

Stoffwechselfersuche mit radioaktiv markiertem Buttergelb*.

Von

W. Zischka, K. Karrer, O. Hromatka und E. Broda.

Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut
und dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 28. Juni 1954.)

Mit Radiokohlenstoff am Kern markiertes Buttergelb wurde an Ratten verfüttert. Nach Ablauf bestimmter Zeit wurde die spezifische Radioaktivität des Kohlenstoffs in Organen der Tiere bestimmt. Die spezifische Aktivität des Kohlenstoffs ist in manchen anderen Organen von der gleichen Größenordnung wie in der Leber. Auffallend hohe und lange andauernde Aktivität zeigt das Blut, und zwar ist die Aktivität mit den Blutkörperchen vergesellschaftet. Der Radiokohlenstoff wird aus dem Körper innerhalb weniger Wochen ausgeschieden, und zwar hauptsächlich durch den Harn, zu einem geringeren Teile durch die Faeces. Kein Radiokohlenstoff wird veratmet.

Einleitung.

Das sogenannte Buttergelb (p-Dimethylamino-azobenzol) ist ein fettlöslicher Farbstoff, der durch Jahrzehnte zum Färben von Butter, Käse und Margarine verwendet wurde. Im Jahre 1936 wurde zuerst von *Kinosita*¹ und in der Folgezeit von einer großen Anzahl Autoren² berichtet, daß Buttergelb bei Ratten nach entsprechend langer Fütterung in einem hohen Prozentsatz nach anfänglicher Leberschädigung zum Auftreten von Lebercirrhose, Leberadenomen und schließlich Lebercarcinomen führt. Seither sind zahlreiche morphologische^{3, 4, 5},

* Herrn Prof. Dr. L. Ebert zum 60. Geburtstag in Verehrung zugeeignet.

¹ R. Kinosita, Trans. Soc. Path. Japon. 27, 665 (1937).

² Siehe J. Zeithofer, Der Krebsarzt 6, 154 (1951).

³ N. Brock, H. Druckrey und H. Hamperl, Z. Krebsforsch. 50, 431 (1940).

⁴ E. L. Opie, J. Exper. Med. 80, 231 (1944).

⁵ Siehe J. A. Miller und E. C. Miller, Advances in Cancer Research 1, 339 (1953).

chemische^{5, 6} und pharmakologische⁷ Untersuchungen angestellt worden, die der Aufklärung der Wirkungsweise des Buttergelbs dienen sollen. Unter anderem wurden die Abhängigkeit der Krebszerzeugung von der Dosis⁷ und der Abbau des Buttergelbs im Tierkörper untersucht⁵.

Zur Aufklärung des Stoffwechsels ist offenbar die Verwendung *markierten* Buttergelbs von großem Vorteil. Tatsächlich ist Buttergelb mit schwerem Stickstoff, mit schwerem inaktiven Kohlenstoff und auch mit langlebigem radioaktiven Kohlenstoff markiert worden, und zwar im letzteren Falle an den Methylgruppen⁸. Da aber zu vermuten ist, daß die Verfolgung des Weges des Benzolkern-Kohlenstoffs im Körper mehr Aufschluß über den Mechanismus der Krebsentstehung geben wird, als die Verfolgung des Weges des Methyl-Kohlenstoffs, wurde neuerdings aus Radioanilin ein am Benzolkern markiertes Buttergelb hergestellt⁹. Dieses Buttergelb enthält Radiokohlenstoff in dem Benzolring, der die Dimethylaminogruppe nicht enthält, und zwar ausschließlich in der der Azogruppe benachbarten Stellung.

Um nun den Weg dieses Kohlenstoffs im Körper zu verfolgen, haben wir einer Anzahl Ratten je eine Portion Buttergelb per os zugeführt. Von einer Mehrfachfütterung wurde zunächst abgesehen, um möglichst einfache Versuchsbedingungen zu schaffen. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden die Tiere getötet und mehrere Organe auf Radioaktivität geprüft. Diese zeigt an, welcher Teil des Kohlenstoffs, der im Buttergelb die genannte Stellung einnimmt, sich zur gegebenen Zeit im betreffenden Organ befindet. Der Kohlenstoff kann natürlich in Form von intaktem Buttergelb oder von Abbauprodukten vorliegen.

