

den anderen Hefesterolen 27 C-Atome enthält. Bei ihm ist die Kondensation an C<sub>24</sub> nicht eingetreten. Man kann dies so erklären, daß in ihm durch Wanderung der Doppelbindung C<sub>22</sub>—C<sub>23</sub> in Konjugation zu der in C<sub>25</sub>—C<sub>27</sub>, die zur Kondensation an C<sub>24</sub> notwendige CH<sub>2</sub>-Gruppe verschwunden, so daß das Zymosterol im Gegensatz zu allen anderen Hefesterolen auf der C<sub>27</sub>-Stufe verbleibt. Durch Hydrierung in 1,4-Stellung oder durch nachträgliche Verschiebung einer bei der biochemischen Hydrierung verbleibenden Doppelbindung nach C<sub>24</sub>—C<sub>25</sub> könnte so die Seitenkette des Zymosterols gebildet werden. Für das tierische Cholesterin dürfte entweder der Mangel an geeigneten C<sub>1</sub>- oder C<sub>9</sub>-Partnern in der Zelle oder eine zu schnelle Absättigung der Doppelbindungen die Ursache sein, daß in ihm die Seitenkette nicht weiter substituiert wird.

#### Schlußbemerkung

Die letzten Jahrzehnte haben auf dem Steroidgebiet eine Fülle von neuen Erkenntnissen und Entdeckungen gebracht, und das Tatsachenmaterial wird sich, vermutlich

vornehmlich aus dem Pflanzenreich, in den nächsten Jahren noch weiter vermehren. Es wird sich zeigen, wie weit die hier gezogenen Folgerungen eine Grundlage zur Klärung des biochemischen Syntheseweges der Sterole sein werden. Es wurde versucht, die bisherigen Ergebnisse unter dem übergeordneten Gesichtspunkt dieser Synthese zu ordnen und so Anregungen zu geben, sich mit diesem Gebiet durch weitere Versuche zu befassen.

Daß es möglich war, schon so weitgehende Folgerungen zum Syntheseweg der Steroide zu ziehen, wurde einmal durch das große Tatsachenmaterial auf dem Gebiet der Cardenolide und Bufadienolide erreicht, das vor allem durch *T. Reichstein* in den letzten Jahren angesammelt worden ist, sowie bei den Spirostanolen durch *R. E. Marker*. Dann aber war es die glückliche Auffindung des Mesogenitogens und Picrotoxinins mit ihrer Konstitution, die sehr befriedigend auf die Bemühungen zur Klärung des biochemischen Syntheseweges der Steroide wirken.

[A 465/456]

## Die Anwendung von radioaktiven und stabilen Isotopen in der pharmakologischen Forschung

Von Dr. MAX FRIMMER, Mainz

Aus dem Max-Planck-Institut für Chemie

Die große Anzahl der heute verfügbaren Isotopen gestattet, zusammen mit neuen Untersuchungen, Trennungs- und Meßverfahren Umsetzung und Verbleib von zahlreichen Pharmazeutika im Körper messend zu verfolgen. Aus analytischen Gründen bisher oft überhöhte, unphysiologische Dosen sind nicht erforderlich. Damit ergeben sich neue Ergebnisse über Wirkungsort, Wirkungsweise, den Verbleib der Abbauprodukte usw. Da die Literatur des Gebietes schon sehr umfangreich ist, sei hier versucht, einen Einblick in die prinzipiellen Möglichkeiten zu geben.

#### Einleitung

Die Indikatormethoden bedeuten für fast alle Zweige der experimentellen Medizin und Biologie eine wesentliche Bereicherung der methodischen Möglichkeiten. Dies gilt besonders für die Biochemie und Pharmakologie. Der quantitative Nachweis von Substanzen geringer Konzentration stellt hier häufig Probleme, die entweder nur mit erheblichem Arbeitsaufwand oder unter Benutzung biologischer Testverfahren, nicht selten aber unzureichend oder gar nicht gelöst werden können. Oft hilft man sich dadurch, daß man die betr. Stoffe in unphysiologisch hohen oder therapeutisch ungebräuchlichen Konzentrationen anbietet. Dieses Zugeständnis auf Kosten der physiologischen bzw. normalen therapeutischen Verhältnisse muß zwangsläufig zu Trugschlüssen führen. Viele dieser Fehlermöglichkeiten werden durch Markierung der betreffenden Substanzen mit radioaktiven Isotopen vermieden. Es sollen hier eine Reihe von Beispielen aus der Pharmakologie aufgeführt werden, welche die genannten Vorteile der Indikatormethode veranschaulichen.

#### Urethan

1946 wurde die Urethan-Therapie der Leukämien und malignen Lymphdrüsentumoren bekannt<sup>1)</sup>. Das Fehlen analytisch leicht erfaßbarer Gruppen in der Molekül des Äthylurethans ließ eine Mikrobestimmung mit hinreichender Genauigkeit und Spezifität nicht zu. Die einzige brauchbare Methode war die Verseifung des Urethans

und Bestimmung des Alkohols<sup>2)</sup>. Um einigermaßen reproduzierbare Analysenergebnisse zu erhalten, mußte man beispielsweise Mäusen 1400 mg/kg injizieren, während die therapeutische Dosis beim Menschen etwa bei 15 mg/kg liegt. Von einer exakten analytischen Erfassung in Organen oder Exkrementen konnte bei dieser Methode keine Rede sein. Da ein Abbau des Urethans vermutlich zu körpereignen Stoffwechselprodukten führen mußte, war die Verfolgung der Substanz im Organismus unmöglich. Diese Schwierigkeiten konnten durch Markierung des Äthylurethans mit <sup>14</sup>C an der Carbaminsäure-Komponente umgangen werden<sup>3)</sup>. Es zeigte sich, daß nahezu das ganze <sup>14</sup>C innerhalb 24 h nach der Injektion als <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> ausgetatmet wurde.

