

## Weitere Stoffwechselfersuche mit radioaktivem Buttergelb\*

Von

**E. Broda und O. Hromatka**

I. Chemisches Institut der Universität Wien,

**W. Zischka**

Pathologisch-anatomisches Institut der Universität Wien,

und **K. Karrer**

Österreichisches Krebsforschungsinstitut

*(Eingegangen am 9. Juli 1957)*

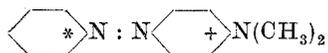
Buttergelbproben, die (in einer Versuchsreihe) an dem der Dimethylaminogruppe benachbarten Kohlenstoffatom oder (in einer zweiten Versuchsreihe) an allen Kohlenstoffatomen beider Benzolringe gleichmäßig markiert waren, wurden in einmaliger Dosis an Ratten verfüttert. Die Tiere wurden nach verschiedenen Zeiträumen getötet, ihre Organe verbrannt und die Radioaktivität des Kohlendioxyds mit dem Gas-Geiger-Zählrohr bestimmt. Die größte Aktivität wurde in Leber, Niere und Blut gefunden. Innerhalb des Blutes war der Hauptteil des Radiokohlenstoffs zuerst im Serum, später in den Erythrocyten zu finden. In den meisten Fällen wurden die Maxima der Aktivitäten nach wenigen Stunden erreicht; sodann sanken die Aktivitäten der Organe rasch ab. Die Atemluft war inaktiv; der Radiokohlenstoff wurde jedenfalls zur Hauptsache mit dem Harn ausgeschieden. Der Kohlenstoff des Rings, der die Dimethylaminogruppe trägt, wird stärker als der Kohlenstoff des anderen Benzolrings gespeichert. Doch verlaufen Speicherung und Ausscheidung der Kohlenstoffatome beider Ringe qualitativ ähnlich.

### Einleitung

In einer früheren Veröffentlichung ist über den Stoffwechsel von radioaktiv markiertem Buttergelb (Dimethylaminoazobenzol) in Ratten

\* Herrn Prof. Dr. H. Chiari zum 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

berichtet worden<sup>1</sup>. Der Farbstoff war an der durch einen Stern gekennzeichneten Stelle am Kohlenstoff markiert. Zu bestimmten Zeit-



punkten nach Verfütterung wurden Ausscheidungen und Organe von Tieren verbrannt und die Radioaktivität des erhaltenen Kohlendioxyds mit dem Gas-Geiger-Zählrohr bestimmt. Es ergab sich, daß der Hauptteil des Radiokohlenstoffs innerhalb sehr kurzer Zeit mit dem Harn ausgeschieden wurde. Ein kleinerer Teil verließ den Körper mit dem Stuhl. Dagegen war die Atemluft inaktiv.

Unter den Organen wies zwar die Leber die größte spezifische Radioaktivität (Aktivität je Masseneinheit Kohlenstoff) auf, doch war die Aktivität der Niere und der Erythrocyten immerhin von der gleichen Größenordnung. Der Höchstwert der Aktivität der Leber wurde nach etwa 10 Stdn. erreicht. Nach 2 Wochen war die spezifische Aktivität der Leber und der Niere bereits auf wenige Prozent des Höchstwertes abgesunken und konnte späterhin nicht mehr gemessen werden. Relativ am längsten war Radiokohlenstoff in den Erythrocyten — und zwar in den Blutschatten — nachzuweisen. Qualitativ ähnliche Ergebnisse wurden mit dem radioaktiv markierten wasserlöslichen Azofarbstoff Echtgelb (Natriumsalz der 4-Aminoazobenzol-3,4'-disulfonsäure) erhalten<sup>2</sup>.

