

Stoffwechselversuche mit radioaktiv markiertem Echtgelb*.

Von

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

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

(Eingelangt am 1. April 1955.)

Ratten wurden mit radioaktiv markiertem (wasserlöslichem) Echtgelb gefüttert. Der Radiokohlenstoff verteilte sich in qualitativ ähnlicher Weise wie bei Verfütterung des (fettlöslichen) Buttergelbs über die Organe, doch verliefen Aufnahme und Abgabe schneller. Die Ausscheidung erfolgte auch beim Echtgelb im wesentlichen durch den Harn. Für den Unterschied in der krebsereggenden Wirkung der beiden Farbstoffe können ihre Löslichkeitseigenschaften daher nicht unmittelbar verantwortlich gemacht werden.

Einleitung.

In unseren Laboratorien sind Stoffwechselversuche mit Buttergelb (p-Dimethylamino-azobenzol) an Ratten vorgenommen worden¹. Der Farbstoff war an dem der Azogruppe benachbarten Kohlenstoffatom jenes Benzolkernes radioaktiv markiert worden, der die Dimethylaminogruppe nicht trägt². Buttergelb erzeugt bekanntlich Leberkrebs³. Daß der Krebs gerade in der Leber auftritt, wird häufig mit der Fettlöslichkeit des Farbstoffes oder eines wirksamen Abbauproduktes in Zusammenhang gebracht, die eine Ablagerung im fettreichen Lebergewebe ermöglichen soll^{4, 5, 6}.

* Herrn Professor Dr. *Emil Abel* in Verehrung zum 80. Geburtstag gewidmet.

¹ *W. Zischka, K. Karrer, O. Hromatka* und *E. Broda*, Mh. Chem. **85**, 856 (1954).

² *O. Hromatka* und *L. Schlager*, Mh. Chem. **85**, 29 (1954).

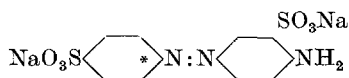
³ Siehe besonders *J. A. Miller* und *E. C. Miller*, *Advances in Cancer Research* **1**, 339 (1953).

⁴ *G. Hecht* und *A. Winkler*, *Arzneimittelforsch.* **2**, 192 (1952).

⁵ Siehe z. B. *Parlamentskorrespondenz* (Österreichischer Nationalrat) vom 11. Oktober 1950.

⁶ Siehe *Kommissionsbericht, Z. Unters. Lebensmittel* **96**, 98 (1953).

Eine analoge Prüfung des Stoffwechsels eines wasserlöslichen Azofarbstoffes war daher von Interesse. Als Farbstoff wurde Echtgelb (Natriumsalz der 4-Aminoazobenzol-3,4'-disulfonsäure) gewählt. Das Echtgelb ist z. B. in der Deutschen Bundesrepublik unter die unbedenklichen Lebensmittelfarbstoffe eingereiht^{6, 7}. Auf Grund seiner Wasserlöslichkeit würde es sich zum Färben von Getränken, Zuckerwaren und wohl auch Teigwaren eignen. Echtgelb wurde nun in markierter Form hergestellt⁸. Das Molekül enthält den Radiokohlenstoff an der durch



einen Stern bezeichneten Stelle. Die spezifische Aktivität betrug 9,1 Nanocurie/mg, entsprechend 20000 Zerfällen pro mg und Minute.

Experimentelle Durchführung und Ergebnisse.

Ebenso wie in den früheren Versuchen mit Buttergelb erhielten die Tiere stets nur eine einzige Portion des markierten Farbstoffes, und zwar wurden je 5 mg Farbstoff in 1 ml Wasser durch Schlundsonde verabreicht. Diese Menge ist in bezug auf die Molekülzahl der Menge Buttergelb äquivalent, wie sie in einer Portion (3 mg) in der früheren Versuchsreihe enthalten war. Die Ratten wurden — wie bei den Versuchen mit Buttergelb — nach bestimmten Zeiträumen getötet, die zu untersuchenden Organe naß verbrannt und das Kohlendioxyd in Bariumkarbonat umgewandelt. Zur Messung wurde das Bariumkarbonat mit Säure zersetzt, das Kohlendioxyd zur Füllung eines Gas-Geiger-Zählrohres⁹ verwendet und seine spezifische Aktivität (Aktivität pro Masseneinheit) bestimmt.