Ein besonderer Vorzug der radioaktiven Markierung liegt darin, daß das markierte Atom an verschiedenen Stellen einer Molekül eingebaut werden kann. Im Falle des Urethans kam also nicht nur eine Carbonyl-Markierung in Frage, sondern auch eine solche am Alkohol<sup>4)</sup>. Die Versuche ergaben, daß das Äthylurethan in vivo vermutlich zu CO<sub>2</sub>, Äthylalkohol und Ammoniak hydrolysiert wird. Alle drei Komponenten kommen im Organismus schon physiologisch vor und könnten also in der vorliegenden Größenordnung chemisch-analytisch nicht erfaßt werden. <sup>14</sup>C aber, das aus dem Abbau einer organischen Verbindung stammt, ist als <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in der Atemluft nachzuweisen.

<sup>2)</sup> H. E. Ascher, L. Campman, E. Rhoden u. F. L. Warren, Biochem. J. 42, 58 [1948].

<sup>3)</sup> C. E. Bryan, H. E. Skipper u. L. White jun., J. biol. Chemistry 177, 941 [1949].

<sup>4)</sup> H. E. Skipper, L. L. Bennet, C. E. Bryan, L. White jr., M. A. Newton u. L. Simpson, Cancer Res. 11, 46 [1951].

<sup>1)</sup> Paterson, Haddow, Thomas u. Watkinson, Lancet 1946, 677.

Gibt eine zu untersuchende  $^{14}\text{C}$ -markierte organische Verbindung bzw. eine Gruppe dieser Verbindung kein  $^{14}\text{CO}_2$  in der Atemluft, so liegt die Vermutung nahe, daß die betreffende Verbindung im Organismus nicht abgebaut wird. Es kann jedoch auch sein, daß zwar ein Abbau eintritt, dieser aber nicht bis zum  $^{14}\text{CO}_2$  führt (am Ring markierter Benzolring). Derartige Bruchstücke finden sich jedoch dann meist im Harn in Form von veresterten Phenolen u. dgl. wieder.

### Tumoraktive Substanzen

Eine Substanz, die heute ebenfalls bei der Bekämpfung von krebsartigen Erkrankungen eine Rolle spielt, ist der Stickstofflost (*Nitrogen-Mustard, Sinalost*). Auch hierbei handelt es sich um ein Pharmakon, das wegen seiner hohen Toxizität nur in geringen Konzentrationen in den lebenden Organismus gebracht werden darf. Die Markierung mit  $^{14}\text{C}$ <sup>5</sup>) ergab nach Injektion eine fast gleichmäßige Verteilung auf alle Organe. Es bestand kein Unterschied zwischen gesunden und kranken Tieren. Auch markierte Derivate des N-Lost wurden hergestellt und untersucht<sup>6)</sup>. Das ebenfalls tumoraktive Stilbamidin (Therapie des Multiplen Myeloms) wurde mit  $^{14}\text{C}$  indiziert<sup>7)</sup>. Hier wurde praktisch kein  $^{14}\text{CO}_2$  ausgeatmet. Die Verbindung wird im Laufe von Wochen im Harn ausgeschieden.

### Adrenalin

Der Typ einer Substanz, den man bisher biologisch nachzuweisen pflegte, stellt das Adrenalin dar. Auch diese Verbindung konnte mit  $^{14}\text{C}$  (in  $\beta$ -Stellung) markiert werden<sup>8)</sup>. Nach Injektion wurde sie sehr schnell aus dem Blut eliminiert. Die Hauptaktivität erscheint im Harn. Es entsteht kein einheitliches Stoffwechselprodukt, sondern eine Reihe verschiedener Verbindungen.

### Barbiturate, Anaesthetika

Der Nachweis von Barbituraten ist erfahrungsgemäß analytisch schwierig. Noch schwieriger ist der Nachweis von Stoffwechselprodukten dieser Verbindungen. Daher hat man Nembutal mit  $^{15}\text{N}$  markiert<sup>9)</sup> und Tieren per os verabreicht. Dabei wurden in 24 h 60% des Gesamt- $^{15}\text{N}$  wieder ausgeschieden. 8% wurden im Harn als Ammoniak und Harnstoff gefunden. Um zu prüfen, welche Bruchstücke beim Abbau der Verbindung auftreten, wurden die eventuell zu erwartenden Substanzen (Malonsäure, Acetyl-harnstoff, Acetamid, Malonamid) synthetisiert und der Harn einer Verdünnungsanalyse unterworfen<sup>10)</sup>.

**Isotopen-Verdünnungsanalyse:** In einem Stoffgemisch befindet sich in geringer Konzentration eine unbekannte isotopenhaltige Substanz, die durch chemische oder biochemische Reaktionen aus einer bekannten, vorher markierten Verbindung hervorgegangen ist. Besteht keine Möglichkeit zur Anreicherung und Isolierung, so setzt man zu Proben nacheinander alle Verbindungen in nicht markierter Form in ausreichender Menge zu, die ihrer Konstitution nach als das gesuchte Produkt in Frage kommen. Ist die zugegebene nicht markierte Verbindung mit der gesuchten markierten identisch, so wird die gesuchte Aktivität zusammen mit der wegen ihrer höheren Konzentration leicht erfaßbaren inaktiven Verbindung isoliert und chemisch angereichert. Man bestimmt die spezifische Aktivität (Verhältnis von aktiven und inaktiven Molekülen) bzw. die Häufigkeit des stabilen Isotops und daraus die Konzentration der gesuchten Verbindung. Umgekehrt

kann die Verdünnungsanalyse auch zur Identifizierung inaktiver Verbindungen benutzt werden.

Im Fall des Nembutals enthält keine der Verbindungen den  $^{15}\text{N}$ . Die Theorie einer Anreicherung der Barbiturate im Diencephalon von Hunden und Kaninchen konnte mit markierten Substanzen nicht bestätigt werden. Auch eine  $^{14}\text{C}$ -Markierung wurde vorgenommen. Keine nennenswerten Mengen von  $^{14}\text{CO}_2$  wurden ausgeatmet, während die Chromatographie im Harn fünf verschiedene Produkte zu unterscheiden erlaubte. Das Lumbalanaestetikum Dibromprokain konnte ebenfalls radioaktiv markiert untersucht werden<sup>11)</sup>.