Experimentelle Durchführung.

Die verwendeten Tiere männlichen und weiblichen Geschlechtes entstammen einem seit Jahren am Institut für Pathologische Anatomie fortgezüchteten gesunden Rattenstamm, der in üblicher Weise mit Nahrungsmittelabfällen gefüttert wird. Eine besondere Diät wurde nicht eingehalten. Das Körpergewicht der verwendeten Tiere betrug im Mittel etwa 250 g, streute jedoch beträchtlich.

Nach einer Hungerperiode von 24 Stdn. wurden mittels Schlundsonde 3 mg markierten Buttergelbs in 0,8 ml Olivenöl direkt in den Magen der Tiere eingebracht. Jede Portion enthielt 0,25 Microcurie Radiokohlenstoff, entsprechend etwa 555 000 Zerfällen pro Min. Die Sonde wurde mit 1 ml Olivenöl nachgespült. Die verabreichte Menge wurde von den Tieren gut vertragen.

Wurden die Tiere innerhalb von 24 Stdn. nach der Fütterung getötet,

⁶ H. v. Euler, B. v. Euler und H. Hasselquist, Z. Krebsforsch. 59, 652 (1954).

⁷ H. Druckrey und K. Küpfmüller, Z. Naturforsch. 3 b, 254 (1948).

⁸ Siehe Anm. 9.

⁹ O. Hromatka und L. Schlager, Mh. Chem. 85, 29 (1954).

so bekamen sie keine weitere Nahrung. Erfolgte die Tötung dagegen erst zu einem späteren Zeitpunkt, so erhielten sie wieder ihr gewohntes Futter. Die Tiere wurden durch Nackenschlag getötet, sofort obduziert und die zu untersuchenden Organe entnommen. Die Organe wurden sofort weiterverwendet; für eventuelle Mehrfachbestimmungen, wie sie bisweilen notwendig waren, wurden sie bei -20°C gelagert. Um Verluste zu vermeiden, wurde von einer Homogenisierung abgesehen. Es ist zwar damit zu rechnen, daß verschiedene Teile des gleichen Organs verschiedene Aktivitäten aufweisen können, doch dürfte der dadurch verursachte Fehler beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen keine große Rolle spielen.

Zum Zwecke der Messung der Radioaktivität wurde eine hinreichende Menge des Organs nach der Methode von *Van Slyke* und *Folch* naß verbrannt. Die entstandene Kohlensäure wurde mit Natronlauge aufgefangen und mit Bariumion gefällt. Aus dem erhaltenen Bariumkarbonat, das auch längere Zeit gelagert werden kann, wurde schließlich die Kohlensäure mit Säure wieder in Freiheit gesetzt und — ohne Zumischung von Fremdgasen — zur Füllung eines Gas-*Geiger*-Zählrohres verwendet¹⁰. Da die Meßausbeute mit diesem Gerät nicht weit unter 100% liegt, können selbst sehr geringe Aktivitäten, wie sie tatsächlich bei den meisten vorliegenden Versuchen herrschen, noch gemessen werden. In der Regel wurde jede Probe einmal 16 Min. gemessen, das Zählrohr also bloß einmal gefüllt. In einer Anzahl von Fällen wurde die Füllung und Messung jedoch mehrmals durchgeführt; dann wurden die arithmetischen Mittel der Einzelwerte eingesetzt.