Die Ergebnisse mit Buttergelb legen den Schluß nahe, daß die Lokalisation der Tumorbildung in der Leber, wie sie bei Verabreichung dieses Farbstoffes ausnahmslos beobachtet wird, nicht etwa, wie gelegentlich behauptet worden war, durch eine besondere, größenordnungsmäßig überlegene Speicherung des krebserregenden Stoffes durch Lebergewebe, sondern eher durch eine spezifische Beeinflussung solchen Gewebes durch den krebserregenden Stoff bewirkt ist. Auffällig ist an den Ergebnissen unserer Experimente weiterhin, daß eine nennenswerte Speicherung des Radiokohlenstoffs nur relativ kurze Zeit anhält, obwohl sich doch die tumorerregende Wirkung des einmal verabreichten Buttergelbs über einen sehr langen Zeitraum (viele Monate oder gar Jahre) erstreckt<sup>3</sup>.

Die in der Veröffentlichung beschriebenen Messungen gaben insofern kein vollständiges Bild, als das Buttergelb nur an einer Stelle des Moleküls markiert war. Es war fraglich, inwieweit das Verhalten des einzigen markierten Kohlenstoffatoms mit dem Verhalten des gesamten Kohlenstoffs oder auch nur des Kohlenstoffs der Benzolringe des Butter-

<sup>1</sup> W. Zischka, K. Karrer, O. Hromatka und E. Broda, Mh. Chem. 85, 856 (1954).

<sup>2</sup> K. Karrer, E. Broda, R. Stark, O. Hromatka und W. Zischka, Mh. Chem. 86, 444 (1955).

<sup>3</sup> H. Druckrey und K. Küpfmüller, Z. Naturforsch. 3 b, 254 (1948).

gelbs übereinstimmt. Tatsächlich war schon früher durch Experimente mit Radiokohlenstoff gefunden worden, daß der Kohlenstoff der Methylgruppen sich völlig anders verhält; er wird etwa zur Hälfte mit der Atemluft als  $\text{CO}_2$  ausgeschieden<sup>4, 5, 6</sup>. Zur Vervollständigung der früheren Experimente wurden daher Versuche mit Buttergelbproben ausgeführt, die an anderen Stellen der Benzolringe als das ursprünglich verwendete Buttergelb („A“) markiert waren.

In einer Reihe von Versuchen war das in der Formel durch ein Kreuz bezeichnete Kohlenstoffatom markiert. Diese als Buttergelb B bezeichnete Verbindung war durch Kuppeln von inaktivem Benzoldiazoniumchlorid mit  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Dimethylanilin erhalten worden<sup>7</sup>. Das für eine weitere Versuchsreihe verwendete Buttergelb C war durch Kupplung eines an allen Kohlenstoffatomen gleichmäßig markierten Benzoldiazoniumchlorids mit am Benzolring gleichmäßig markiertem Dimethylanilin gewonnen worden; in diesem Falle wurde darauf geachtet, daß die spezifische Aktivität des Kohlenstoffs beider Ringe die gleiche war<sup>7</sup>.

### Versuchstechnik und Ergebnisse

Die gleiche Versuchstechnik wie in der vorhergehenden Untersuchung (mit Buttergelb A) wurde eingehalten. Insbesondere wurde das Buttergelb jeder Ratte in einmaliger Dosis von je 3 mg pro Tier durch Schlundsonde verabreicht.

Die Atemluft erwies sich auch nach Verfütterung von Buttergelb B oder C als gänzlich inaktiv, der Harn in beiden Fällen als stark radioaktiv.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Organen sind analog wie in der Vorveröffentlichung berechnet. Die tatsächlich am Gas-Geiger-Zählrohr abgelesenen Werte (Stöße pro Minute) wurden um den Leerwert des Zählrohres (meist etwa 40 bis 45 pro Minute) vermindert, auf Normaldruck umgerechnet und schließlich durch einen Korrekturfaktor dividiert, der angab, wieviel mal größer die spezifische Aktivität des im betreffenden Einzelversuch eingesetzten Buttergelbs als jene des Buttergelbs der Vorveröffentlichung (Buttergelb A) war. Die Korrekturfaktoren lagen zwischen 0,97 und 2,88. Abgelesene Aktivitäten, die den Leerwert um weniger als  $4 \text{ min}^{-1}$  übertrafen, wurden nicht als signifikant betrachtet. In solchen Fällen wurde in die Tabelle der Wert „0“ eingesetzt, obwohl manche der beobachteten Aktivitäten reell gewesen sein müssen. In einigen Fällen wurden die Messungen wiederholt; dann wurden in die Tabellen die Mittelwerte aufgenommen. Die Tabelle 1 enthält die Ergebnisse der Versuche mit Buttergelb B.