### Antihistaminica

Ein biologisch sehr schönes Beispiel für die Zweckmäßigkeit radiochemischer Methoden in der Pharmakologie stellt das Antihistaminicum Benadryl dar<sup>12)</sup>. Man wußte von einer gewissen Anreicherung in der Lunge. Chemisch wurden nur 5–15% der verabreichten Dosis im Körper wiedergefunden.  $^{14}\text{C}$  markiertes Benadryl konnte nach 11 min zu 60–70% in der Lunge gefunden werden. Chromatographisch waren im Harn sechs verschiedene Verbindungen nachweisbar. Eine davon war unverändertes Benadryl. Ließ man der Chromatographie eine einstündige Hydrolyse bei 100° C in n HCl vorausgehen, so wurde nur eine einheitliche Verbindung gefunden, ein Hinweis auf die nahe strukturelle Verwandtschaft der Verbindungen. Ohne die Mittel der Radiochemie war in solchen Fällen bisher nur der Schluß möglich, daß die Substanz abgebaut wird. Nicht selten ist man aber gerade an diesen Zwischenprodukten besonders interessiert, zumal nicht immer das Heilmittel selbst, sondern dessen Stoffwechselprodukte die eigentliche pharmakologische Wirkung entfalten. Es sei in diesem Zusammenhang an das klassische Beispiel des Salvarsans erinnert.

Andererseits zeigt dies Beispiel, daß die Messung von Organen mit dem Geiger-Müller-Zählrohr keine Aussage über die Art der chemischen Verbindung zuläßt, in der die Aktivität vorliegt. Es kommt häufig vor, daß beim Abbau eines Pharmakons Zwischenprodukte oder Bruchstücke frei werden, die schon physiologisch in den Stoffwechsel eingehen. Solche physiologische Verbindungen oder Radikale werden natürlich vom Organismus zur Biosynthese benutzt und die Aktivität der Bruchstücke erscheint dann in entsprechenden körpereigenen Stoffen. Enthält z. B. ein Heilmittel eine  $^{14}\text{C}$  markierte Acetyl-Gruppe, die im Organismus fermentativ abgespalten wird, so ist zu erwarten, daß das Acetyl- $^{14}\text{C}$  in den intermediären Stoffwechsel eingeht. Die Lokalisation der Aktivität wird aber dort festgestellt werden, wo sich Folgeprodukte der Essigsäure befinden. In diesem Falle wäre der Schluß, Ort der Aktivität = Anreicherung des Heilmittels, völlig falsch.

### Dicumarol

Das Anticoagulans Dicumarol wurde in der Methyl-Gruppe mit  $^{14}\text{C}$  markiert<sup>13)</sup>. Den Verfassern erscheint es auf Grund der vorliegenden Stoffwechseluntersuchungen wahrscheinlich, daß das wirksame Stoffwechselprodukt die Salicylsäure ist. Demgegenüber wird die Ansicht vertreten, daß das Dicumarol auf Grund seiner strukturellen Verwandtschaft zum Vitamin K dieses verdrängt und die Synthese des Prothrombins unmöglich macht. Dicumarol wurde in der Methylen-Brücke mit  $^{14}\text{C}$  markiert. Nach i.v. Injektion an Mäusen oder Kaninchen wurden nach 1 h

<sup>11)</sup> F. Howarth, Brit. J. Pharmac. 4, 333 [1949].

<sup>12)</sup> A. J. Glazko u. Mitarb., J. biol. Chemistry 179, 409 [1949].

<sup>13)</sup> H. Wright u. Langham, zit. nach Nucleonics 8, 61 [1951].

schon 10–15% in der Leber gefunden. Dort verblieb die Aktivität bei Mäusen 16 h, bei Kaninchen 3 Tage. Dementsprechend dauerte die Senkung des Prothrombinspiegels im Blute der Mäuse 4 Tage, bei Kaninchen 9 Tage. Führte man Vitamin K zu, so verschwand das Dicumarol rascher aus der Leber als bei den Kontrollen<sup>13a</sup>). Es scheint also tatsächlich eine Konkurrenz zwischen Vitamin K und Dicumarol am Prothrombin-bildenden Fermentsystem vorzuliegen. Auch die Salicylsäure selbst markierte man mit <sup>14</sup>C<sup>14</sup>) und untersuchte sie im Tierversuch. Es findet kein Abbau bis zum CO<sub>2</sub> statt. Im Harn konnten auch bei dieser Versuchsreihe verschiedene Zwischenprodukte identifiziert werden.

### Meskalin

Eine Reihe von Tierversuchen wurden mit <sup>14</sup>C markiertem Meskalin ausgeführt<sup>15</sup>). Meskalin ruft beim Menschen Halluzinationen hervor, die den bei der Schizophrenie vorkommenden ähnlich sind. Mit <sup>14</sup>C in der Seitenkette war eine genauere Analyse des Stoffwechsels möglich. Man kann vermuten, daß die Halluzinationen nicht durch das Meskalin selbst hervorgerufen werden. Das Pharmakon wird in das Lebereiweiß eingebaut, wobei die höchste spezifische Aktivität des isolierten Proteins erst zwischen der dritten und fünften Stunde nach der Injektion gemessen wird. Diese Einbauzeit entspricht etwa der einer markierten Aminosäure. Es kann angenommen werden, daß die auftretenden Halluzinationen sekundärer Natur sind und möglicherweise von der Leber ausgehen.