Zur Auswertung wurde vorsichtigerweise angenommen, daß unter den gegebenen Meßbedingungen nur Aktivitäten sicher nachweisbar und daher signifikant sind, wo die gemessene Stoßzahl den Leerwert von 47 bis 67 Stöße pro Min. (je nach dem verwendeten Zählrohr) um mindestens vier Stöße übertrifft; diese Schätzung zieht einerseits die statistische Schwankung von Aktivität der Probe und Leerwert, andererseits auch die Möglichkeit von Unsicherheiten bei der Messung in Betracht. Aktivitäten von drei oder weniger wurden daher in Tabelle 1 als „Null“ eingezeichnet; in Wirklichkeit mögen manche dieser Aktivitäten reell gewesen sein.

Ergebnisse.

Die Werte für die spezifischen Aktivitäten in Tabelle 1 sind die unmittelbar gemessenen experimentellen Werte nach Abzug des Leerwertes, wenn die Füllung des Zählrohres bis zum Normaldruck erfolgte. Wenn der Fülldruck andererseits vom Normaldruck abwich, so wurde auf Normaldruck umgerechnet. Eine Normalfüllung entspricht 8,57 mg Kohlenstoff.

Außer den in Tabelle 1 genannten Organen wurden in einigen Fällen auch andere Organe gemessen, nämlich Knochen (Femur) und Haut, doch wurde in ihnen keine Aktivität gefunden.

Um die Darstellung der Ergebnisse übersichtlicher zu gestalten, sind in Tabelle 2 die jeweils in bestimmten Zeitintervallen liegenden Zahlenwerte der Tabelle 1 zu Mittelwerten zusammengezogen.

¹⁰ *G. Rohringer* und *E. Broda*, *Z. Naturforsch.* 8 b, 159 (1953).

Tabelle 1. Spezifische Aktivitäten des Kohlenstoffs in den Organen.

Versuch Nr.	Zeit nach Fütterung (Std.)	Organ						
		Leber	Niere	Blut	Milz	Lunge	Skelett- muskel	Hirn
23	2	23	25	14	19	35	11	—
24	2	25	28	17	18	19	9	4
25	2	45	19	29	9	25	7	10
26	6	38	36	40	18	22	14	—
27	6	37	39	29	62	45	7	14
28	6	80	43	46	21	38	10	18
1	10	40	64	38	14	—	—	5
2	10	54	26	28	28	—	—	5
21	10	58	82	40	17	28	30	12
22	10	160	93	63	44	36	22	—
3	24	32	19	29	16	10	7	0
19	24	32	35	58	16	15	0	15
20	24	31	33	25	10	48	8	16
5	48	12	16	37	12	11	0	5
11	48	10	7	8	9	18	4	4
12	48	13	12	18	5	16	5	0
17	72	14	7	55	9	15	0	0
18	72	14	13	41	0	13	10	0
8	75	13	5	25	5	12	0	0
9	93	9	5	22	0	15	8	0
10	120	8	5	10	0	12	0	0
32	168	—	—	0	—	—	—	—
29	240	8	8	8	0	0	0	—
13	264	6	7	34	0	7	0	—
14	264	0	17	7	0	7	0	—
16	360	0	0	12	0	9	0	—
15	408	0	7	—	0	4	0	—
33	456	—	—	5	—	—	—	—
30	840	—	—	0	—	—	—	—
6	888	0	0	—	0	6	0	0
7	984	0	6	—	0	0	0	0

Aus den in Tabellen 1 und 2 zusammengefaßten spezifischen Aktivitäten lassen sich die Gesamtaktivitäten der Organe berechnen, wenn die Kohlenstoffmengen in diesen Organen bekannt sind. Diese Kohlenstoffmengen wurden durch Multiplikation der Organgewichte mit ihren Kohlenstoffgehalten berechnet. Werte dieser Kohlenstoffgehalte, die allerdings am Menschen bestimmt worden waren, wurden der Literatur¹¹ entnommen. Es ergeben sich die Werte der Tabelle 3. Der Einfachheit halber sind nur die Ergebnisse zur Zeit der maximalen Aufnahme an Radiokohlenstoff (6 und 10 Std.) angeführt. Das Gewicht des Blutes

¹¹ H. Vierordt, Anatomische, physiologische und physikalische Daten und Tabellen. Jena. 1888.

Tabelle 2. Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten.