Die vorliegenden Versuche mit Echtgelb sind weniger genau als die Versuche mit Buttergelb. Erstens war die Zahl der Tiere geringer, da weniger Echtgelb zur Verfügung stand. Zweitens war die spezifische Aktivität des Echtgelbs bedeutend kleiner als die des Buttergelbs, so daß auch der Unterschied zwischen der unmittelbar gemessenen Aktivität und dem (davon abzuziehenden) Leerwert des Zählrohres unter sonst gleichen Umständen stark vermindert war. Es war aber gar nicht geplant, den Stoffwechsel des Echtgelbs bis in alle Einzelheiten zu verfolgen, es sollte nur untersucht werden, ob zwischen dem Stoffwechsel eines fettlöslichen und eines wasserlöslichen Azofarbstoffs überhaupt ein tiefgreifender Unterschied bestehen muß.

Die Ergebnisse mit Echtgelb sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Zahlen geben die spezifischen Aktivitäten des Kohlenstoffs der Organe an, wobei die Berechnung in gleicher Weise wie bei den Versuchen

⁷ A. Winkler, Z. Krebsforsch. 59, 134 (1953).

⁸ O. Hromatka, L. Stentzel und E. Broda, Mh. Chem. 86, 137 (1955).

⁹ E. Broda und G. Rohringer, Z. Elektrochem. 58, 634 (1954).

mit Buttergelb erfolgte. Auch diesmal werden Aktivitäten von weniger als vier pro Minute nicht als gesichert betrachtet und in der Tabelle gleich Null gesetzt.

Tabelle 1. Spezifische Aktivitäten des Kohlenstoffs in den Organen (Echtgelb).

Versuch Nr.	Zeit nach Fütterung (Std.)	Leber	Niere	Blut	Milz	Lunge	Muskel	Hirn
52	2	18	16	14	10	0	15	—
50	6	8	31	7	11	5	25	0
53	6	0	16	18	0	0	11	0
45	10	31	14	28	0	8	0	0
49	24	0	14	0	0	0	5	0
51	24	8	0	0	0	0	0	0
43	48	0	0	0	—	—	—	—
44	120	0	0	0	0	0	0	0

In der Tabelle 2 werden die — ziemlich stark streuenden — Aktivitäten wieder, ebenso wie in der Veröffentlichung über Buttergelb, zu Mittelwerten zusammengefaßt.

Tabelle 2. Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten (Echtgelb).

Versuch Nr.	Zeit nach Fütterung (Std.)	Leber	Niere	Blut	Milz	Lunge	Muskel	Hirn
52, 50, 53	2—6	9	21	13	7	2	17	0
45, 49, 51	10—24	13	9	9	0	3	2	0
43, 44	48, 120	0	0	0	0	0	0	0

Um den Vergleich zwischen den Echtgelb- und den Buttergelbwerten zu erleichtern, werden in Tabelle 3 die Buttergelbwerte aus der vorigen Veröffentlichung nochmals zu Mittelwerten zusammengefaßt, wobei die zeitlichen Intervalle wie in Tabelle 2 gewählt wurden. Außerdem wurden alle Buttergelbwerte durch den Faktor 6,5 dividiert, weil die Aktivität einer Portion Buttergelb 6,5mal so groß war wie die einer Echtgelbportion.

Tabelle 3. Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten (Buttergelb).

Versuch Nr.	Zeit nach Fütterung (Std.)	Leber	Niere	Blut	Milz	Lunge	Muskel	Hirn
23—28	2—6	6	5	4,5	4	4,5	1,5	2
1—3, 19—22	10—24	9	7,5	6	3	4	2	1,5
5, 8—12, 17, 18	48—120	2	1,5	4	1	2	0,5	0

In einigen weiteren Versuchen mit Buttergelb wurden neben dem Gesamtblut auch Serum und Erythrocyten auf Aktivität geprüft. Tabelle 4 gibt die ursprünglichen (also nicht auf die spezifische Aktivität des Echtgelbs bezogenen) spezifischen Aktivitäten der Blutfraktionen. (Diese Ergebnisse waren in der vorigen Veröffentlichung nur kurz qualitativ erwähnt worden.) Da etwa die Hälfte des Kohlenstoffs des Blutes in den Körperchen, die andere Hälfte im Serum enthalten ist, müßte die spezifische Aktivität des Gesamtblutkohlenstoffs ungefähr dem arithmetischen Mittel der spezifischen Aktivitäten von Serum- und Erythrocyten-Kohlenstoff entsprechen. Tabelle 4 zeigt, daß dies angenähert zutrifft.

Tabelle 4. Verteilung der Aktivität auf Serum und Erythrocyten (Buttergelb).

