

Einfluß verschiedener Medikamente auf die Bindung von Schilddrüsenhormonen an Lebermitochondrien

Influence of Various Drugs on the Adsorption of Thyroid Hormones to Liver Mitochondria

Richard Wahl und Ekkehard Kallee *

Medizinische Universitätsklinik Tübingen

(Z. Naturforsch. **29 c**, 608–617 [1974] ; eingegangen am 14. Mai 1974)

Distribution Equilibria, Drug Action, Mitochondria, Protein Binding, Thyroid Hormones

1. [^{131}I]L-thyroxine (T_4) or [^{131}I]L-triiodothyronine (T_3) was added in 50 pM–25 nM and 26 pM–132 nM concentrations to suspensions of rat liver mitochondria. In distribution equilibria between soluble proteins and mitochondria the adsorption of the thyroid hormones to the mitochondria followed an approximately linear function when the radioactive hormones were added within the range of physiological concentrations. At identical protein concentrations T_3 was adsorbed to the mitochondria one tenth more strongly than T_4 when neither serum proteins nor cell sap had been added. The adsorption of both T_3 and T_4 to mitochondria and soluble proteins is reversible. The distribution of the thyroid hormones between organelles and soluble proteins depends on the ratio of the protein concentration in the sedimented mitochondria to the protein concentration in the supernate after centrifugation. The desorption of T_3 and T_4 from the mitochondria by soluble proteins, however, represents no linear function.

2. The distribution equilibria of simultaneously added [^{131}I]– T_4 and [^{125}I]– T_3 can be shifted by certain drugs. Chlorpromazin and dinitrophenol displaced the thyroid hormones from their binding to soluble proteins onto the mitochondria. *Vice versa*, phenylbutazone, phenytoin, brom-sulfalein and silymarin displaced the hormones from the mitochondria more strongly than from soluble proteins. Sodium oleate displaced the hormones in both directions. Minor shifting effects or none at all could be detected when several other drugs were used. The described procedure apparently yields new information on some effects of drug action.

Einleitung

Bestimmte Serumproteine binden körpereigene Hormone und Stoffwechselprodukte sowie körperfremde Farbstoffe und Arzneimittel und transportieren diese mit dem Blut in die Organe^{1,2}. Die Vehikelpoteine¹ können den Abstrom von Substanzen aus den Kapillaren ins Gewebe verzögern und wahrscheinlich auch umgekehrt den Flux bestimmter Stoffe aus den Organen ins Blut beschleunigen. Die Bindungsvorgänge gehorchen einem Sonderfall des Massenwirkungsgesetzes in Form von Adsorptionsisothermen^{3a, 3b, 4}. Die Adsorption vieler Stoffe an Proteine ist grundsätzlich reversibel und meist ziemlich unspezifisch; daher können bestimmte Substanzen andere aus den Bindungsplätzen verdrängen. Manche Änderung der Wirkung von gleichzeitig verabreichten Arzneimitteln dürfte auf gegenseitiger Verdrängung beruhen^{6b}.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. E. Kallee, Medizinische Universitätsklinik, D-7400 Tübingen, Otfried-Müller-Straße 10.

Abkürzungen: T_3 , [^{131}I]Trijodthyronin; T_4 , [^{131}I]Thyroxin.

Der Transport vieler proteingebundener Stoffe aus dem Plasma in die Zelle war lange Zeit nur schwer zu verstehen, da die Bindungsvorgänge einseitig von den Serumproteinen her betrachtet und untersucht wurden. Weniger bekannt als die Bindung an Serumproteine sind auch heute noch die Adsorptions- und Desorptionsvorgänge, welche innerhalb der Zelle an Mitochondrien, Mikrosomen und löslichen Zytoplasmaproteinen nach den gleichen Prinzipien wie an den Serumvehikeln ablaufen^{5, 6a, 6c, 37}. Aus den Verteilungsgleichgewichten, die sich *in vitro* zwischen Serumvehikeln und bindungsfähigen Zellproteinen einstellen, ist die Existenz „adsorptiver Transportketten“ abzuleiten⁵. Damit wird der Transport einiger organischer Anionen bis zu den Zellorganellen zumindest teilweise verständlich: Reversibel adsorbierte Substanzen, zu denen auch die Schilddrüsenhormone zählen, werden zunächst an Serumproteine gebunden, dann von Proteinen des flüssigen Zytoplasmas (Zellsaft, Cytosol) übernommen und zuletzt an Mitochondrien und Mikrosomen adsorbiert^{6a}. An den Membranen von Zellen und Zellorganellen kann vielleicht eine „Zwischenadsorption“ auftreten. Wahr-



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.

scheinlich erfolgt der Transport der Schilddrüsenhormone und mancher anderen anionischen Substanz passiv, denn er ist mit bekannten physiko-chemischen Gesetzen weitgehend erklärbar, und er bedarf – zumindest in Abwesenheit trennender Membranen – keiner Unterstützung durch aktive, enzymatische Transportmechanismen seitens der Membranen.

Über die adsorptive Verteilung der Schilddrüsenhormone zwischen Serumvehikeln und Zellorganellen liegen nur spärliche Untersuchungen vor^{5, 6a, 7, 8}. Unser Interesse galt dem Einfluß einiger Medikamente auf die Bindung von Schilddrüsenhormonen an Lebermitochondrien in Gegenwart von Serumproteinen und Zytoplasmaproteinen. Die Verschiebung der Verteilungsgleichgewichte kann bei der Behandlung von Schilddrüsenkrankheiten von unmittelbarer Bedeutung sein⁹. Zugleich zeigt das hier beschriebene Verfahren ganz allgemein eine neue Möglichkeit auf, einen Parameter der Wirkung von Medikamenten auf den peripheren Stoffwechsel von Schilddrüsenhormonen und anderen Substanzen in Modellversuchen zu ermitteln.

Ergebnisse

Abhängigkeit der Adsorption von Schilddrüsenhormonen an Mitochondrien von der Hormonkonzentration

Die Mitochondrienfraktion von Rattenlebern wurde in Saccharoselösung suspendiert und in der Kälte mit [¹³¹J]Thyroxin (T₄) oder [¹³¹J]Trijodthyronin (T₃) in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Nach Abzentrifugieren wurde die Radioaktivität der Mitochondriensedimente gemessen.

In den Adsorptions-Verteilungsgleichgewichten war die Bindung der Schilddrüsenhormone an die Mitochondrien bei Hormonzusätzen innerhalb des physiologischen Bereichs nicht von der molaren Hormonkonzentration im Ansatzvolumen abhängig, sondern von den Proteinkonzentrationen in der festen und in der flüssigen Phase⁵. Daher sind die Hormonzusätze und die gebundenen Hormonmengen hier in Gewichtseinheiten pro mg Mitochondrienprotein angegeben (Abb. 1). Ausführliche Daten sind den Tabellen einer älteren Arbeit^{6a} zu entnehmen.