Versuch Nr.	Zeit nach Fütterung (Stdn.)	Organ						
		Leber	Niere	Blut	Milz	Lunge	Muskel	Hirn
23, 24, 25	2	31	24	20	15	26	9	7
26, 27, 28	6	52	39	38	34	35	10	16
1, 2, 21, 22	10	78	66	42	26	32	26	7
3, 19, 20	24	32	29	37	14	24	5	10
5, 11, 12	48	12	12	21	9	15	3	3
8, 17, 18	72—75	14	8	40	5	13	3	0
9, 10, 32	93, 120, 168	9	5	11	0	13	4	0
29, 13, 14	240—264	5	11	16	0	5	0	—
15, 16, 33	360—456	0	3	8	0	6	0	—
30, 6, 7	840—984	0	3	—	0	3	0	0

Tabelle 3. Gesamtaktivitäten der Organe.

Organ	Mittleres Organgewicht (g)	Normalkohlen- stoffgehalt (%)	Mittlere Kohlenstoff- menge im Organ (mg)	Mittlere spezi- fische Aktivität pro mg C und Min.	Gesamt- aktivität pro Min.
a) Nach 6 Stdn.					
Leber	6,08	15,9	970	6,1	5900
Niere	0,50	8,7	43	4,6	200
Blut	16,67	11,5	1900	4,4	8400
Milz	0,55	12,1	67	4,0	270
Lunge . . .	1,54	10,7	160	4,1	660
Muskel . . .	86,7	11,7	10000	1,2	12000
Hirn	1,12	12,6	140	1,9	270
b) Nach 10 Stdn.					
Leber	4,91	15,9	780	9,1	7100
Niere	0,67	8,7	58	7,7	450
Blut	10,57	11,5	1200	4,9	5900
Milz	0,31	12,1	37	3,0	110
Lunge . . .	1,52	10,7	160	3,7	600
Muskel . . .	69,5	11,7	8100	3,0	24000
Hirn	0,96	12,6	120	0,82	100

wurde mit $\frac{1}{13}$, das der Muskulatur mit $\frac{2}{5}$ des Körpergewichtes eingesetzt.

Da das an jede Ratte verfütterte Buttergelb eine Gesamtaktivität von 555000 min^{-1} aufwies, erkennt man durch Vergleich mit Tabelle 3, daß der beobachtete Höchstgehalt der Leber im Mittel nur etwa 1,3% des gesamten, dem Tier zugeführten Radiokohlenstoffs betrug. In Experimenten mit Buttergelb, das mit schwerem Stickstoff markiert worden war, wurde eine Aufnahme durch die Leber in etwas kleinerem

Ausmaß gefunden¹². Der Höchstgehalt einer Niere (10 Stdn.) beträgt im Mittel 0,08, der Milz (6 Stdn.) 0,05, der Lunge (6 Stdn.) 0,01, der Muskeln (10 Stdn.) 4,3, des Gehirns (6 Stdn.) 0,05 und des Blutes (6 Stdn.) 1,5%. Damit erhebt sich die Frage nach dem Verbleib der Hauptmenge des Radiokohlenstoffs.

Zur Feststellung dieses Verbleibes wurden fallweise Aktivitätsbestimmungen an verschiedenen Wandabschnitten des Verdauungstraktes, am Inhalt des Magen-Darmkanals sowie an Harn, Faeces und der Atemluft vorgenommen. Diese Bestimmungen sind naturgemäß weniger exakt als jene an den Organen der Tiere. Es ergab sich jedoch einwandfrei, daß die Hauptmenge des Radiokohlenstoffs den Körper mit dem Harn verläßt, ein Ergebnis, das damit im Einklang steht, daß auch schwerer Stickstoff aus markiertem Buttergelb hauptsächlich durch den Harn ausgeschieden wird¹².