<sup>4</sup> R. A. Boissonas, R. A. Turner und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **180**, 1053 (1949).

<sup>5</sup> J. C. MacDonald, A. M. Plescia, E. C. Miller und J. A. Miller, Cancer Res. **12**, 280 (1952).

<sup>6</sup> E. C. Miller, A. M. Plescia, J. A. Miller und C. Heidelberger, J. Biol. Chem. **196**, 862 (1952).

<sup>7</sup> O. Hromatka, L. Stentzel-Petzlbauer und E. Broda, Mh. Chem. **88**, 317 (1957).

Tabelle I. Spezifische Aktivitäten des Kohlenstoffs in den Organen (Buttergelb B)

| Versuch Nr. | Zeit nach Fütterung (Stunden) | Organ |       |              |       |       |      |       |        |      |
|-------------|-------------------------------|-------|-------|--------------|-------|-------|------|-------|--------|------|
|             |                               | Blut  | Serum | Erythrocyten | Leber | Niere | Milz | Lunge | Muskel | Hirn |
| 59          | 6                             | 40    | 93    | 13           | 185   | 103   | 30   | 52    | 24     | 11   |
| 62          | 6                             | —     | 95    | 19           | 138   | 47    | 47   | 57    | 16     | 33   |
| 81          | 6                             | 35    | 44    | 22           | 225   | 176   | 105  | (495) | —      | 64   |
| 82          | 6                             | 102   | 159   | 47           | 447   | 258   | 117  | 107   | 55     | 25   |
| 76          | 10                            | 215   | 131   | 61           | 221   | 113   | 46   | 67    | 35     | 12   |
| 77          | 10                            | 120   | 142   | 82           | 381   | 200   | 57   | 110   | 54     | 26   |
| 57          | 11,5                          | 101   | 178   | 10           | 234   | 153   | 88   | 76    | 38     | 15   |
| 58          | 11,5                          | 72    | 81    | 42           | 107   | 74    | 37   | 108   | 15     | 48   |
| 56          | 24                            | —     | 17    | 27           | 60    | 34    | 11   | 20    | 3      | 3    |
| 63          | 24                            | 62    | 59    | 64           | 131   | 81    | 0    | 52    | 19     | 14   |
| 73          | 24                            | 47    | 8     | 25           | 48    | 23    | 0    | 5     | 0      | 0    |
| 74          | 24                            | 13    | 19    | 10           | 48    | 21    | 5    | 5     | 0      | 11   |
| 54          | 48                            | 10    | 2     | 17           | 17    | 8     | 5    | 9     | 0      | 0    |
| 75          | 48                            | 21    | 8     | 19           | 34    | 13    | 0    | 6     | 0      | 0    |
| 83          | 48                            | 51    | 13    | 43           | 67    | 39    | 15   | 24    | 0      | 0    |
| 84          | 48                            | 14    | 7     | 11           | 17    | 27    | 4    | 20    | 0      | 5    |
| 60          | 864                           | 0     | 0     | 0            | —     | —     | —    | —     | —      | —    |
| 61          | 864                           | 6     | 4     | 6            | —     | —     | —    | —     | —      | —    |

Zum Zwecke der besseren Übersicht sind in Tabelle 2 die Werte der Tabelle I zu Mittelwerten zusammengezogen.