Die spezifische Radioaktivität beider Hormone war ziemlich hoch. Daher lagen die zugefügten Hormonmengen bei den niedrigen T₃- und T₄-Zusätzen

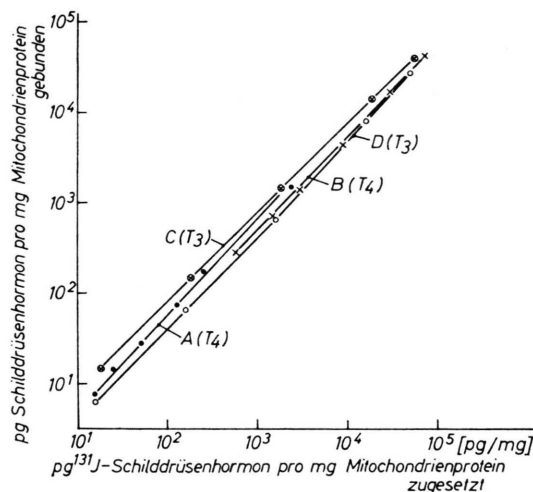


Abb. 1. Adsorption von ¹³¹J-markierten Schilddrüsenhormonen an Lebermitochondrien in Abhängigkeit vom Hormonzusatz. Die Lebermitochondrien waren in Zuckerlösung bei 2–4 °C suspendiert. Den Suspensionen A und C wurden keine löslichen Proteine zugefügt. Um das Verhältnis [I]/[s] anzuheben, erhielt Suspension B Rattenserum, D mikrosomenfreies Leberzytoplasma zugesetzt. Daher liegen die Kurven B und D auf einem tieferen Niveau, und bei hohen Hormonkonzentrationen biegen sie nach oben ab, da die Mitochondrien freies T₃ und T₄ von den löslichen Proteinen übernehmen. Zu den Kurven gehören folgende Parameter:

Versuchsreihe	[s] + [I] [mg/ml]	[s] [mg/ml]	[I] [mg/ml]	[I] [s]	Hormonkonzentrationen (abgerundete Werte) mi-mal [pM] ma-ximal [nM]	Prozentuale Adsorption an die Mitochondrien mi-mal [%] ma-ximal [%]
A (III a–f)	3,6	2,7	0,9	0,33	60 10	81 86
B (IX a–f)	0,46	0,26	0,2	0,77	190 25	47 62
C (XXI b–f)	2,0	1,6	0,4	0,25	40 130	75 80
D (XXII b–f)	3,0	1,1	1,9	1,73	25 80	38 55

[s] = Proteingehalt des Mitochondriensediments in der Suspension.

[I] = Konzentration der löslichen Proteine.

Die römischen Zahlen geben die zugehörigen Protokollnummern an^{6a}.

unterhalb der physiologischen Hormonkonzentration der Rattenleber und des Rattenserums¹⁰. Aus dem gleichen Grunde blieb bei beiden Schilddrüsenhormonen der Anteil, welcher an die Sedimente adsorbiert wurde, bei gleichbleibenden Mitochondrienmengen über mehrere Zehnerpotenzen ziemlich konstant. Erst bei relativ hohen Hormonzusätzen wichen die Werte von der Geraden im logarithmischen Koordinatensystem leicht nach oben ab, also in

Richtung auf die Mitochondrien. Dieses Verhalten ist nur bei den Kurven B und D deutlich zu erkennen: Hier enthielten die Überstände genügend lösliches Protein, aus welchem die „freien“ Hormonanteile auf die Bindungskapazität der Mitochondrien ausweichen konnten. In den Ansätzen zu den Kurven A und C dagegen lag das Verhältnis l/s der löslichen ($=l$) und der strukturgebundenen ($=s$) Proteine in einem weniger günstigen Bereich, so daß die Bindungskapazität der Mitochondrien nahezu absolut dominierte.

Einfluß der Proteinkonzentration auf die Hormonbindung

Der Überstand von Zellorganellen enthält stets eine gewisse Menge lösliches Organellenprotein, da beim Rehomogenisieren zwangsläufig ein Teil der Mitochondrien und Mikrosomen zerrieben wird. Infolgedessen stellt sich auch in mehrfach gewaschenen Mitochondrienpräparationen immer ein Verteilungsgleichgewicht zwischen sedimentierbaren und löslichen hormonbindenden Proteinen ein. Jedoch läßt sich das Gleichgewicht durch Zusatz löslicher adsorptionsfähiger Proteine verschieben.

Bei konstantem Hormonzusatz war der prozentuelle Anteil von Schilddrüsenhormonen, der an die Mitochondrien adsorbiert wurde, stark abhängig von der Proteinkonzentration im Überstand. Als entscheidender Faktor erwies sich das Verhältnis der Konzentrationen zwischen strukturgebundenen Proteinen im Mitochondrien-Sediment (s) und löslichen Proteinen im Überstand (l). Wie aus Abb. 2 hervorgeht, war schon in den Ausgangswerten (\uparrow) vor Zugabe von Serum- oder Zytoplasmaproteinen die Adsorption von T_3 an die Mitochondrien stets etwa um ein Zehntel stärker als die Adsorption von T_4 (vgl. auch Abbn. 3 – 5 und Tab. III).

Während sich T_3 durch lösliche Bindungsproteine des Leberzytoplasmas in ähnlicher Weise aus den Mitochondrien desorbieren ließ wie durch Vehikelpoteine des Rattenserums, traten beim T_4 erhebliche Divergenzen auf: Da T_4 nicht so fest wie T_3 an die Mitochondrien gebunden ist, ließ es sich durch lösliche Zytoplasmaproteine leichter desorbieren als das Trijodthyronin. Besonders stark desorbierte das Rattenserum T_4 , da Serumproteine T_4 viel stärker als T_3 binden ^{11–16, 6a}.

Einfluß von Arzneimitteln auf Adsorption und Desorption von Schilddrüsenhormonen

Bei der Auswahl der Arzneimittelkonzentrationen in den Suspensionen wurde nicht von den in

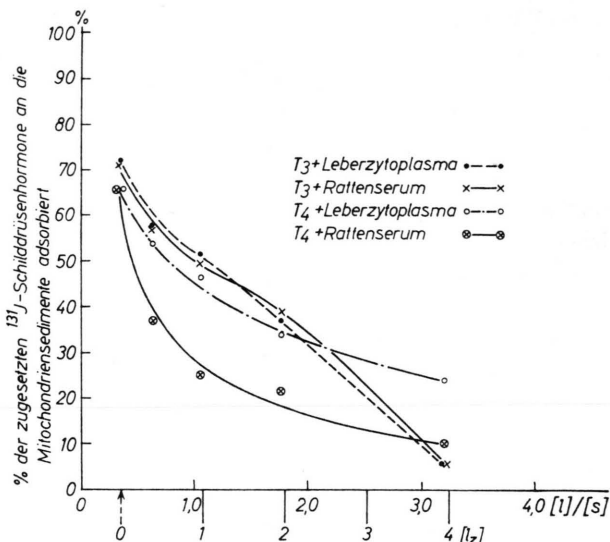


Abb. 2. Desorption von Schilddrüsenhormonen aus Lebermitochondrien durch Rattenserum und lösliche Zytoplasmaproteine. Eine Suspension von Mitochondrien aus 30 g Rattenleber in Rohrzuckerlösung wurde in zwei Hälften aufgeteilt, von denen die eine pro ml 287 pg $^{131}\text{J-T}_4$, die andere genau gleich viel $^{131}\text{J-T}_3$ enthielt. Diese Ansätze wurden nochmals halbiert und entweder mit Rattenserum oder mit konzentriertem Zytoplasma versetzt (Versuchsreihe XXIII–XXVI in ^{6a}). Parameter der Ausgangswerte ($\hat{\circ}$) ohne Zusatz von löslichen Proteinen:

$[s] + [l]$ [mg/ml]	$[s]$ [mg/ml]	$[l]$ [mg/ml]	$[l]/[s]$	Hormonkonzentrationen $^{131}\text{J-T}_4$ $^{131}\text{J-T}_3$	
1,86	1,38	0,48	0,35	370 pM	440 pM

$[s]$ = Proteingehalt des Mitochondriensediments in der Suspension,

$[l]$ = Konzentration der löslichen Proteine,

$[l_z]$ = mg lösliches Protein/ml Suspension zugesetzt.

in vivo im Plasma meßbaren Konzentrationen ausgegangen, da die Plasmaspiegel hochgradig vom Abstrom in die Gewebe abhängig sind. Vielmehr wurde willkürlich angenommen, daß die Medikamente nach rascher intravenöser Injektion sich im zirkulierenden Plasma – unter Vernachlässigung des gleichzeitig stattfindenden Schwundes – gleichmäßig verteilen.

Die Medikamente wurden grundsätzlich in drei Versuchsanordnungen geprüft. In der ersten Reihe wurde eine Suspension von Mitochondrien mit verschiedenen Konzentrationen eines Medikaments ohne Zusatz löslicher Proteine gemischt. Der zweiten Reihe wurde so viel flüssiges Zytoplasma zugefügt, wie dem Lebervolumen entsprach, das als Ausgangsmenge für die Gewinnung von Mitochon-

drien gedient hatte. Obwohl bei der Aufarbeitung der Lebern sicher ein Teil der Mitochondrien mit der Kernfraktion verloren geht, ließ sich in dieser zweiten Reihe eine Annäherung an das physiologische Verhältnis der Bindungskapazitäten von Mitochondrien einerseits, Mikrosomen und löslichem Zytoplasmaprotein andererseits erzielen. Die dritte Reihe erhielt statt flüssigem Zytoplasma 0,9–1,0 ml Rattenserum pro Gramm verarbeitete Rattenleber zugesetzt.

In allen drei Reihen waren gleichzeitig T_3 und T_4 in so geringen Mengen enthalten, daß diese unterhalb der angenommenen physiologischen Konzentrationen¹⁰ lagen. Thyroxin und T_3 waren jeweils entweder mit ^{131}J oder mit ^{125}J markiert, so daß sie in den Mitochondriensedimenten simultan gemessen werden konnten.

In einigen Versuchen wurden die Mikrosomen aus dem Zytoplasma entfernt. Damit ließ sich aber nur eine geringfügige Parallelverschiebung der Zytoplasmakurven um etwa 5–10% nach oben oder unten erzielen. Die Mikrosomen verhalten sich also in solchen Verteilungsgleichgewichten praktisch gleich wie die löslichen Zytoplasmaproteine. Außerdem sind die Mitochondrien stets mit großen Mikrosomen vermischt. Für eine vollständige Abtrennung der Mikrosomen sind überdies so hohe g -Werte erforderlich, daß hochmolekulare Bindungsproteine ebenfalls zu sedimentieren beginnen und dadurch die physiologische Konzentration an löslichen Zytoplasmaproteinen verschoben wird. Aus all diesen Gründen wurden die Mikrosomen für die Medikamentenversuche im flüssigen Zytoplasma belassen.

Zur Untersuchung gelangten hauptsächlich solche Medikamente, von denen aus Experimenten mit Serumproteinen eine T_3 - oder T_4 -verdrängende Wirkung bekannt ist^{16–24, 6a}, ferner andere, welche bei Thyreotoxikosen häufig verabreicht werden. Je nachdem, ob das betreffende Medikament T_3 und T_4 aus den Mitochondrien oder aus den löslichen Proteinen stärker verdrängte, enthielten die abentrifugierten Mitochondrien mehr oder weniger Radioaktivität als in den Ausgangswerten.

Keine meßbare Änderung der Bindung von T_3 und T_4 an die Mitochondrien war mit den in Tab. I aufgeführten Präparaten zu erzielen. Ein negativer Befund bedeutet aber nicht, daß eine verdrängende Wirkung ausgeschlossen sei: Wenn die verdrängten Hormonmengen in der festen Phase und im Über-

Tab. I. Medikamente ohne meßbaren Verdrängungseffekt.

Präparat	untersuchter Konzentrationsbereich
Bumadizon (Eumotol®)	0,5–0,016 mM
Desoxycholsaures Natrium (Decholin®)	1,9–0,03 mM
Furosemid (Lasix®)	120–1,9 μ M
Hydroxocobalamin (Aquo-Qytobion®)	86–1,3 nM
β -Methyl-Digoxin (Lanitop®)	2,5–0,31 nM
Novamidopyrin (Novalgin®)	5,7–0,09 mM
Oligomycin (Serva)	80–2,5 μ g/ml
Penicillin-G-Kalium (Penicillin® Bayer)	1,0–0,025 mM
Phenprocoumon (Marcumar®)	32,4–0,51 μ M
Thiamazol (Favistan®)	1,4–0,043 mM
Tolbutamid (Rastinon®)	3,7–0,06 mM

stand zufällig gleich groß sind, können sich die Verdrängungseffekte aufheben²⁵.

Bei den Medikamenten der Tab. II waren die beobachteten Wirkungen so gering, daß auf eine ausführliche Wiedergabe verzichtet wurde. Während Oxytetracyclin und Dihydroergotamin (Gemisch aus Methansulfonaten von Dihydroergo-cornin, -cristin und -kryptin $\alpha\alpha$) T_3 und T_4 aus den Mitochondrien verdrängten, verstärkte Propranolol die Desorption aus den löslichen Proteinen, wenn auch nur in geringem Umfang.

Tab. II a. Medikamente, bei denen der Verdrängungseffekt durch Zusatz löslicher Proteine fast völlig abgepuffert wird.

Präparat	untersuchter Konzentrationsbereich
Oxytetracyclin (Terravenös®)	0,86–0,027 mM
Dihydroergotoxin (Hydergin®)	0,02–0,0003 mg%

Tab. II b. Medikamente, welche die Desorption aus löslichen Proteinen in geringem Umfang verstärken.

Präparat	untersuchter Konzentrationsbereich
Propranolol (Dociton®)	144–2,3 μ M
Natriumsalizylat	2,5–0,04 mM

Erhebliche Veränderungen der Bindung von T_3 und T_4 bewirkten die nachfolgend aufgeführten Substanzen. Die Verdrängungswirkung läßt sich zwar nicht in Absolutwerten angeben, jedoch ist ein Vergleich anhand der Kurvenverläufe möglich.