Die Aktivität der ausgeatmeten Kohlensäure wurde acht Stunden nach Fütterung an einem Tier bestimmt. Es wurde keinerlei meßbare Aktivität festgestellt. Daraus ergibt sich, daß äußerstenfalls ein verschwindender Bruchteil des Radiokohlenstoffs mit der Atemluft den Körper verlassen haben kann. Dieses Ergebnis steht in interessantem Kontrast zu den Befunden früherer Autoren (siehe ⁵), die nach Markierung des Buttergelbs an der Methylgruppe einen Hauptteil des Radiokohlenstoffs in der Atemluft fanden.

Die Bestimmungen am Inhalt des Verdauungstraktes ergaben, daß der Mageninhalt nach 24 Stdn. nur mehr wenige Prozent der Aktivität aufweist, die er 10 Stdn. nach der Fütterung hatte und daß nach 48 Stdn. keine Aktivität mehr nachweisbar ist. Auch der Dünndarminhalt ist nach 24 Stdn. nur mehr wenig aktiv, während die Aktivitäten der Dickdarminhalte nach 10 und nach 24 Stdn. ähnlich sind; 48 und 72 Stdn. nach der Fütterung findet sich im Dickdarminhalt nur mehr wenig Aktivität. Während aber die Aktivität von Magen und Dünndarm entsprechend dem physiologischen Resorptionsgefälle im Inhalt stets höher ist als in der Wand, um schließlich in beiden nach 48 Stdn. zu verschwinden, fällt im Falle des Dickdarms auf, daß hier in den ersten 2 Tagen zunächst ebenfalls ein gleiches Verhalten nachweisbar ist, dann aber am 3. Tag eine Umkehr stattfindet und jetzt bei 2 angestellten Versuchen die Werte in der Dickdarmwand höher liegen als gleichzeitig im Dickdarminhalt (Tier 17: spezifische Aktivität im Dickdarminhalt 16, in der Dickdarmwand 110; Tier 18: spezifische Aktivität im Dickdarminhalt 0, in der Dickdarmwand 30).

Die nähere Untersuchung des Blutes ergab, daß die Aktivität aus dem Blutplasma relativ rasch verschwindet, in den Erythrocyten aber

¹² *M. Berenbom und J. White, J. Nat. Cancer Inst. 12, 583 (1951).*

lange nachweisbar bleibt und hier weniger mit dem Hämoglobin, mit den lipoiden Blutschatten vergesellschaftet ist. Daß gerade die Blutkörperchen Aktivität festhalten, ist schon früher bei Versuchen mit 3'-Methyl-¹⁴C-dimethylamino-azobenzol festgestellt worden (siehe ⁵).

Wurde die Öllösung von Buttergelb in vitro einer 10%igen Aufschwemmung von Hammelerythrocyten zugesetzt, wiederholt geschüttelt und wurden nach 2 Tagen die Erythrocyten gewaschen und hämolysiert, so ergaben die Blutschatten ebenfalls eine Radioaktivität.

Ein orientierender, unter gleichen Bedingungen wie bei den Ratten durchgeführter Versuch mit Meerschweinchen ergab 2 Tage nach der Fütterung eine relativ hohe Aktivität in der Galle bei noch höherer Aktivität in den Blutschatten und sehr geringer Aktivität im Serum.

Diskussion.

Die Einzelwerte, die die Grundlagen der Tabellen 1 bis 3 bilden, streuen natürlich in erheblichem Maße. Diese Streuung ist wohl einerseits auf die biologische Variabilität des Versuchsmaterials (unter anderem hatten die Tiere verschiedenes Gewicht und Alter), andererseits auf eine Verschiedenheit des weiter unten noch zu besprechenden Blutgehaltes der Organe zurückzuführen. Im ganzen ist aber die Glätte der Kurven, die den zeitlichen Verlauf der Aktivität der einzelnen Organe wiedergeben, doch bemerkenswert.

Zunächst ist festzustellen, daß der Hauptteil des Radiokohlenstoffs bei der hier verwendeten Dosierung durch einmalige Gabe innerhalb der ersten zwei Tage aus dem Verdauungskanal aufgenommen wird. Er verläßt den Körper hauptsächlich mit dem Harn, in viel geringerem Maße mit Galle und Stuhl, wobei aus dem Dickdarm vom dritten Tag nach Fütterung ebenfalls eine Ausscheidung stattfinden dürfte.