### Blutersatzmittel

Eine Reihe von Untersuchungen beschäftigt sich mit der Anwendung von Blutersatzmitteln. So wurde Polyvinylpyrrolidon (Periston) mit <sup>14</sup>C markiert und mit diesem Produkt die Verweildauer im Blut, Verteilung und Elimination studiert<sup>16</sup>). Auch das Dextran (Polysaccharid von *Leuconostoc mesenteroides*) wurde durch Biosynthese mit <sup>14</sup>C markiert. Dabei konnte eine Aktivität von 116,8  $\mu$ C/g erreicht werden<sup>17</sup>). Es sei erwähnt, daß sich radiochemische Methoden bei der Untersuchung von Blutersatzmitteln nicht nur in Bezug auf die Markierung der Blutersatzflüssigkeit selbst bewährt haben, sondern daß zur Prüfung der Wirksamkeit mit Erfolg die radiochemischen Blutvolumenbestimmungsmethoden als Test herangezogen werden können. Diese Methoden verwenden heute vorwiegend mit <sup>32</sup>P markierte Erythrozyten (Erythrozyten-Volumenbestimmung) oder <sup>131</sup>I markiertes Serumalbumin (Plasma-Volumenbestimmung). Die markierten Zellen bzw. Proteine von genau bekannter spezifischer Aktivität werden in definierter Menge intravenös injiziert. Auf nähere Einzelheiten soll in anderem Zusammenhang eingegangen werden<sup>18</sup>).

### Penicillin, Sulfonamide

Aus der Reihe der bakteriostatischen und bakteriziden Stoffe sind viele Indikatoruntersuchungen bekanntgeworden. Sie befassen sich größtenteils mit der Frage eines biochemischen Einbaues des jeweiligen Hemmstoffes in den Mikroorganismus oder mit der Feststellung der zur Wachstumshemmung notwendigen Anzahl von

<sup>13a</sup>) Lee, Trevoy, Sprinks u. Jaques, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 74, 151 [1950].  
<sup>14</sup>) H. G. Mandel u. P. K. Smith, J. Amer. Pharmac. Assoc. Sci. Edit. 39, 479 [1950].  
<sup>15</sup>) W. Block u. K. Block, diese Ztschr. 64, 166 [1952].  
<sup>16</sup>) Unveröff. Privat-Mitteilung.  
<sup>17</sup>) A. M. Brues [1951]; Nuclear Sci. Abstr. Vol. 5 Ref. Nr. 4668.  
<sup>18</sup>) H. Götte u. M. Frimmer, diese Ztschr., in Vorbereitung.

Hemmstoffmolekülen pro Bakterium. Eine Reihe derartiger Untersuchungen befaßt sich mit dem Penicillin<sup>19–21</sup>). Das Penicillin wurde größtenteils mit <sup>35</sup>S markiert. Das Stoffwechselverhalten der Bakterien, wie z. B. die Aufnahme von <sup>32</sup>P aus einer Nährlösung, läßt sich als Test auf die Wirkung von Antibioticis und Chemotherapeuticis<sup>22,23</sup>) verwenden. <sup>35</sup>S markiertes Penicillin erscheint innerhalb von 8 h quantitativ im Harn. 30% davon unverändert. Bei oraler Verabreichung wurde in 8 h nur etwa die Hälfte des <sup>35</sup>S im Harn wiedergefunden<sup>24</sup>). Von besonderer Wichtigkeit erscheint eine Isotopenverdünnungsmethode zur exakten Bestimmung des Penicillin-Gehaltes unreiner Rohprodukte (Markierung mit <sup>35</sup>S)<sup>25</sup>).

Auch Sulfonamide wurden markiert. Der <sup>35</sup>S eines markierten Sulfanilamids<sup>26</sup>) fand sich ziemlich gleichmäßig im ganzen Tierkörper verteilt. Es wurde kein Anhaltpunkt für eine organspezifische Bindung gefunden. Kaninchen bildeten aus <sup>35</sup>S markiertem Sulfapyridin kein anorganisches Sulfat. Im Harn wurden am ersten Tag 25 bis 60% der Aktivität ausgeschieden, am zweiten Tag 10 bis 30%. Nach dem dritten Tag befanden sich in den Tieren keine nennenswerten Aktivitäten mehr. Vergleichende Untersuchungen mit der üblichen Diazomethode ergaben durchschnittlich um 20% niedrigere Werte als die radiochemischen Bestimmungen. Man nimmt an, daß die Differenz durch teilweise Blockierung der Amino-Gruppen zustande kommt<sup>27</sup>).

### Schildrüsenstoffwechsel

Die Erforschung des Schildrüsenstoffwechsels ist durch die Verwendung des <sup>131</sup>Iod bereichert. Fast schlagartig konnten eine Reihe wesentlicher Fragen gelöst werden. Die Verfolgung des Jod-Stoffwechsels mit radiochemischen Methoden ist in vielen Kliniken schon zum routinemäßigen Test ausgebaut worden. Die  $\gamma$ -Strahlung des Isotops erlaubt sogar eine Messung der Aktivität in der Schilddrüse am Menschen, bzw. Versuchstier. Pharmakologisch kommt vor allem die Untersuchung des Jodstoffwechsels mit <sup>131</sup>Iod zur Beurteilung schildrüsenwirksamer Stoffe und zur Aufklärung von deren Wirkungsmechanismus in Frage. Durch  $\gamma$ -Strahlenmessung am Hals lebender Ratten wurde die biologische Halbwertzeit von <sup>131</sup>Iod in der Schilddrüse zu 3,3 Tagen ermittelt. Gibt man den Ratten 0,03% Propylthiourazil zu ihrer Nahrung, so sinkt die biologische Halbwertzeit auf 1,6 Tage. Die Entfernung der Hypophyse führt zu einer Verlängerung bis auf etwa 24 Tage. Behandelt man hypophysektomierte Tiere dagegen mit thyreotropem Hormon, so kehrt die biologische Halbwertzeit zu normalen Werten zurück. Behandlung mit Thyroxin hat einen ähnlichen Effekt. Eine hohe Dosierung von Jodid hat keinen Einfluß auf die Abgabe des in die Schilddrüse eingebauten Jods<sup>28</sup>). Andere Untersuchungen befassen sich mit der Muskelclearance für <sup>131</sup>I unter dem Einfluß von Thiourazil, Jod und Präparaten aus getrockneter Schilddrüse<sup>29</sup>). Der Einfluß von gonadotropem Hormon

<sup>19</sup>) D. Rowley u. Mitarb., Biochemic. J. 46, 157 [1950]; Nature [London] 161, 1009 [1948]; P. D. Cooper u. D. Rowley, ebenda 163, 480 [1949].