Unter den Phenothiazinderivaten verdrängte das Chlorpromazin (N-(3'-Dimethylamino-propyl)-3-chlorphenothiazin) ohne Zusatz löslicher Proteine weder T₄ noch T₃ aus der Mitochondrienbindung (Abb. 3). Es zeigte sogar einen gegenteiligen Ef-

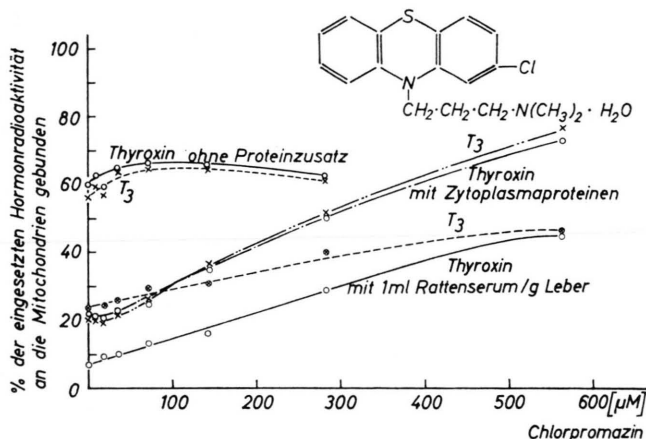


Abb. 3. Verdrängung der Schilddrüsenhormone aus der Serum- und Zytoplasmabindung an die Mitochondrien durch Chlorpromazin (Megaphen®). Ohne Zusatz löslicher Proteine zeigt Chlorpromazin keinen sicheren Einfluß auf die Hormonbindung. In Gegenwart von Serum und Zytoplasma kommt es jedoch mit steigender Chlorpromazinkonzentration zu einem Anstieg der Hormonaktivitäten an den Mitochondrien. Beim Vergleich der Kurven sind die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen zu berücksichtigen.

fekt: In Gegenwart von Rattenserum wurde vor allem T₄, aber auch T₃ aus den löslichen Proteinen an die Mitochondrien hin verdrängt. Auch in Gegenwart von Mikrosomen und löslichen Zytoplasmaproteinen trat diese Verschiebung auf, wobei die Mitochondrien T₃ und T₄ etwa gleichmäßig verstärkt adsorbierten. Beim Vergleich der Zytoplasma- und Serum-Verdrängungskurven sind jedoch die unterschiedlichen Ausgangswerte zu berücksichtigen.

Im Verhältnis zu Chlorpromazin wirkte das chlorfreie Promethazin (N-(2'-Dimethylamino-propyl)-phenothiazin) erheblich weniger adsorptionsverstärkend an den Mitochondrien, wenngleich ein prinzipiell ähnlicher Effekt zu beobachten war (Tab. III A).

2.4-Dinitrophenol, welches die oxydative Phosphorylierung stärker als die Phenothiazine entkoppelt¹⁵ und die Schilddrüsenhormone aus den Serumproteinen verdrängt^{21, 27}, nimmt eine Mittelstellung zwischen Chlorpromazin und Promethazin ein: Es drängt T₃ und T₄ ganz allmählich aus löslichen Proteinen an die Mitochondrien ab (Tab. III B).

Genau entgegengesetzt wie Dinitrophenol, Chlorpromazin und Promethazin wirkten einige andere Substanzen. Bromsulfalein (3.3-Bis-(3-sulfo-4-hydroxyphenyl)-4.5.6.7-tetrabromphthalid) wird ähnlich wie Bromphenolblau^{33, 37} an Zytoplasmaproteine gebunden^{32b}. Es verursachte ohne Zusatz löslicher Proteine eine starke Desorption von T₃ und T₄ aus der Mitochondrienbindung (Abb. 4). Dieser Desorptionseffekt wurde durch Zytoplasma abgeschwächt, ebenso bei sehr hohen Farbstoffkonzentrationen durch Serumproteine, obwohl Bromsulfalein die Schilddrüsenhormone gleichzeitig auch aus den Serumproteinen verdrängt^{28, 6a}. Bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen, welche dem üblichen diagnostischen Bereich entsprechen, verdrängte Bromsulfalein T₃ stärker als T₄ aus den Serumproteinen in Richtung zu den Mitochondrien hin (Tab. III C).

Phenylbutazon zählt ebenfalls zu den Substanzen, welche die Schilddrüsenhormone aus der Se-

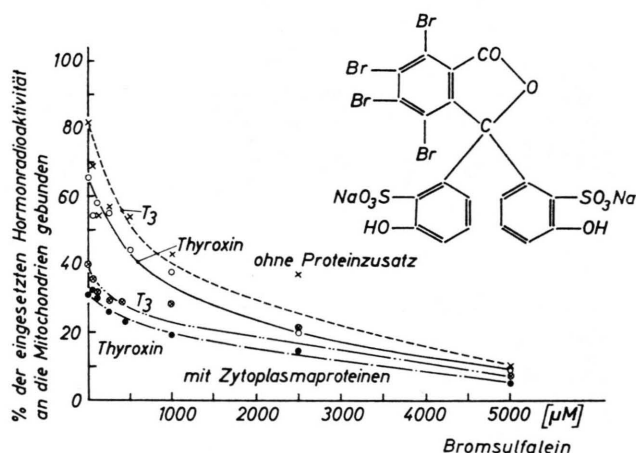


Abb. 4. Desorptionseffekt von Bromsulfalein (Bromthalein®) auf die Bindung von Schilddrüsenhormonen an Mitochondrien. Bromsulfalein verdrängt ohne Zusatz löslicher Proteine T₃ und T₄ aus der Bindung an Mitochondrien. Der Zusatz von Zytoplasma schwächt diesen Effekt ab. Jedoch kam es auch bei Zusatz von Serumproteinen zu einer überwiegenden Desorption von T₃ und T₄ aus den Mitochondrien (hier nicht wiedergegeben, da die Ergebnisse einem anderen Mitochondrienansatz entstammten).

rumproteinbindung verdrängen^{17-19, 28, 29, 6a}. Auch aus den Mitochondrien verdrängte Phenylbutazon T₃ und T₄ in Abwesenheit löslicher Proteine (Tab. III D). Zytoplasma schwächte die Desorptionswirkung ab, und mit Serumproteinen stellte sich bei hohen Phenylbutazonkonzentrationen ein Gleichgewicht ein.

Tab. III. Desorption von Thyroxin (T₄) und Trijodthyronin (T₃) aus der Bindung an Mitochondrien, flüssiges Zytoplasma und Rattenserum durch verschiedene Medikamente.

