die Synthese hydrophiler sondern auch lipophiler Derivate möglich.

Auswahl der γ -Emitter

Der hier verwendet γ -Strahler ^{103}Ru hat eine Halbwertszeit von 39,5 Tagen und eine γ -Energie von 498 keV. Diese physikalischen Daten sind für mögliche klinische Anwendungen geeignet, aber nicht optimal. Auch stört die β -Emission von 210 keV. Ein für die nuklear-medizinische Diagnostik ideales Ruthenium-Isotop ist dagegen ^{97}Ru mit einer Halbwertszeit von 2,9 Tagen und γ -Energien von 215 (91%) und 324 keV (8%). Auch dieses Ru-Isotop läßt sich ohne Schwierigkeiten in einer Einstufen-Reaktion in die Metallocen-Derivate einbauen.

Als Zentralatome für Metallocene sind außerdem weitere Radio-Isotope von Elementen der 8. Nebengruppe des Periodischen Systems geeignet.

Zur Stabilität des Ruthenocen-Systems *in vivo*

Der Unterschied zwischen $^{103}\text{RuCl}_3$ und den ^{103}Ru -markierten Metallocen-Derivaten bei der Exkretion und Organ-Verteilung der ^{103}Ru -Aktivität beweist indirekt die Stabilität der Ruthenocen-Derivate im Organismus. Dieses Ergebnis entspricht früheren Befunden mit hydrophilen Ruthenocen-Derivaten wie Ruthenocen-carbonsäure und Acetyl-ruthenocen^{4-5a}, bei denen ebenfalls kein Anhaltspunkt für das Freisetzen von Ruthenium-Ionen gefunden wurde. Damit ist die entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung von radioaktiven Ruthenocen-Derivaten als Radiopharmaka gesichert. Eine Variation des Grund-Moleküls durch Derivat-Bildung zur Optimierung seiner biologischen Eigenschaften ist nämlich nur sinnvoll, wenn das Metalatom *in vivo* nicht vom organischen Molekül-Teil abgetrennt wird. Ferrocen-Derivate setzen dagegen *in vivo* teilweise das Eisen als Ion frei^{3, 5}.

Nuklear-medizinische Aspekte der ^{103}Ru -Anreicherung im Thymus

Unabhängig von allen biochemischen Interpretationen ist die starke Anreicherung eines γ -Strahlers

(hier ^{103}Ru) im Thymus von erheblichem Interesse für die Nuklear-Medizin.

Die hohe Thymus-Anreicherung von Cinnamoyl-ruthenocen scheint nicht primär durch den lipophilen Charakter der Verbindung bedingt zu sein. Andere lipophile [^{103}Ru]Ruthenocen-Derivate (Acetyl-ruthenocen, Ruthenocen-dicarbonsäure-dimethylester) zeigen keine Thymus-Affinität bei Mäusen weder nach i. v. noch i. p. Injektion.

Um die Thymus-Affinität von Cinnamoyl-ruthenocen mit der Anreicherung anderer Radiopharmaka in anderen Organen zu vergleichen, kann man nach Emmrich *et al.*¹¹ einen „Index“ nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Index} = (\% \text{ inj. Dosis} / \% \text{ Tiergewicht}) \cdot \frac{\text{Akt.-Konz. im Zielorgan}}{\text{Akt.-Konz. im Muskel}}$$

Für [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen ergeben sich aus Tab. II folgende Werte:

Thymus-Index . . . für Mäuse 900; . . . für Ratten 5300.

Dieser Organ-Index ist durchaus vergleichbar mit „Indices“ für andere Gewebe, in denen sich klinisch gebräuchliche Radiopharmaka anreichern und sie damit szintigraphisch darstellbar machen. Vergleiche hierzu auch die Gegenüberstellung der Nieren-Affinität von ^{103}Ru -Ruthenocen-carbonsäure und verschiedenen $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierten Radiopharmaka zur Nieren-Szintigraphie in ref. 4.