Tabelle 2. Mittelwerte mit Buttergelb B

| Versuch Nr.    | Zeit nach Fütterung (Stunden) | Organ |       |              |       |       |      |       |        |      |
|----------------|-------------------------------|-------|-------|--------------|-------|-------|------|-------|--------|------|
|                |                               | Blut  | Serum | Erythrocyten | Leber | Niere | Milz | Lunge | Muskel | Hirn |
| 59, 62, 81, 82 | 6                             | 59    | 98    | 25           | 249   | 146   | 75   | 72    | 32     | 33   |
| 76, 77, 57, 58 | 11                            | 127   | 125   | 49           | 236   | 135   | 57   | 90    | 35     | 25   |
| 56, 63, 73, 74 | 24                            | 40    | 26    | 31           | 72    | 40    | 4    | 21    | 5      | 7    |
| 54, 75, 83, 84 | 48                            | 24    | 8     | 22           | 34    | 22    | 6    | 15    | 0      | 1    |
| 60, 61         | 864                           | 3     | 2     | 3            | —     | —     | —    | —     | —      | —    |

Tabelle 3 enthält eine Aufstellung der Ergebnisse mit Buttergelb C, Tabelle 4 die Mittelwerte. Eines der drei Buttergelbpräparate, die für diesen Versuch eingesetzt wurden, ergab ganz abweichende, nämlich größenordnungsmäßig zu niedrige Resultate. Die Ursache kann nachträglich nicht mehr festgestellt werden; vielleicht ist ein Wäge- oder Verdünnungsfehler unterlaufen. Die Werte dieser Reihe wurden ausgelassen.

Um den Vergleich zwischen den Ergebnissen mit Buttergelb A, B und C zu erleichtern, sind die Mittelwerte aus allen drei Versuchsreihen in Tabelle 5 zusammengestellt. Die Werte von A sind den früheren Veröffentlichungen<sup>1, 2</sup> entnommen.

Tabelle 3. Spezifische Aktivitäten des Kohlenstoffs in den Organen (Buttergelb C)

| Versuch Nr. | Zeit nach Fütterung (Stunden) | Organ |       |              |       |       |      |       |        |      |
|-------------|-------------------------------|-------|-------|--------------|-------|-------|------|-------|--------|------|
|             |                               | Blut  | Serum | Erythrocyten | Leber | Niere | Milz | Lunge | Muskel | Hirn |
| 85          | 10                            | 67    | 130   | 96           | 129   | 82    | —    | —     | —      | —    |
| 86          | 10                            | 88    | 110   | 36           | 86    | 98    | —    | —     | —      | —    |
| 87          | 24                            | 36    | —     | —            | 29    | 49    | —    | —     | —      | —    |
| 88          | 24                            | 89    | 35    | 136          | 66    | 59    | —    | —     | —      | —    |
| 67          | 48                            | 59    | 10    | 85           | 33    | 26    | 20   | 12    | 5      | 3    |
| 68          | 48                            | 24    | 5     | 33           | 17    | 7     | 3    | 4     | 0      | 0    |
| 89          | 48                            | 34    | 8     | 78           | 22    | 35    | —    | —     | —      | —    |
| 90          | 48                            | 37    | —     | —            | 35    | 30    | —    | —     | —      | —    |
| 65          | 864                           | 0     | 0     | 0            | —     | —     | —    | —     | —      | —    |
| 66          | 864                           | —     | 0     | 0            | —     | —     | —    | —     | —      | —    |

Tabelle 4. Mittelwerte mit Buttergelb C

| Versuch Nr.    | Zeit nach Fütterung (Stunden) | Organ |       |              |       |       |
|----------------|-------------------------------|-------|-------|--------------|-------|-------|
|                |                               | Blut  | Serum | Erythrocyten | Leber | Niere |
| 85, 86         | 10                            | 77    | 120   | 66           | 108   | 90    |
| 87, 88         | 24                            | 62    | 35    | 136          | 47    | 54    |
| 67, 68, 89, 90 | 48                            | 39    | 8     | 65           | 27    | 24    |
| 65, 66         | 864                           | 0     | 0     | 0            | —     | —     |