Medika- ment	Konzen- tration [μ M]	% der eingesetzten Hormonradioaktivität an die Mitochondrien gebunden				Medika- ment	Konzen- tration [μ M]	% der eingesetzten Hormonradioaktivität an die Mitochondrien gebunden						
		ohne Protein- zusatz	T ₃	T ₄	mit Serum mit Zytoplasma- proteinen			ohne Protein- zusatz	T ₃	T ₄	mit Serum mit Zytoplasma- proteinen			
(A)	—	69,4	73,3	19,5	4,3	(E)	—	63,7	68,4	35,2	14,8	29,9	31,3	
	32	72,3	74,5	17,8	8,8		27	60,7	63,0	35,2	12,8	31,1	31,8	
	64	77,2	80,1	17,7	7,6		54	53,2	55,2	37,0	13,1	28,8	30,0	
	125	78,2	80,8	18,3	7,1		108	52,9	53,8	34,2	12,4	27,4	29,0	
	250	80,5	81,3	20,0	8,0		216	46,0	42,2	33,2	10,9	25,8	27,9	
(B)	500	74,4	79,0	25,1	10,5	(F)	432	42,6	34,7	35,5	14,2	24,2	25,6	
	1000	73,7	74,3	32,7	16,1		865	39,8	27,6	31,1	13,3	24,2	23,3	
	—	63,8	67,6	15,5	12,7		1730	39,4	21,8	29,7	12,5	24,2	20,1	
	63	66,7	71,1	18,8	17,1		—	55,7	66,2	11,3	11,5	30,4	29,3	
	125	72,7	77,2	20,1	16,8		63	28,5	25,0	8,2	6,8	28,3	29,4	
(C)	250	73,9	78,6	21,8	15,5	(G)	250	19,4	10,6	8,9	6,6	26,2	29,2	
	500	74,6	78,6	25,4	17,4		500	16,0	8,4	7,7	6,3	23,4	25,3	
	1000	74,3	76,7	29,7	19,9		1000	10,6	6,3	6,9	5,7	21,9	18,0	
	2000	71,0	75,9	35,4	26,9		2000	6,1	4,7	4,8	4,6	15,8	10,6	
	—	67,2	77,0	15,2	26,2		4000	3,0	3,1	3,1	3,6	8,9	7,6	
(D)	4	64,4	76,3	16,1	27,6	(H)	—	49,2	55,3	14,4	11,1	34,8	34,5	
	8	61,3	72,8	16,8	28,7		5	51,3	54,9	15,2	11,3	37,4	36,4	
	15	59,7	70,4	17,5	29,1		10	48,8	53,5	16,0	12,1	36,2	35,6	
	30	59,9	68,6	19,1	29,3		19	46,8	51,4	17,8	13,3	36,6	36,2	
	60	56,0	65,5	23,4	32,8		38	48,0	50,8	17,7	12,7	37,8	37,7	
(E)	120	50,0	59,9	25,4	31,9	(I)	75	42,0	41,2	19,1	14,4	35,0	34,5	
	—	65,1	71,0	11,7	9,1		150	34,3	27,1	19,6	14,2	34,6	32,9	
	250	—	—	21,0	11,1		300	25,6	12,9	19,4	14,1	31,1	26,3	
	500	6,8	67,6	22,8	11,1		[USP-E pro ml Ansatz]	—	58,5	73,2	4,9	6,9	33,9	34,9
	1000	58,1	64,4	24,9	10,8		1,1	58,3	71,0	12,7	16,4	34,1	37,6	
(F)	2000	56,6	61,0	24,6	13,0	(J)	2,1	56,5	66,5	12,0	11,8	34,5	37,1	
	4000	51,2	51,9	19,6	12,5		4,2	50,1	60,8	11,6	11,2	31,2	33,4	
	8000	46,0	44,3	21,2	13,0		8,4	48,5	59,9	12,7	11,1	29,2	30,1	
	—	65,1	71,0	11,7	9,1		17,0	45,6	56,6	13,5	10,0	—	—	
	250	—	—	21,0	11,1		34,0	43,9	53,1	15,9	9,2	23,5	25,1	

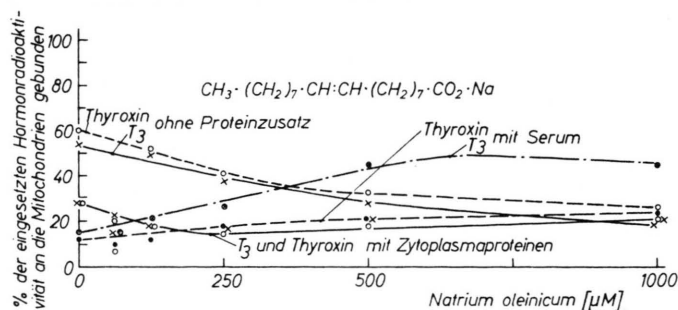


Abb. 5. Verdrängung von Schilddrüsenhormonen durch Ölsäure. Natriumoleat desorbiert ähnlich wie Bromsulfalein T_3 und T_4 aus den Mitochondrien. Die Desorption von T_3 aus Rattenserum ist aber viel stärker als die von T_4 , und die Mitochondrien übernehmen das freigesetzte T_3 .

Phenobarbital, Phenytoin, Silymarin sowie Heparin wirkten ähnlich wie Bromsulfalein und Phenylbutazon: Ohne Zusatz löslicher Proteine erfolgte eine Desorption der Hormone aus den Mitochondrien; Zytoplasma und Rattenserum schwächten diese Desorption ab (Tab. III E – H).

Natriumsalicylat²⁷ verdrängte die Schilddrüsenhormone nicht meßbar aus den Mitochondrien. Dagegen wurde aus Rattenserum durch Salicylat vorzugsweise T_3 desorbiert und von den Mitochondrien aufgenommen.

Natriumoleat^{28, 6a} desorbierte ohne Zusatz löslicher Proteine die Schilddrüsenhormone aus den Mitochondrien (Abb. 5). Da es sich aber um eine Seife mit hoher Oberflächenaktivität handelt, kann die Möglichkeit einer Schädigung der Organellenmembran nicht ausgeschlossen werden. Zytoplasma pufferte auch hier die Desorption ab, und aus Rattenserum wurde T_3 stärker als T_4 durch Oleat an die Mitochondrien abgedrängt.

Diskussion

Entgegen einer weitverbreiteten Vorstellung ist die Bindung von Schilddrüsenhormonen an Proteine verhältnismäßig leicht reversibel, wenn an der Einstellung monphasischer^{30, 31} oder diphasischer Verteilungsgleichgewichte geeignete biologische Adsorbentien beteiligt sind. Die Verteilung zwischen der festen Mitochondrienphase und der flüssigen Phase der löslichen Proteine läßt sich als Resultante ungefähr nach der folgenden empirischen Formel beschreiben⁵:

$$m' = n' \cdot q' / (k' + q').$$

m' = An das Mitochondriensediment gebundene Schilddrüsenhormone, in Prozenten des zugesetzten Hormons ausgedrückt (in älteren Untersuchungen^{5, 6a} als a_g' bezeichnet);

n' = extrapolierter Sättigungswert des Mitochondriensediments;

k' = Verteilungskoeffizient;

$q' = ([s]/[l] - m')$;

$[s]$ = Proteinkonzentration im Mitochondriensediment nach Abzentrifugieren;

$[l]$ = Konzentration an löslichen Zytoplasma- oder Serumproteinen im Überstand der abzentrifugierten Mitochondrien (früher mit \bar{u} bezeichnet).