Versuch Nr.	Zeit nach Fütterung (Stdn.)	Gesamtblut	Serum	Erythrocyten	Hämoglobin	Schatten
34, 35	10	70	82	46	50	—
32, 36, 37	168	12	0	22	3	7
29, 38, 39	240	3	0	7	0	7
40, 33	388, 456	3	0	7	0	0
30, 41, 42	720—840	3	0	7	0	6

Man sieht, daß der Radiokohlenstoff des Buttergelbs zuerst hauptsächlich im Serum zu finden ist, bald aber vollständig in die Erythrocyten — und zwar besonders in die Blutschatten — übergeht. Ein derartiger Effekt ist bei unseren Versuchen mit Echtgelb nicht zu bemerken, vielmehr ist während der kürzeren Zeit, während der die Aktivität des Blutes überhaupt meßbar ist (siehe Tabelle 1), die spezifische Aktivität des Serums stets höher als die der Erythrocyten. Auf eine ins einzelne gehende Wiedergabe der Ergebnisse dieser Messungen sei jedoch wegen ihrer schlechten Reproduzierbarkeit verzichtet.

Schließlich wurde bei den Versuchen mit Echtgelb festgestellt, daß ebenso wie beim kernmarkierten Buttergelb die Ausscheidung des Radiokohlenstoffs hauptsächlich durch den Harn erfolgt. Die Atemluft erwies sich wiederum als inaktiv; bereits eine Ausscheidung von etwa 1% des zugeführten Kohlenstoffs in Form von Kohlendioxyd innerhalb eines Tages wäre nachgewiesen worden. Auch in dieser Hinsicht besteht also Übereinstimmung mit dem am Benzolkern markierten Buttergelb.

Diskussion.

Man erkennt beim Vergleich der Tabellen 2 (Echtgelb) und 3 (Buttergelb), daß offenbar keine grundlegenden qualitativen Unterschiede zwischen der Verteilung des Radiokohlenstoffs einerseits aus Echtgelb

und andererseits aus Buttergelb über die Organe bestehen. (Die Erythrocyten bilden offenbar eine Ausnahme.) Allerdings scheint die Aufnahme des Radiokohlenstoffs aus dem wasserlöslichen Echtgelb rascher als aus dem fettlöslichen Buttergelb zu erfolgen. Ebenso wird der Radiokohlenstoff auch wieder rascher abgegeben. Auf die rasche Ausscheidung ist wohl auch die vorübergehende starke Aktivität der Niere im Echtgelbversuch zurückzuführen. Vielleicht hängt die merkwürdige hohe Anfangsaktivität des Muskels ebenfalls mit der starken Beladung der Körperflüssigkeit mit Radiokohlenstoff kurz nach der Fütterung zusammen.

Was nun das Organ betrifft, in dem die Buttergelbtumoren so gut wie ausschließlich lokalisiert sind, also die Leber, so gewinnt man den Eindruck, daß die Resorptionen von Echtgelb bzw. Buttergelb (oder ihrer radioaktiven Abbauprodukte) durch die Leber nicht größenordnungsmäßig verschieden sind, wenn bei der Abschätzung der Resorption sowohl die erreichte Konzentration als auch die Verweilzeit des Radiokohlenstoffs berücksichtigt werden. Wenn das Echtgelb also die Leber tatsächlich nicht schädigt, so dürfte dies an der Natur des resorbierten Stoffes liegen. Die Ursache für eine größere oder geringere schädigende Wirkung wäre wohl in den Einzelheiten des molekularen Baus des resorbierten Stoffes zu suchen.

Mit dieser Vorstellung steht auch im Einklang, daß fettlösliche nahe Verwandte des Buttergelbs, z. B. p-Diäthylamino-azobenzol, jeder krebserregenden Wirkung entbehren können, während andere, z. B. 3'-Methyl-4-dimethylamino-azobenzol, gesteigerte Wirkung zeigen¹⁰. Übrigens hängt bei den stets fettlöslichen kondensierten Kohlenwasserstoffen, die freilich andere Krebsarten als Leberkrebs erzeugen, die Wirkung ebenfalls in hohem Maße vom molekularen Bau ab.

Vermutlich ist für die Tumorentstehung durch Buttergelb und einige seiner Verwandten eine ganz spezifische Verbindungsbildung mit Leberproteinen verantwortlich zu machen¹⁰. So wäre auch verständlich, daß das Buttergelb in anderen Organen keinen Tumor erregt, obwohl nach unseren Ergebnissen die Aufnahme von Radiokohlenstoff aus markiertem Buttergelb durch manche dieser Organe, z. B. die Niere, nicht wesentlich kleiner ist als durch die Leber.

Wir danken den Professoren *H. Chiari*, *W. Denk*, *L. Ebert* und *F. Seelich* für ihr förderndes Interesse und der *Sonnleitner*-Stiftung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften für großzügige finanzielle Unterstützung.

¹⁰ *E. C. Miller*, *J. A. Miller*, *R. W. Sapp* und *G. M. Weber*, *Cancer Res.* **9**, 336 (1949).