Tabelle 5. Vergleich von Buttergelb A, B und C

| Zeit nach Fütterung (Stunden) | Organ |     |    |       |     |     |              |    |     |
|-------------------------------|-------|-----|----|-------|-----|-----|--------------|----|-----|
|                               | Blut  |     |    | Serum |     |     | Erythrocyten |    |     |
|                               | A     | B   | C  | A     | B   | C   | A            | B  | C   |
| 6                             | 38    | 59  | —  | —     | 98  | —   | —            | 25 | —   |
| 10                            | 51    | 127 | 77 | 82    | 125 | 120 | 46           | 49 | 66  |
| 24                            | 37    | 40  | 62 | —     | 26  | 35  | —            | 31 | 136 |
| 48                            | 21    | 24  | 39 | —     | 8   | 8   | —            | 22 | 65  |

| Zeit nach Fütterung (Stunden) | Organ |     |     |       |     |    |      |    |    |
|-------------------------------|-------|-----|-----|-------|-----|----|------|----|----|
|                               | Leber |     |     | Niere |     |    | Milz |    |    |
|                               | A     | B   | C   | A     | B   | C  | A    | B  | C  |
| 6                             | 52    | 249 | —   | 39    | 136 | —  | 34   | 75 | —  |
| 10                            | 78    | 236 | 108 | 66    | 135 | 90 | 26   | 57 | —  |
| 24                            | 32    | 72  | 47  | 29    | 40  | 54 | 14   | 4  | —  |
| 48                            | 12    | 34  | 27  | 12    | 22  | 24 | 9    | 6  | 12 |

| Zeit nach<br>Fütterung<br>(Stunden) | Organ |    |   |        |    |   |      |    |   |
|-------------------------------------|-------|----|---|--------|----|---|------|----|---|
|                                     | Lunge |    |   | Muskel |    |   | Hirn |    |   |
|                                     | A     | B  | C | A      | B  | C | A    | B  | C |
| 6                                   | 35    | 72 | — | 10     | 32 | — | 16   | 33 | — |
| 10                                  | 32    | 90 | — | 26     | 35 | — | 7    | 25 | — |
| 24                                  | 24    | 21 | — | 5      | 5  | — | 10   | 7  | — |
| 48                                  | 15    | 15 | 8 | 3      | 0  | 2 | 3    | 1  | 1 |

### Diskussion

Qualitativ verläuft, wie die Tabellen zeigen, die Speicherung und Abgabe von Radiokohlenstoff durch die Organe der Ratte bei Verfütterung von Buttergelb B und C ähnlich wie bei Verfütterung von Buttergelb A. Wieder erweist sich die Leber in den meisten Fällen als am stärksten aktiv, ohne daß sie aber anderen Organen (Niere, Blut) größenordnungsmäßig überlegen wäre. Wieder ist der Radiokohlenstoff des Blutes anfänglich zumeist im Serum, später jedoch hauptsächlich in den Erythrocyten enthalten. Wieder sinkt die Aktivität aller Organe im Verlauf weniger Wochen unter die Schwelle der sicheren Nachweisbarkeit.

In quantitativer Hinsicht jedoch findet man, daß der Radiokohlenstoff aus Buttergelb B stärker gespeichert wird als aus Buttergelb A. Nun kann natürlich in bezug auf den unabgebauten Farbstoff keine unterschiedliche Speicherung auftreten, an welcher Stelle des Moleküls er auch markiert sei. Daher muß geschlossen werden, daß das Molekül alsbald an der Azogruppe gespalten wird und daß Abbauprodukte, die den „rechten“ Benzolring enthalten, besser gespeichert werden als jene, die den linken Ring enthalten.

Einem von *Miller* und *Miller*<sup>8</sup> übersichtlich zusammengestellten Abbauschema ist zu entnehmen, daß das Buttergelb unmittelbar entweder einer Hydroxylierung am linken Ring oder einer Entmethylierung oder schließlich (auf dem Weg über eine Hydrazoverbindung) einer Teilung in einkernige Verbindungen unterliegt. Alle diese Reaktionen können vermutlich auch am gleichen Molekül erfolgen. Die Abbauprodukte, die ohne Zweifel bisher nur zum Teil erkannt worden sind, sind demnach sehr vielfältig.