Mögliche biologische und biochemische Ursachen für die ^{103}Ru -Anreicherung im Thymus nach Applikation von [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen

Die Versuche zeigen für verschiedene ^{103}Ru -markierte Verbindungen eine Thymus-Anreicherung, wenn sie intraperitoneal injiziert werden, weit weniger jedoch nach i. v. Injektion. Vergl. Tab. I. Am stärksten ist dieser Effekt beim [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen. Da die im Thymus befindliche ^{103}Ru -Aktivität zu einem großen Teil mit Lymphocyten assoziiert vorliegt (vergl. Abb. 2 und 3), ist eine Anreicherung im Thymus nach i. p. Injektion von [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen auf 3 Wegen denkbar:

- 1) In die Peritoneal-Höhle einwandernde Lymphocyten, Granulocyten und Makrophagen nehmen durch Phagocytose die Verbindung in sich auf und kommen anschließend über den Blut-Kreislauf in das RES insbesondere in den Thymus.
- 2) Die i. p. applizierte und dort resorbierte Substanz wird über die Pfortader zur Leber trans-

Vorbehandlung (vgl. Tab. II)	Relativer ^{103}Ru -Gehalt in den Organen [in % der unbehandelten Kontrollen]			
	Thymus	Leber	Milz	Lunge
RES-Blockade ($1 \times \text{Cinn.Fc}$)	13 *	88	63 *	15 *
Thymus-Suppression (Predisolon)	34 *	80	121	161
Makrophagen-Einwanderung (Leukapherese durch Casein)	19 *	83	137 *	141
Inhibierung der Phagocytose (BeSO_4)	224 *	166 *	780 *	169 *
Zellulärer Transport ** (radioakt. Peritoneal-Zellen i.v.)	8 *	368 *	1080 *	3830 *

* Signifikant gegenüber Kontrollwert $p \leq 0,01$.

** Beladung der Peritoneal-Zellen vgl. Methodik Cinn. Fc = Cinnamoyl-ferrocen.

Tab. IV. ^{103}Ru -Organverteilung nach Gabe von ^{103}Ru Cinnamoyl-ruthenocen an vorbehandelten Mäusen (umgerechnet aus Tabelle II).

portiert* und dort in einen Thymus-affinen Metaboliten verwandelt, der — evtl. nach Protein-Bindung — über den Kreislauf den Thymus erreicht. Dort wird die Substanz von den Thymocyten gebunden; die so markierten Zellen bleiben im Thymus.

- 3) Das lipophile Cinnamoyl-ruthenocen erreicht nach Resorption und Bindung an Lipoproteine bzw. Chylomikronen *via* Lymphe den Thymus. Der gleiche Mechanismus müßte dann auch nach i. m. Injektion wirksam sein. Nach i. m. Injektion wird aber keine Thymus-Anreicherung gefunden.

Um diese Alternativen zu prüfen, wurden die Versuche gemäß Tab. II durchgeführt. Tab. IV faßt für die Diskussion diese Ergebnisse als Relativ-Zahlen zusammen.

Einwanderung markierter Lymphocyten in den Thymus?

Gegen die Hypothese einer Einwanderung bereits markierter Lymphocyten in den Thymus spricht am stärksten das Ergebnis gemäß letzter Zeile von Tab. IV. Danach sind aus dem Peritoneum ausgespülte und *in vitro* mit ^{103}Ru Cinnamoyl-ruthenocen beladene Makrophagen nach i. v. Injektion nicht in der Lage, den Thymus zu markieren. Sie reichern sich dagegen in Leber, Milz und Lunge an (Faktor 4 – 38 gegenüber den Kontrollwerten). Die-

ses Verteilungs-Muster i. v. injizierter Zellen entspricht den Befunden von Barth *et al.* mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierten Thymocyten: Die markierten Thymocyten wurden in Leber und Milz (teilweise auch in der Lunge) nicht jedoch im Thymus gefunden¹².

Falls die ^{103}Ru -Aktivität im Thymus durch Einwanderung markierter Leucocyten zu erklären ist, müßte man auch nach i. v. oder i. m. Injektion die starke Thymus-Anreicherung sehen, da eine Phagocytose durch Makrophagen nicht nur nach i. p. Injektion möglich ist. Dies ist aber nicht der Fall.

^{103}Ru -Anreicherung im Thymus durch Metabolisierung von ^{103}Ru -Cinnamoyl-ruthenocen?

Die unterschiedliche ^{103}Ru -Anreicherung im Thymus nach i. p. bzw. i. v. Injektion von ^{103}Ru Cinnamoyl-ruthenocen beruht möglicherweise auf einer unterschiedlichen Metabolisierung. Erste Versuche beweisen tatsächlich, daß Cinnamoyl-ruthenocen in der Leber erheblich metabolisiert wird und daß dabei Unterschiede bei i. v. bzw. i. p. Injektion auftreten¹³.