Der relative Gehalt der einzelnen Organe (spezifische Aktivität ihres Kohlenstoffs) ist in den ersten Tagen nicht sehr verschieden. So bleibt z. B. die Niere kaum hinter der Leber zurück. Die Aktivität aller Organe nimmt mit der Zeit überraschend schnell ab, doch zeigen unsere Versuche, daß das Blut eine Ausnahme bildet.

Da die spezifische Aktivität des Blutes besonders hoch ist, und zwar über einen längeren Zeitraum, muß wohl ein bedeutender Teil der Aktivitäten der Organe auf ihren Blutgehalt zurückgeführt werden. Daher dürften auch die Aktivitäten des Gehirns, des Muskels und der Lunge zum Großteil durch den Blutgehalt verursacht sein, wobei beim Gehirn und der Lunge zu berücksichtigen ist, daß beim Töten der Tiere durch Nackenschlag Parenchymblutungen unvermeidbar sind.

Die hohe Aktivität des Blutes steht offenbar mit dem hohen Buttergelbgehalt des Blutes im Zusammenhang, da ein solcher nach chemischen

Methoden^{5, 6} nachgewiesen worden ist. Dabei fällt aber besonders auf, daß das Blut noch zu einer Zeit eine relativ hohe Aktivität aufweist, wenn Resorption, Transport und Ausscheidung des zugeführten Buttergelbs oder seiner Abbauprodukte bereits als abgeschlossen angesehen werden können. Dieser Befund läßt die Möglichkeit eines nach erfolgter massiver Ausscheidung des Buttergelbs in der Folge durch längere Zeit wiederholt auftretenden Stimulus der Milz und vor allem der Leber durch Produkte des Erythrocytenunterganges zu. Für Zusammenhänge dieser Art spricht das frühzeitige Auftreten von Milzvergrößerung nach fortgesetzter Buttergelbfütterung^{5, 6}. Sollte dies zutreffen, so wäre wohl zu erwarten, daß bei noch empfindlicherer Messung der Aktivität in der Leber durch längere Zeiträume minimale Aktivitäten nachweisbar sind.

Es wäre aber andererseits auch denkbar, daß das Buttergelb in der Leber Störungen hervorruft, die selbständig weiterwirken, nachdem es selbst oder seine Abbauprodukte die Leber endgültig verlassen haben. Einen solchen Mechanismus könnte man formell mit jenem der Krebsentstehung durch Strahlung vergleichen. Auch in diesem Falle bleibt ja das krebserzeugende Agens selbst, also die Strahlung, nicht im Gewebe erhalten.

Ob der eine oder der andere Mechanismus zutrifft, soll durch weitere Versuche geprüft werden. In diesem Zusammenhang muß natürlich auch untersucht werden, ob Radiokohlenstoff, durch den das Buttergelbmolekül an anderer Stelle markiert ist, ähnliches Verhalten im Stoffwechsel zeigt wie der in den vorliegenden Versuchen verwendete Radiokohlenstoff.

Wir danken der *Sonnleitner*-Stiftung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften und der Österreichischen Gesellschaft zur Erforschung und Bekämpfung der Krebskrankheit für großzügige finanzielle Unterstützung. Wir sprechen auch dem *Damon-Runyon*-Fonds für Krebsforschung für ein wertvolles Stipendium an das I. Chemische Laboratorium unseren Dank aus, während dessen Laufzeit diese Arbeit abgeschlossen wurde. Schließlich sind wir Herrn Professor Dr. *H. Chiari* und Herrn Professor Dr. *L. Ebert* für ihr tatkräftig förderndes Interesse an dieser Arbeit und Herrn *Richard Stark* für wertvolle aktive Mitarbeit bei den langwierigen Messungen zu Dank verpflichtet.