<sup>20</sup>) E. A. Maas u. M. J. Johnson, J. Bacteriol. 57, 415 [1949]; 58, 361 [1949].

<sup>21</sup>) S. H. Howel, J. H. Hatcher u. D. M. Jost, J. Appl. Physics 12, 325 [1941].

<sup>22</sup>) J. Hiller, H. Spielmann, E. Strauss u. A. Jakob, Naturwiss. 38, 353 [1951].

<sup>23</sup>) G. Thomsen u. S. Carlson, Zbl. Bakteriol. (in Vorbereitung).  
<sup>24</sup>) S. Rowlands, D. Rogley u. E. L. Smith, J. Chem. Soc. Sup. Issue 2p, 405 [1950].

<sup>25</sup>) E. Duvigneaud u. Mitarb., Science [New York] 104, 431 [1946].

<sup>26</sup>) E. G. Fingel, J. E. Christian u. L. D. Edwards, J. Amer. Pharmac., Sci. Edit. 39, 693 [1950].

<sup>27</sup>) H. G. Bray u. Mitarb., Biochemic. J. 46, 267 [1950].

<sup>28</sup>) J. Wolff, Endocrinology 48, 284 [1951].

<sup>29</sup>) J. B. Boatman u. M. Campbell, ebenda 48, 413 [1951].

sowie von Sexualhormonen auf den Schilddrüsenstoffwechsel wurde mit  $^{131}\text{J}$  getestet<sup>30</sup>). Einen methodischen Fortschritt bedeutet die Möglichkeit einer papierchromatographischen Trennung Jod-haltiger Stoffwechselprodukte<sup>31</sup>). Bei Ratten und Hühnchen konnte so gezeigt werden, daß 15–20% des Gesamtjods in der Schilddrüse als Monojodtyrosin vorliegen, während 25–30% in das Dijodtyrosin eingebaut sind<sup>32</sup>). Auch die Art der chemischen Bindung des im Blutplasma vorkommenden Jods konnte geklärt werden<sup>32</sup>). Nach Injektion von markiertem Jodid findet man im Blut das  $^{131}\text{J}$  in Thyroxin eingebaut, welches seinerseits locker an Plasmaeiweiß gebunden ist. 3–5– $^{131}\text{J}$ -Thyroxin wird im Organismus weitgehend abgebaut. Die Radio-Aktivität findet man im Harn vorwiegend als Jodid, während im Kot sowohl anorganisch wie organisch gebundenes  $^{131}\text{J}$  erscheint<sup>33</sup>). Eine Reihe von  $^{131}\text{J}$  substituierten Eiweißen wurden auf ihre Fähigkeit zur Thyroxin-Bildung im Tierversuch untersucht<sup>34</sup>). Vom Thioharnstoff, der mit  $^{35}\text{S}$  indiziert war, wurde in zwei Tagen der Schwefel zu 98% im Harn ausgeschieden. 6% waren anorganisches Sulfat, weitere 6% organisch gebundenes Sulfat, während der Rest aus unverändertem Thioharnstoff bestand. In der Schilddrüse konnte gegenüber anderen Organen eine 55fache Anreicherung festgestellt werden<sup>35</sup>). Ähnliche Studien wurden mit Thiourazil, 6-Propyl-thiourazil und 4-Methyl-2- $^{35}\text{S}$ -thiourazil an jungen Hähnen ausgeführt. Ausscheidungs- und Anreicherungsverhältnisse waren ähnlich<sup>36</sup>). Auch der Thiocyanat-schwefel scheint eine besondere Affinität zum Schilddrüsengewebe zu haben<sup>37</sup>).

### Alkaloide, Glykoside

Viele wichtige Pharmaka sind synthetisch schwer oder bisher überhaupt nicht zu markieren. In solchen Fällen konnte die Biosynthese nutzbar gemacht werden. In besonders konstruierten Treibhäusern wurden z. B. Alkaloid-, bzw. Glykosid- produzierende Pflanzen unter optimaler künstlicher UV-Bestrahlung einer  $^{14}\text{CO}_2$ -haltigen Atmosphäre ausgesetzt. Aus solchen Pflanzen konnte  $^{14}\text{C}$ -haltiges Digitoxin, Morphin, Atropin, Veratrin, Convallerotoxin und Nikotin isoliert werden<sup>38</sup>).  $^{14}\text{C}$ -Digitoxin wurde Ratten injiziert. Die gefundenen  $^{14}\text{C}$ -Konzentrationen in den einzelnen Organen waren geringer als erwartet, während die größte Menge der Aktivität im Harn wiedergefunden wurde.  $^{14}\text{C}$ -Nikotin wurde in Mengen von 5 bis 10 mg Ratten verabreicht. Nur 8–12% der Aktivität waren im Harn aufzufinden.  $^{14}\text{C}$ -Codein wird in der Leber entmethyliert, wobei die Mehrzahl der freiwerdenden Methyl-Gruppen zu  $^{14}\text{CO}_2$  oxydiert werden<sup>39</sup>).