Da zur Erklärung der ungleichen Speicherung des Radiokohlenstoffs aus Buttergelb A und B nur Abbauprodukte herangezogen werden können, in denen die beiden Ringe voneinander getrennt sind, seien diese Produkte aufgezählt, soweit sie bisher aufgefunden worden sind<sup>8</sup>. Es sind die Verbindungen  $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ ,  $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}(\text{CH}_3)$ ,  $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{NH}_2$  und  $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ . Aus dem rechten Benzolring entstehen die Umwandlungs- und Abbauprodukte

<sup>8</sup> *J. A. Miller* und *E. C. Miller*, *Adv. Cancer Res.* 1, 340 (1953).

des Phenylendiamins, aus dem linken Ring jene des Anilins. Aus den Ergebnissen mit Radiokohlenstoff ist zu schließen, daß die Derivate (und Abbauprodukte) des Phenylendiamins im Mittel stärker als die des Anilins gespeichert werden.

Eine Sprengung von Benzolringen innerhalb von Organismen ist nur selten und nur in geringem Grade beobachtet worden. Wenn daher auch für den vorliegenden Fall angenommen wird, daß einer solchen Sprengung keine Bedeutung zukommt, vielmehr jeder Benzolring ein gemeinsames Schicksal erleidet, so kann der Umstand, daß in Buttergelb C im Gegensatz zu A und B innerhalb der Ringe alle sechs Positionen markiert waren, keine Rolle spielen. Daher muß sich Buttergelb C biochemisch wie eine Mischung von Buttergelb A und B verhalten, und die mit Buttergelb C erhaltenen Aktivitätswerte sollten zwischen den mit A und B erhaltenen Werten liegen. Die Tabelle 5 zeigt, daß dies öfters zutrifft. Wenn auch die Abweichungen, besonders bei Blut und Niere längere Zeit nach Fütterung, beträchtlich sind, können sie angesichts der großen biologischen Streuung doch nicht als signifikant betrachtet werden.

Somit sind die Schlüsse, die in der vorhergegangenen Arbeit aus dem Verhalten eines markierten Kohlenstoffatoms im Molekül des Buttergelbs gezogen wurden, qualitativ auf die Gesamtheit der Kohlenstoffatome der beiden Benzolringe auszudehnen. In diesem Sinn ist also das Schicksal des Kohlenstoffatoms, das in Versuchsreihe A markiert war, für alle diese Kohlenstoffatome typisch. Insbesondere ist festzustellen, daß der Kohlenstoff der Benzolringe anfangs in Leber, Niere und Blut (zuerst im Serum, später in den Erythrocyten) gespeichert wird, dann aber überraschend schnell (und zwar durch den Harn) wieder ausgeschieden wird.

Jedoch zeigt der erhebliche quantitative Unterschied zwischen Versuchsreihe A und B, daß ein Hauptteil der Aktivität der Organe nicht auf intaktes Buttergelb, sondern auf einkernige Abbauprodukte zurückzuführen ist. Die Verteilung solcher Abbauprodukte scheint aber für die Krebserregung nicht maßgebend zu sein. Die in Wisconsin angestellten Untersuchungen machen vielmehr plausibel, daß die Bildung spezifischer Verbindungen zwischen Leberproteinen und zweikernigen Derivaten des Buttergelbs der Tumorbildung parallel geht und sie vermutlich sogar verursacht<sup>8, 9</sup>.

Wir danken dem Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research sowie der *Sonnleitner*-Stiftung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften für finanzielle Unterstützung, den Herren Dr. *H. Bilina* und Dr. *A. Korej* für synthetische Arbeiten und den Herren *H. Perschke* und *P. Uccusic* für tatkräftige Mithilfe bei den langwierigen Messungen.

<sup>9</sup> Siehe auch *T. Hultin*, *Exptl. Cell Res.* **13**, 47 (1957).