Die Werte für n' sind bei physiologischen Hormonkonzentrationen hauptsächlich abhängig vom Verhältnis der Proteinkonzentrationen in beiden Phasen des Homogenats; n' liegt also um so höher, je weniger lösliches Protein (l) eine Mitochondrien-suspension enthält. In früheren Experimenten bewegte sich n' zwischen 0,42 und 0,95^{6a}. Für Thyroxin lagen die k' -Werte in drei Versuchspaaren etwa zwei- bis sechsmal höher als für Trijodthyronin, je nachdem ob Rattenserum oder lösliche Zytoplasmaproteine in Saccharose- oder in Elektrolytlösung verwendet wurden.

Wie in solchen biologischen Systemen mit etwa einem halben Dutzend von adsorbierenden Proteinen^{32a, 32b, 33} und ebenso vielen verschiedenen Assoziationskonstanten und Sättigungswerten nicht anders zu erwarten ist, wechselte die Übereinstimmung von gemessenen und berechneten Kurvenpunkten^{6a}. Immerhin beschreibt die Formel die resultierenden Verteilungsgleichgewichte der Schilddrüsenhormone annäherungsweise. Vor allem erklärt sie den nichtlinearen Verlauf der Desorptionskurven auch im Bereich der physiologischen Hormonkonzentrationen.

Aus der Abhängigkeit der Mitochondrienadsorption von $[l]/[s]$ und aus den erheblichen Hormonmengen, welche sich aus den Proteinen durch manche Medikamente verdrängen lassen, geht die

nahezu vollständige Reversibilität der Adsorption von T_4 und T_3 hervor. Somit kann der von Sterling³⁴ angegebene dialysierbare „freie“ Anteil des T_4 von etwa einem halben Promille in Humanserum nicht als Absolutmaß für das biologisch wirksame Schilddrüsenhormon betrachtet werden. Diese Überlegung steht im Einklang mit der Auffassung Oppenheimers²³.

Über den Transport adsorbierbarer Substanzen aus dem Serum in die Zelle hinein können gegenwärtig nur Vermutungen angestellt werden, da die Glieder der Transportketten erst teilweise bekannt sind. Grundsätzlich sind drei Ausgangssituationen denkbar:

a. Keine Bindung an Serumproteine, sondern nur an intrazelluläre Proteine. In diesem Falle würden lediglich der Widerstand der Kapillar- und Zellmembranen sowie die Abbaugeschwindigkeit darüber entscheiden, wie rasch die Substanz aus der Blutbahn schwindet³⁵.

b. Bindung an Serumproteine und an intrazelluläre Proteine. Hier müßte das Verhältnis zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Adsorption den wichtigsten primären Faktor eines passiven Transports darstellen. Der Widerstand der Zellmembran und die Abbaugeschwindigkeit wären hier sekundäre Faktoren. Würde der Schwund aus dem Blut schneller erfolgen, als das Adsorptionsverteilungsgleichgewicht erwarten ließe, so käme entweder eine Zwischenadsorption an Membranen in Frage, oder die Membranen müßten die Passage im Sinne eines aktiven Transports fördern. Jedoch muß eine intrazelluläre Anreicherung nicht unbedingt auf einem aktiven Transport beruhen, es kann sich auch um passive Adsorptions- und Speichervorgänge handeln³⁵⁻³⁷.

c. Bindung nur an Serumproteine, nicht an intrazelluläre Proteine. Solche Substanzen können die Blutbahn bei starker Adsorption nur entweder zusammen mit den Vehikeln verlassen, oder es muß bei raschem Schwund ein aktiver Transport durch die Membran angenommen werden.

Für die Schilddrüsenhormone gilt die unter b. aufgeführte Konstellation: Adsorption an Proteine beidseits der Kapillar- und Zellmembranen. Innerhalb der Zelle wird T_3 stärker als T_4 an die Mitochondrien^{5, 6a} und Kerne²⁴ adsorbiert. Da jedoch T_4 an die Serumproteine viel stärker gebunden ist als das T_3 , schwindet T_4 mit einer Halbwertszeit von einer Woche beim Menschen erheblich langsamer

aus der Blutbahn als das T_3 mit seiner Halbwertszeit von ein bis zwei Tagen. Die Verteilungsgleichgewichte in Abwesenheit trennender Membranen lassen aber für beide Hormone einen schnelleren Schwund erwarten. Folglich übt die biologische Membran einen hemmenden Einfluß auf den Transport von T_3 und T_4 aus.

Da die Schwundgeschwindigkeit der Schilddrüsenhormone von der Adsorption an die Serumproteine mitbestimmt wird, steht zu erwarten, daß eine Verschiebung der Verteilungsgleichgewichte durch Medikamente den Abstrom ins Gewebe modifizieren kann. Tatsächlich sind von einigen hier untersuchten Medikamenten verschiedenartige Einflüsse auf den Hormonstoffwechsel oder auf klinisch-chemische Parameter der Schilddrüsenfunktion bekannt.

Beispielsweise beschleunigt Phenobarbital über eine Enzyminduktion den Thyroxinabbau in der Leber²⁴. Phenytoin dagegen erhöht lediglich die Aufnahme von $^{131}\text{J}-T_4$ in der Leber²⁴, obwohl es *in vitro* die Verteilungsgleichgewichte der Schilddrüsenhormone ähnlich wie Phenobarbital verschiebt. Die Desorption der Schilddrüsenhormone aus den Mitochondrien durch Phenytoin ließe ohnehin eine umgekehrte Wirkung erwarten, also eine verminderte T_4 -Aufnahme durch die Leber. Möglicherweise liegen aber die Verhältnisse bei langfristiger Phenytoinapplikation ganz anders als nach rascher intravenöser Injektion.

Heparin beeinflusst *in vivo* die Kinetik von Thyroxin, indem es T_4 gleichzeitig aus den Serumproteinen⁴¹ und aus den Lebermitochondrien verdrängt. Infolgedessen steigt unter einer Heparintherapie außer dem Thyroxinspiegel im Blut vor allem die Konzentration an „freiem“ Thyroxin (FT_4) an⁴²⁻⁴⁵, ähnlich wie Bromsulfalein durch Desoxycholsäure aus der Leber in die Blutbahn zurückbefördert werden kann⁴⁷. Möglicherweise blockiert Heparin T_4 -Bindungsplätze nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Organen, so daß der erhöhte FT_4 -Spiegel den Stoffwechsel nicht nachteilig beeinflusst.

Wie die Beispiele von Phenytoin und Heparin zeigen, führt die einseitige Betrachtung des Thyroxinstoffwechsels unter dem Gesichtspunkt der Verdrängung von T_4 allein aus den Serumproteinen oder aus den Zellproteinen zu keiner Erklärung der komplizierten Vorgänge. Auch die Adsorptions-Verteilungsgleichgewichte allein lassen keine sichere Voraussage über den Einfluß eines

Medikaments auf den T_4 -Schwund zu. Jedoch gestattet die Kenntnis der Adsorptions-Verteilungsgleichgewichte auch bei scheinbaren Widersprüchlichkeiten neue Rückschlüsse auf Details von Arzneimittelwirkungen.