Der biosynthetische Weg zur Markierung von Alkaloiden und Glykosiden erscheint auf den ersten Blick einfach und verlockend. Bedauerlicherweise sind aber die Ausbeuten an spezifischer Aktivität im Vergleich zu den analogen, aus der physiologischen Chemie her bekannten Biosynthesen durch Mikroorganismen, bezüglich der erreichbaren spezifischen Aktivität äußerst dürftig. Dazu kommt, daß das Wachstum solcher höher entwickel-

<sup>30</sup>) J. H. Müller u. H. Aeppli, *Experientia* 5, 297 [1949].  
<sup>31</sup>) R. M. Fink, C. E. Dent u. K. Fink, *Nature* [London] 160, 801 [1947]; K. Fink u. R. M. Fink, *Science* [New York] 108, 358 [1948].  
<sup>32</sup>) A. Taurog, W. Tong u. I. L. Chiakoff, *J. biol. Chemistry* 184, 83 [1950].  
<sup>33</sup>) J. C. Clayton u. Mitarb., *Biochemic. J.* 45 [1949].  
<sup>34</sup>) C. F. Hamilton u. Mitarb., *J. Clin. Endocrinol.* 3, 828 [1949].  
<sup>35</sup>) J. Schulman jr. u. R. P. Keating, *J. biol. Chemistry* 183, 215 [1950].  
<sup>36</sup>) J. J. Bezem, *Acta Endocrinol.* 3, 151 [1949].  
<sup>37</sup>) J. L. Wood u. E. F. Williams jr., *J. biol. Chemistry* 177, 59 [1949].  
<sup>38</sup>) E. M. K. Geiling, F. E. Kelsey, A. Ganz, E. J. Wallazek, G. T. Okita, S. Fishman u. L. B. Smith, *Tians. Assoc. Physicians* 63, 191 [1950]. E. Geiling u. Mitarb., *Science* [New York] 108, 558 [1948]. F. E. Kelsey, ebenda 109, 566 [1949].  
<sup>39</sup>) T. K. Adler u. M. E. Lathom, *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 73, 401 [1950].

ten Pflanzen mehrere Monate in Anspruch nimmt. Durch die niedrige spezifische Aktivität der gewonnenen Präparate ist der eigentliche Vorteil der Tracermethode, nämlich die therapiegerechte Dosierung bei guter Nachweisbarkeit der Aktivität in isolierten Stoffwechselprodukten, nicht ausnutzbar. Reine Organverteilungsstudien lohnen wohl in den meisten Fällen nicht die Mühe und den materiellen Aufwand der langwierigen Biosynthese. Man wird bei den bis jetzt bestehenden biosynthetischen Möglichkeiten doch zur chemischen Total- oder Teilsynthese zurückkehren müssen.

### Sonstige Vitamine und Hormone

Vitamin- und Hormonstudien, die dem Grenzgebiet Biochemie-Pharmakologie zuzurechnen sind, seien hier der Vollständigkeit halber nur tabellarisch wiedergegeben:

Name der Verbindung	Isotop	Literatur
L-Ascorbinsäure	$^{14}\text{COOH}$	<sup>40</sup> )
Nikotinsäure	$^{14}\text{C}$	<sup>41</sup> )
Nikotinsäureamid	$^{14}\text{C}$	<sup>41</sup> )
Thiamin	$^{35}\text{S}$	<sup>42</sup> )
Vitamin B <sub>12</sub>	$^{60}\text{Co}$	<sup>43</sup> )
Vitamin B <sub>13</sub>	$^{14}\text{C}$	<sup>44</sup> )
Dibromöstron	$^{82}\text{Br}$	<sup>45</sup> )
Östronulfat	$^{35}\text{S}$	<sup>46</sup> )
Jodöstradiol	$^{131}\text{J}$	<sup>47</sup> )
Methylöstradiol	$^{14}\text{C}$ in 17-Stellung	<sup>48</sup> )
Progesteron	$^{14}\text{C}$ in 21-Stellung	<sup>49</sup> )
Testosteron	$^{14}\text{C}$	<sup>50</sup> )
Insulin	mit p- $^{131}\text{J}$ -Jod-Phenyl-Rest azogekuppelt	<sup>51</sup> )
Insulin	$^{131}\text{Jod}$ (jodiert)	<sup>52</sup> )
Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)	$^{131}\text{Jod}$ (jodiert)	<sup>52</sup> )

Wirkstoffe, die ihrer chemischen Struktur nach Eiweißverbindungen oder Polypeptide sind (s. Insulin und ACTH), ertragen meist ohne Einbuße der biologischen Wirksamkeit eine schonende Jodierung ( $^{131}\text{J}$ ). Es hat sich herausgestellt, daß solehe mit gewichtsmäßig sehr geringen Mengen Jod markierte Eiweißkörper ihr Jod erst nach völligem intermediärem Abbau des Proteins freigeben. Die Jodierungsmethode verdient deswegen besondere Beachtung, weil sie mit wesentlich weniger Mühe verbunden ist als eine Biosynthese mit  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$  oder  $^{15}\text{N}$ . Außerdem ist im Gegensatz zu letzterem Verfahren eine beinahe beliebig hohe spezifische Aktivität zu erreichen. Selbstverständlich ist jeweils in Vorversuchen zu klären, ob unter den benutzten Bedingungen die biologische Aktivität der betreffenden Verbindung erhalten bleibt. Weiterhin muß aus den jodierten Verbindungen alles nicht ehemisch gebundene, etwa adsorbierte Jod sorgfältig entfernt werden.

Einen bisher allein dastehenden Fall für die Markierung von Wirkstoffen stellt die Herstellung von radioaktivem Vitamin B<sub>12</sub> dar. Es ist nämlich möglich, das reine Vitamin im Pile selbst zu bestrahlen, wobei die Kobalt-Komponente in das aktive Isotop übergeht, ohne daß durch die Einwirkung der Neutronen und der starken Strahlung die biologische Aktivität verlorengelingt.