Durch diese Hypothese läßt sich auch die verringerte Aktivitätsaufnahme im Thymus infantiler Tiere erklären (Tab. II): Wegen der noch unvollkommenen Enzymausstattung der Leber jugendlicher Tiere kommt es zu einer verminderten Umwandlung des Metallocens in einem Thymus-affinen Metaboliten.

In dieser Hinsicht ist auch der Einfluß von Beryllium-Sulfat auf die Verteilung von ^{103}Ru nach Applikation von ^{103}Ru Cinnamoyl-ruthenocen bemerk-

* Man beachte, daß nach i. v. Injektion die Substanz primär Herz und Lunge und erst danach die Leber erreicht.

kenswert (Tab. IV), der zu einem Anstieg der ^{103}Ru -Konzentration im Thymus führt. Für diesen Effekt bietet sich folgende Erklärung an: Durch die Inhibierung der Phagocytose durch Beryllium-Sulfat¹⁰ wird weniger Metalloccen von Lymphocyten aufgenommen und steht somit vermehrt einer Metabolisierung zu einem Thymus-affinen Metaboliten zur Verfügung.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Der Mechanismus der Thymus-Anreicherung nach i. p. Injektion von [^{103}Ru]Cinnamoyl-ruthenocen ist eher im Sinne der Spezifität eines (in der Leber) entstehen-

den Metaboliten für das Thymus-Gewebe bzw. für die Thymocyten deutbar; der selektive Einstrom bereits markierter Lymphocyten in den Thymus erscheint unwahrscheinlicher.

Eine endgültige Klärung dieser Fragen ist aber erst nach Isolierung und Testung der einzelnen Metaboliten des Cinnamoyl-ruthenocens möglich.

Diese Arbeiten wurden durch Mittel des Bundesministeriums für Forschung und Technologie unterstützt. Wir danken Prof. Schlögl, Universität Wien, für hilfreiche Ratschläge, Frau Brüggener u. Herrn Kamann für interessierte experimentelle Mitarbeit.

¹ D. Langheim, M. Wenzel u. E. Nipper, Chem. Ber. **108**, 146–154 [1975].

² E. Stadlbauer, E. Nipper u. M. Wenzel, J. labelled Comp., im Druck [1977].

³ J. L. Madenaveitia, Brit. J. Pharmacol. **24**, 352–359 [1965].

⁴ M. Wenzel, E. Nipper u. W. Klose, J. Nuclear Med. **18**, 367–372 [1977].

⁵ M. Wenzel, N. Subramanian u. E. Nipper, Naturwissenschaften **63**, 341 [1976].

^{5a} A. J. Taylor u. M. Wenzel, Naturwissenschaften **64**, 273 [1977].

⁶ J. E. Furchner, C. Richmond u. G. Drake, Health Physics **21**, 355–365 [1971].

⁷ D. Seidel, A. Catsch u. K. H. Schweer, Strahlentherapie **122**, 595–610 [1963].

⁸ M. J. Roo, J. Nucl. Biol. Med. **16**, 62–72 [1972].

⁹ G. A. Santisteban u. T. F. Dougherty, Endocrinology **54**, 130–146 [1954].

¹⁰ J. Vacher, R. Deraedt u. J. Benzoni, J. Reticulorndothel. Soc. **14**, 48–55 [1974].

¹¹ D. Emrich, A. von zur Mühlen, F. Wilgeroth u. A. Lam-mich, Acta Radiol. **11**, 566–575 [1972].

¹² R. Barth u. O. Singla, J. Nuclear Med. **16**, 633–638 [1975].

¹³ E. Nipper, Dissertation FU Berlin 1977.

¹⁴ K. Schlögl, Monatsh. Chem. **88**, 601–608 [1957].

¹⁵ E. R. Hauser u. J. K. Lindsay, J. Org. Chem. **22**, 906–910 [1957].

¹⁶ M. Wenzel u. A. Abdul Wahid, Int. J. Appl. Radiat. Isotopes **26**, 119–123 [1975].

¹⁷ Messung von Isotopen (H. Simon, hrsg.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974.