Methoden

Albinoratten ♀ (Ivanovas, Kisslegg), 200–300 g schwer, wurden in Äthernarkose durch Herzpunktion entblutet. Die Leber wurde von der Pfortader aus mit 37 °C warmer Biosteril®-Lösung perfundiert, bis sie blutfrei erschien. Anschließend wurde mit 0,44 M (150 g/l) körperlwarmer Saccharoselösung so lange perfundiert, bis die Oberfläche glasig glänzte. Nach Abfließen der überschüssigen Zuckerlösung bei 2–4 °C wurde die Leber mit dem Skalpell zerkleinert und in einem Dounce'schen Glashomogenisator (Braun, Melsungen) mit dem losen Stempel in eiskalter Zuckerlösung homogenisiert³⁹. Pro Gramm Leber kamen 4 ml Zuckerlösung und 0,03–0,04 ml einer frisch angesetzten 0,1 M Zitronensäurelösung. Ein aliquoter Teil von 2–3 ml des Homogenats aus mehreren gleichzeitig verarbeiteten Lebern wurde auf Zimmertemperatur erwärmt und sein pH-Wert auf 6,2 eingestellt. (Bei pH < 6,0 werden die Mitochondrien irreversibel geschädigt, und bei pH 7,4 zeigen sie ihre größte Schwellung.)

Im Kühlraum (6–8 °C) wurde das übrige Homogenat mit Zuckerlösung auf das doppelte Volumen verdünnt und mit $675 \times g$ 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Sediment enthielt unzerstörte Zellen und die Kernfraktion, der Überstand eine Suspension von Mitochondrien und Mikrosomen in flüssigem Zytoplasma („Zellsaft“). Aus diesem Überstand lassen sich die Mitochondrien bei $13000 \times g$ (10 min) abtrennen, die Mikrosomen anschließend bei $25000–30000 \times g$ (30 min).

Das mitochondrienhaltige Sediment wurde einmal mit Zuckerlösung gewaschen, wobei das Volumen der Waschflüssigkeit dem einfachen Homogenatvolumen entsprach. Dennoch waren die Mitochondrien stets mit Mikrosomen verunreinigt. Die Mitochondrien wurden mit Zuckerlösung auf das 1,2-fache der ersten (1:5) Homogenatverdünnung aufgefüllt, also auf 1:6 verdünnt, mit dem losen Stempel des Homogenisators rehomogenisiert und mit radioaktiven Schilddrüsenhormonen versetzt: 6 ng [^{125}J]Trijodthyronin und 10 ng [^{131}J]Thyroxin/ml Suspension. Die Radioaktivitätskonzentrationen lagen zwischen 0,1 und 0,5 $\mu Ci/ml$ Suspension.

Von dieser Mitochondrien-Stammssuspension wurden je 5 ml in vorgekühlte 25-ml-Meßkölbchen eimpetiert, so daß die Endkonzentrationen

$2,6 \cdot 10^{-9} M T_4$ und $1,8 \cdot 10^{-9} M T_3$ betrugen. Die Medikamente wurden in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt und je nach Versuch mit 0,9–1,0 ml Rattenserum oder mit 10 ml des mit Zuckerlösung verdünnten, mikrosomenhaltigen Zytoplasmas (also aus 1 g Leber) versetzt. Für einige orientierende Versuche diente mikrosomenfreies Zytoplasma.

Die Meßkölbchen wurden mit kalter Zuckerlösung ad 25 ml aufgefüllt und daraus in Doppelansätzen je 2×3 ml (= 12 ml) entnommen. Je eine Probe der Doppelansätze diente als 100%-Wert, aus der anderen wurden die Mitochondrien bei $13000 \times g$ abzentrifugiert und einmal mit Zuckerlösung gewaschen; schließlich wurden die Radioaktivitäten der beiden Proben verglichen.

In den älteren Untersuchungen (Abbn. 1 und 2) war die Proteinstickstoff-Konzentration nach Kjeldahl in den Mitochondriensuspensionen vor und in den Überständen nach dem Abzentrifugieren bestimmt worden^{6a}. In den neueren Versuchen mit Medikamenten verwendeten wir die von Lowry modifizierte Methode nach Folin-Ciocalteu.

Die Medikamente wurden, soweit verfügbar, aus handelsüblichen Ampullenlösungen entnommen. Bei diesen läßt sich zwar ein Einfluß von Lösungsvermittlern und Stabilisatoren nicht ausschließen, doch werden solche Zusätze letzten Endes auch dem Patienten mitinjiziert. Die angegebenen Arzneimittelkonzentrationen gelten für die 25-ml-Suspensionen. Bei der Wahl der Ausgangskonzentrationen der Stammlösungen wurde die Annahme zugrundegelegt, daß die gesamte tägliche Höchstdosis eines Medikaments nach intravenöser Injektion in einem Volumen von 3 l enthalten sei. In wenigen Fällen lagen die Ausgangskonzentrationen über der vom Hersteller angegebenen Maximaldosis. Solche Überschreitungen sind vertretbar, da Überdosierungen auch beim Menschen nicht selten vorkommen.

[^{131}J]Trijodthyronin (Radiothybon®, spezifische Radioaktivität etwa 30 $\mu Ci/\mu g T_3$) und [^{131}J]Thyroxin (spezifische Radioaktivität etwa 10 $\mu Ci/\mu g T_4$) stammten von den Farbwerken Hoechst. [^{125}J]Trijodthyronin wurde teils von Amersham/Buchler, Braunschweig, teils von Abbott, Ingelheim, mit spezifischen Aktivitäten von etwa 50–100, gelegentlich auch 400 $\mu Ci/\mu g T_3$ bezogen. Stichprobenweise wurden Chromatogramme zur Reinheitskontrolle angefertigt.

Die Verdrängungsversuche wurden in verschiedenen Monaten reproduziert. Ein Vergleich der Absolutwerte ist jedoch nicht möglich, da der Mitochondriengehalt verschiedener Präparationen nicht von vornherein konstant gehalten werden kann und das Verhältnis zwischen sedimentierbaren und löslichen

Proteinen von Tier zu Tier Schwankungen unterworfen ist. Schließlich sind Ratten als „Halbwinterschläfer“ in verschiedenen Jahreszeiten unterschiedlich empfindlich gegenüber Thyroxin⁴⁰.

Fräulein H. Kaltenbach danken wir für die vorzügliche Assistenz, Herrn J. Büchtmann für das Zeichnen der Diagramme.