Gegen die Verwertbarkeit von radioaktivem Brom für die Markierung von radioaktiven östrogenen Hormonen

<sup>40</sup>) J. H. Burns u. C. G. King, *Science* [New York] 111, 257 [1950].  
<sup>41</sup>) Leifer u. Mitarb., *J. biol. Chemistry* 176, 249 [1948]. J. M. Hundley u. H. W. Bond, ebenda 173, 513 [1948].  
<sup>42</sup>) Borsig u. Mitarb., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2, 412 [1940].  
<sup>43</sup>) L. Chaet, C. Rosenblum u. D. T. Woodburg, *Science* [New York] 111, 601 [1950]. D. Kendall, W. Barbee u. B. Connor, *Nucl. Sci. Abstr.* 5, Ref. Nr. 5022 [1951].  
<sup>44</sup>) G. E. Boxer u. Mitarb., *Arch. Biochem.* 30, 470 [1951]; *Science* [New York] 111, 601 [1950].  
<sup>45</sup>) G. H. Twombly, Mc L. Clintock u. M. Engelmann, *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 56, 260 [1948].  
<sup>46</sup>) D. J. Hanahan, N. B. Everett u. C. D. Davis, *Acta Biochem.* 23, 501 [1949]; *J. biol. Chemistry* 185, 919 [1950].  
<sup>47</sup>) S. Albert u. Mitarb., *J. biol. Chemistry* 177, 247 [1949].  
<sup>48</sup>) H. J. Nicholas u. Mitarb., *Fed. Proc.* 9, 209 [1950].  
<sup>49</sup>) H. J. Brody, W. H. Elliot u. E. A. Doisy jr., *Abstr. Amer. Chem. Soc. Meeting* (Chicago) [1950] p. 28 C.  
<sup>50</sup>) R. B. Turner, *Science* [New York] 106, 248 [1947].  
<sup>51</sup>) R. H. Root u. Mitarb., *J. Amer. Med. Assoc.* 124, 84 [1944]. L. Reiner u. Mitarb., *J. Pharmacol. exp. Therap.* 78, 353 [1943]. E. H. Lang, L. Reiner, *Science* [New York] 93, 401 [1941]. L. Reiner, A. S. Keston u. M. Green, ebenda 96, 362 [1942].  
<sup>52</sup>) J. W. Ferrebee, B. B. Johnson, J. C. Mithoefer u. J. W. Gardella, *Endocrinology* 48, 277 [1951].

sind neuerdings Einwände erhoben worden<sup>53</sup>). Nach diesen Befunden soll das Brom vorzeitig aus den Hormonen abgespalten werden.

### Mineralhaushalt, Metalle, Halogene

Besonders die Verfolgung des Mineralhaushalts als Test wird durch die Verwendung von Isotopen häufig erleichtert<sup>54, 55</sup>). In derartigen Fällen besteht allerdings häufig keine absolute Indikation für die Anwendung von Isotopen weil die normalen Analysenmethoden meist ausreichen. Routinemäßige Serienuntersuchungen an großem Tiermaterial können aber durch Anwendung von Tracermethoden oft in wesentlich kürzerer Zeit bewältigt werden.

Viele Untersuchungen wurden mit radioaktiven, therapeutisch wichtigen Elementen durchgeführt, ohne daß ein Einbau der markierten Atome in kompliziertere Verbindungen nötig war. So wurde z. B. das Stoffwechselverhalten und die Verteilung von <sup>82</sup>Br<sup>56</sup>), von <sup>55</sup>Fe bzw. <sup>59</sup>Fe<sup>67</sup>) in Form von kolloidalem Eisen, von kolloidalem Gold<sup>58</sup>) und <sup>60</sup>Co<sup>69, 70</sup>) studiert.

Diuretisch wirksame, organische Quecksilber-Verbindungen konnten mit <sup>203</sup>Hg bis <sup>206</sup>Hg markiert werden<sup>61</sup>.

### Toxikologie

Selbstverständlich lassen sich auch für toxikologische Experimente markierte Substanzen heranziehen. Versuche mit indizierten carcinogenen Substanzen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Verbindung	Isotop	Stellung	Literatur
Dibenzanthren	<sup>14</sup> C	9 und 10	<sup>62</sup> )
Methylcholanthren	<sup>14</sup> C	11	<sup>63</sup> )
Dimethylaminoazobenzol	<sup>14</sup> C		<sup>64</sup> )
3-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol	<sup>14</sup> C	Methyl	<sup>65</sup> )
Azoguanin	<sup>14</sup> C		<sup>66</sup> )

Der Kampfstoff Lewisit konnte mit <sup>74</sup>As markiert werden<sup>67</sup>). Andere Autoren indizierten Lost mit <sup>35</sup>S<sup>68</sup>). Bei Untersuchungen in vitro wurde festgestellt, daß Lost mit Eiweiß Verbindungen eingeht (bis 22 Mol. pro Mol. Eiweiß). Bei intravenöser Verabreichung wird die Substanz rasch aus dem Blut eliminiert. Nach 4 bis 7 h werden 17 bis 22% ausgeschieden. <sup>35</sup>S markierter Schwefelkohlenstoff wurde Meerschweinchen durch intraperitoneale, subcutane, intramuskuläre und intracardiale Injektion sowie durch Inhalation verabreicht. 20% des C<sup>35</sup>S<sub>2</sub> wurde retiniert und über die Organe unter besonderer Bevorzugung der Leber verteilt. Der Rest wurde ausgeschieden. Nach einiger Zeit konnte auch der retinierte Schwefel im Harn, und zwar als Sulfat nachgewiesen werden<sup>69</sup>). Bei der Behandlung der Haut von Affen mit <sup>14</sup>C markiertem Tetrachlorkohlen-

<sup>53</sup>) G. A. Merlin, M. de Clercq, S. Apelgot u. P. Daudel, Bull. Soc. Clin. Biol. 33, 561 [1951].  
<sup>54</sup>) T. Simpson, Endocrinology 47, 308 [1950].  
<sup>55</sup>) C. Thomson, Nucl. Sci. Abstr. 5, Ref. Nr. 1786 [1951].  
<sup>56</sup>) I. N. Verkhousskaya, Invest. Acad. Nauk. SSSR Ser. Biol. 1950, 114.  
<sup>57</sup>) I. Indovina, Amer. J. Physiol. 165, 348 [1951].  
<sup>58</sup>) Sheppard u. Mitarb., ebenda 164, 345 [1951].  
<sup>59</sup>) U. Copp, Nucl. Sci. Abstr. 4, Ref. Nr. 6535 [1950].  
<sup>60</sup>) Berlin, Siri, Amer. J. Physiol. 164, 221 [1951].  
<sup>61</sup>) Burch, Ray, Threepfoot, Kelly u. Svedberg, J. Clin. Invest. 29, 1131 [1950]; Amer. J. Med. Sci. 220, 160 [1950].  
<sup>62</sup>) C. Heidelberger u. H. B. Jones, Cancer 1, 252 [1948]. C. Heidelberger, M. R. Kirk u. M. S. Perkins, Cancer 1, 261 [1948]. W. G. Daiber u. D. Mabee, Cancer Res. 9, 612 [1949]. C. Heidelberger u. W. G. Weist, ebenda 10, 223 [1950].  
<sup>63</sup>) Nucleonics 8, 69 [1951].  
<sup>64</sup>) R. A. Boissonas, R. A. Turner u. V. Duvigneaud, J. biol. Chemistry 180, 1053 [1949].  
<sup>65</sup>) D. A. Salzberg, W. Nye u. A. C. Griffin, Arch. Biochem. 27, 243 [1950].  
<sup>66</sup>) Progr. Rep. Southern Res. Inst. 15, Aug. 1950.  
<sup>67</sup>) D. J. Axelrod u. J. G. Hamilton, Amer. J. Pathol. 23, 369 [1947].  
<sup>68</sup>) J. C. Bursell, G. E. Francis u. A. Wormall, Biochimic. J. 40, 743, 756 [1946].  
<sup>69</sup>) C. F. Strittmatter, T. Peters u. R. W. McKee, Arch. Int. Occup. Med. 1, 54 [1950].

stoff konnte keine <sup>14</sup>C-Aktivität im Blut gemessen werden. Bei Inhalation hingegen wurden 30% aufgenommen, 10 bis 20% konnten in der Atemluft und im Blut als <sup>14</sup>C identifiziert werden<sup>70</sup>). Mithilfe von <sup>76</sup>As wurde nachgewiesen, daß das zur Devitalisation von Zähnen verwendete Arsen auch nach dem Ausräumen der Zahnpulpa zu erheblichen Anteilen im Zahn verbleibt und möglicherweise die Entstehung von Zahngangulomen begünstigt<sup>71</sup>).

Ein neues, selbständiges Forschungsgebiet, das sowohl der Toxikologie als auch der Strahlenbiologie zuzurechnen ist, befaßt sich mit der Untersuchung der bei der Atomforschung anfallenden künstlichen Produkte bezüglich ihrer Wirkung auf den lebenden Organismus.

### Mikroradiographie

Zum Schluß dieses Überblicks sei noch die Mikroradiographie erwähnt, ein noch in der Entwicklung begriffenes, aber sehr elegantes Verfahren der Radiochemie. Bei der klassischen Autoradiographie wird durch Kontakt des strahlenden Objektes (z. B. des Gewebschnittes) mit einer Photoplatte auf dieser eine Schwärzung erzeugt, welche sich zur groben Lokalisation eines Radioisotops in dem betreffenden Objekt eignet. Inzwischen ist es gelungen, durch Verwendung besonderer, aus der Kernforschung bekannter Emulsionen, das Auflösungsvermögen des Verfahrens bis in den mikroskopischen Bereich hinein zu steigern. Dies bedeutet eine Nachweisbarkeit von markierten Heilmitteln bis in die Größenordnung der Zelle, ja sogar einzelner Zellbestandteile hinein<sup>72-75</sup>).

### Zusammenfassung

Der vorliegende Überblick erhebt keineswegs Anspruch auf Vollständigkeit. Es sollten Möglichkeiten aufgezeigt werden, die sich in der Pharmakologie durch Anwendung von Isotopen ergeben. Es wurden eine Reihe von Arbeiten aufgeführt, die auf den verschiedensten Teilgebieten der Pharmakologie bekanntgeworden sind. Das Schrifttum über pharmakologische Traceruntersuchungen ist in den letzten Jahren so erheblich angewachsen, daß eine Zusammenfassung schon jetzt nur im Rahmen einer Monographie möglich wäre. Nicht bei allen diesen Arbeiten kann behauptet werden, daß aus der gegebenen Problematik heraus eine unbedingte Indikation für die Anwendung von Isotopen bestand. Vielfach wurde große Mühe auf die Darstellung markierter Verbindungen verwendet, während man sich im Tierversuch häufig mit der Messung der Verteilung der Aktivität über Organe, Körperflüssigkeiten und Exkremeanteile begnügte. Derartige Verteilungsstudien ohne Aussage über die Art der chemischen Verbindung der gemessenen Aktivität sind vom biologischen und medizinischen Standpunkt aus meist wertlos. In den Anfängen der Entwicklung der radiochemischen Methoden waren Arbeiten über Aktivitätsverteilung im lebenden Organismus aus methodischen Gründen gerechtfertigt. Inzwischen hat sich aber das Arbeitsgebiet der Indikatortechnik so entscheidend weiterentwickelt, daß es möglich geworden ist, das Stoffwechselverhalten von Arzneimitteln ebenso sorgfältig zu erforschen, wie dies in der Biochemie mit Hilfe des <sup>14</sup>C auf dem Gebiete des intermediären Stoffwechsels schon zum Teil geschehen ist.

Eingeg. am 9. September 1952 [A 463]

<sup>70</sup>) W. H. Beamer u. Mitarb., Fed. Proc. 9, 257 [1950]. D. D. McCollister u. Mitarb., ebenda 9, 300 [1950].  
<sup>71</sup>) H. Götte, A. J. Hattener u. M. Frimmer, Z. Naturforsch. 6b, 274 [1951].  
<sup>72</sup>) H. J. Gomberg, Nucl. Sci. Abstr. 5, Ref. Nr. 5513 [1951].  
<sup>73</sup>) G. A. G. Mitchell, Brit. J. Radiology 24, 110 [1951].  
<sup>74</sup>) M. Blundell u. J. Rotblat, Nature [London] 167, 645 [1951].  
<sup>75</sup>) A. Howard u. S. R. Pele, Brit. J. Radiology 18, 634 [1950]. Exper. Zell Research 11, 178 [1951]. Nature [London] 167, 599 [1951].