- ¹ H. Bennhold, *Ergebn. Inn. Med. Kinderheilk.* **42**, 273 [1932].
- ² H. Bennhold u. H. Ott, *Handbuch der allgemeinen Pathologie* (F. Büchner, E. Letterer, F. Roulet, eds.), **5. Bd.**, 1. Tl., p. 166, Springer, Berlin 1961.
- ^{3a} J. M. Klotz u. J. Ayers, *Discuss. Faraday. Soc.* **13**, 189 [1953].
- ^{3b} F. H. Dost, *Grundlagen der Pharmakokinetik*, 2. A., p. 104, Thieme, Stuttgart 1968.
- ⁴ E. Kallee, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **290**, 207 [1952].
- ⁵ E. Kallee, *Protides of the Biological Fluids* (Proc. 7th Colloq., Bruges 1959 (H. Peeters, ed.), p. 161, Elsevier, Amsterdam 1960.
- ^{6a} E. Kallee, *Acta Isotop.* **VI**, Suppl. I, 1–98 [1966].
- ^{6b} H. Remmer, *Dtsch. Med. Wschr.* **99**, 413 [1974].
- ^{6c} H. Reyes, A. J. Levi, Z. Gatmaitan u. I. M. Arias, *J. Clin. Invest.* **50**, 2242 [1971].
- ⁷ N. Freinkel, S. H. Ingbar u. J. T. Dowling, *J. Clin. Invest.* **36**, 25 [1957].
- ⁸ S. Lissitzky, *Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung* **4**, p. 315, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin 1960.
- ⁹ E. Kallee, R. Wahl, K. H. Secker, D. Mallet u. J. Böhner, *Med. Klin.* **68**, 1689 u. 1733 [1973].
- ¹⁰ S. Reichlin, J. Bollinger, I. Nejad u. P. Sullivan, *Mount Sinai J. Med.* **40**, 502 [1973].
- ¹¹ J. Robbins u. J. E. Rall, *Phys. Rev.* **40**, 415 [1960].
- ¹² J. R. Tata, *Brit. Med. Bull.* **16**, 142 [1960].
- ¹³ J. R. Tata, *Recent Progr. Hormone Res.* **18**, 221 [1962].
- ¹⁴ C. Osorio u. N. B. Myant, *Brit. Med. Bull.* **16**, 159 [1960].
- ¹⁵ G. Siebert, *Handbuch der allgemeinen Pathologie. Stoffwechsel und Feinstruktur der Zelle* **I**, 2. Bd. (bearb. von E. Mölbert, W. Oehlert, B. Schultze, G. Siebert, redigiert von F. Büchner), Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1968.
- ¹⁶ H. Ott u. E. Kallee, *Kolloid-Z. Z. Polym.* **127**, 40 [1952].
- ¹⁷ M. Benmiloud, *Ann. Endocr. (Paris)* **23**, 533 [1962].
- ¹⁸ S. Debiassi, S. Marinis u. E. Kallee, *Acta Isotop.* **3**, 41 [1963].
- ¹⁹ F. W. Aly, W. Hadam, E. Kallee u. G. Kloss, *Radioisotope in Pharmakokinetik und klinischer Biochemie*, 6. Jahrestagung der Gesellschaft für Nuklearmedizin, 26.–28. September 1968 (W. Keiderling, G. Hoffmann u. H. A. Ladner, ed.), p. 197, F. K. Schattauer, Stuttgart 1970.
- ²⁰ H. L. Schwartz, A. R. Schadow, D. Faerman, M. I. Surks u. J. Oppenheimer, *J. Clin. Endocr.* **36**, 598 [1973].
- ^{21a} F. L. Hoch, *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 248 [1968].
- ^{21b} P. England, W. A. Harland, J. S. Orr u. T. W. Randall, *J. Physiol. (London)* **229**, 33 [1973].
- ²² J. H. Oppenheimer u. R. R. Tavernetti, *Endocrinology* **71**, 496 [1962].
- ^{23a} J. H. Oppenheimer, *New Eng. J. Med.* **278**, 1153 [1968].
- ^{23b} J. H. Oppenheimer, M. I. Surks u. H. L. Schwartz, *Recent Progr. Hormone Res.* **25**, 381 [1969].
- ²⁴ J. H. Oppenheimer, *Mayo Clin. Proc.* **47**, 864 [1972].
- ²⁵ R. Wahl, J. Böhner, R. Oekonomopoulos, B. Steiner, H. Hagenmaier u. E. Kallee, *Arzneimittelforschung* **23**, 1009 [1973].
- ²⁶ M. B. Wechsler u. L. Roizin, *J. Ment. Sci.* **106**, 1501 [1960].
- ²⁷ L. K. Christensen, *Acta Med. Scand.* **166**, 133 [1960].
- ²⁸ E. Kallee, *Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung* **4**, p. 378, Urban und Schwarzenberg, München 1960.
- ²⁹ S. Marinis, S. Debiassi u. E. Kallee, *Acta Isotop.* **3**, 269 [1963].
- ³⁰ E. Kallee, F. Lohss u. S. Debiassi, *Nuclearmedizin*, **2**, Suppl. **1**, 111 [1962].
- ³¹ E. Kallee, G. Lang u. W. Heinzel, *Acta Isotop.* **3**, 303 [1963].
- ^{32a} H. Grimminger, F. Heni u. E. Kallee, *Z. Naturforsch.* **17 b**, 769 [1962].
- ^{32b} A. J. Levi, Z. Gatmaitan u. I. M. Arias, *J. Clin. Invest.* **48**, 2156 [1969].
- ³³ H. Grimminger, *Acta Isotop.* **2**, 21 [1962].
- ³⁴ K. Sterling u. M. A. Brenner, *J. Clin. Invest.* **45**, 153 [1966].
- ³⁵ J. Wollensak, E. Kallee u. G. Seybold, *Z. Naturforsch.* **10 b**, 582 [1955].
- ³⁶ G. Seybold, *Die Medizinische* **1958**, 1232.
- ³⁷ E. Kallee u. W. Oppermann, *Z. Naturforsch.* **13 b**, 532 [1958].
- ³⁸ W. Eger, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **224**, 1 [1954].
- ³⁹ A. L. Dounce, R. F. Witter, K. J. Monty, S. Pate u. M. A. Cottone, *J. Biophys. Biochem. Cytology* **1**, 139 [1955].
- ⁴⁰ C. Martius u. B. Hess, *Arch. Biochem.* **33**, 486 [1951].
- ⁴¹ F. Clark u. K. R. Crispell, *J. Clin. Endocr.* **27**, 153 [1967].
- ⁴² D. L. Schatz, R. H. Sheppard, G. Steiner, C. S. Chandrapaty u. G. A. de Veber, *J. Clin. Endocr.* **29**, 1013 [1969].
- ⁴³ M. Saed-Uz-Zafar, J. M. Miller u. G. M. Breneman, *J. Clin. Endocr.* **32**, 633 [1971].
- ⁴⁴ J. M. Hershman, C. M. Jones u. A. L. Bailey, *J. Clin. Endocr.* **34**, 574 [1972].
- ⁴⁵ J. Herrmann, P. Hilger, H. J. Rusche u. H. L. Krüskemper, *Dtsch. Med. Wschr.* **99**, 888 [1974].
- ⁴⁶ E. Kallee, *Dtsch. Med. Wschr.* **99**, 1369 [1974].
- ⁴⁷ N. Lang, *Klin. Wschr.* **37**, 931 [1959].