

Technik des pharmakologischen Tierexperimentes bei Verwendung radioaktiver Isotope

Von Dr. M. FRIMMER, Mainz

Aus dem Max-Planck-Institut für Chemie, Mainz

Radioisotope sind in der pharmakologischen Forschung besonders dann wichtig, wenn eine zu geringe Konzentration den Nachweis des Pharmakons oder die Identifizierung seiner Abbauprodukte nicht zulassen. Außer den üblichen Besonderheiten der Isotopenchemie sind für pharmakologische Tierexperimente zahlreiche biologische Bedingungen wichtig, weshalb hier eine zusammenfassende Übersicht über die Möglichkeiten und Ausführungen pharmakologischer Tierexperimente gegeben wird.

Nachdem mit Indikatormethoden in der Biochemie überzeugende Fortschritte erzielt werden konnten, finden die radioaktiven Isotope mehr und mehr Eingang in die pharmakologische Forschung. In einer vorangegangenen Mitteilung¹⁾ wurde ein Überblick über entsprechende Arbeiten auf dem Gebiete der Pharmakologie gegeben.

Das Arbeiten mit radioaktiven Isotopen erfordert eine Umstellung auf die Besonderheiten der Isotopenchemie²⁾. Präparative und analytische Arbeit z. B. muß wegen der Gefahr der radioaktiven Verseuchung³⁾ streng getrennt werden. Stark aktive Präparate machen Strahlenschutzmaßnahmen notwendig. Abfälle radioaktiver Produkte dürfen nicht in die Kanalisation geleitet werden. Die Synthesen von radioaktiven Verbindungen weichen nicht selten von den gewohnten ab, da man aus Ausbeutegründen meistens versucht, das aktive Element erst möglichst spät einzubauen. Auch die analytische Arbeit erfordert besondere Methoden. Verunreinigungen chemischer Art, die u. U. zu Fehlergebnissen führen würden, sind meist bei der radiochemischen Analyse ohne Belang. Dagegen droht dauernd die Gefahr der radioaktiven Infektion, d. h. die Einschleppung von stark radioaktivem Material durch Verschmierung sog. gewichtsloser Aktivitäten, wie sie vom Pile bezogen werden. Glaswaren, die dem Auge als tadellos sauber erscheinen, können durch Aktivitäten verunreinigt sein, die zu völlig falschen Ergebnissen führen. Diese Ausführungen zeigen, daß auch im pharmakologischen Tierexperiment bei Verwendung von Isotopen besondere Gesichtspunkte beachtet werden müssen. Die übliche Technik des Tierversuchs muß dabei als bekannt vorausgesetzt werden. Wir verweisen auf die einschlägige Fachliteratur^{4, 5)}.

Auswahl und Haltung der Tiere

Beim Indikatortierversuch sind bei der Auswahl der Tierart selbstverständlich zunächst physiologische Gesichtspunkte, wie Ernährungsweise, Immunitätsverhältnisse und Kreislaufempfindlichkeit zu beachten. Darüber hinaus ist es aber ratsam, auch die radiochemischen Gegebenheiten in Rechnung zu stellen. Hat man z. B. die Absicht, die markierte Substanz bzw. deren Stoffwechselprodukte in Organen nachzuweisen und zu messen, so wird man, um nicht zu große Organe aufarbeiten zu müssen, Ratten oder Mäuse verwenden. Will man hingegen die Substanz auch chemisch identifizieren (Isotopenverdünnungsanalyse), so erfordert dies von selbst häufig ein größeres Versuchstier. Beabsichtigt man über längere Zeitabschnitte die Ausscheidung einer markierten Ver-

bindung zu verfolgen, so wird man meistens das Kaninchen als Versuchstier wählen, da die Harnmengen von Ratten und Mäusen für eine exakte Analyse häufig zu klein sind. Hunde eignen sich schlecht zum Aufenthalt in Stoffwechselkäfigen. Größere Versuchstiere wie Schafe, Ziegen und Rinder, über die in amerikanischen Arbeiten häufiger berichtet wird, machen kostspielige, besonders konstruierte Stallungen notwendig.

Soll der Blut- oder Harnspiegel einer Substanz über kürzere Zeitabschnitte kontinuierlich verfolgt werden (z. B. bei Clearance-Versuchen), so arbeitet man zweckmäßig mit Hunden. Bei der Wahl der Versuchstiere ist weiterhin die Möglichkeit einer exakten Applikationsart zu berücksichtigen. Ein weiterer Gesichtspunkt ist der Wert der benutzten markierten Substanz. Dies gilt vor allem, wenn man sich bei der Darstellung einer Biosynthese bedienen muß. Trotzdem sollte man im Interesse der Meßgenauigkeit in der Regel mit nicht zu kleinen Versuchstieren arbeiten. Eine Erhöhung des Tiergewichts um den Faktor 10 (etwa von einer 200 g schweren Ratte auf ein 2 kg schweres Kaninchen) erleichtert die notwendigen Manipulationen meist erheblich, während die Erhöhung der Aktivität um den Faktor 10 bezüglich Arbeitsaufwand und Kosten in vielen Fällen nicht so sehr ins Gewicht fällt. Die Gefahr des Mißlingens rein manueller Operationen ist bei kleinen Versuchstieren viel größer und führt zu einer öfteren Wiederholung des betreffenden Versuches.

Bei der Haltung der Versuchstiere ist grundsätzlich jede Möglichkeit einer radioaktiven Verseuchung ihrer Umgebung zu vermeiden. Radioaktive Tiere sind unter allen Umständen von nicht im Versuch befindlichen fernzuhalten. Radioaktive Mäuse, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen hält man am besten in Stoffwechselkäfigen. Harn und Kot radioaktiver Tiere ist nach den Gesichtspunkten der Abfallbeseitigung in radiochemischen Laboratorien zu behandeln, insbes. wenn es sich um langlebige Isotope handelt. Dasselbe gilt für die Beseitigung von Tierkadavern. Je nach Isotop sind die Tiere zu verbrennen (z. B. ¹⁴C) oder an gekennzeichneten Stellen zu vergraben (z. B. Kobalt, Radium).

Hunde werden am besten in Freilandboxen gehalten. Dabei ist für häufige Reinigung der Ställe und Gehege zu sorgen, um jegliche Verschmierung der Tiere mit radioaktiven Exkrementen zu vermeiden. Radioaktive Hunde sollen stets voneinander getrennt gehalten werden. Man beobachtet immer wieder Tiere, welche Exkremente fressen. Dies bedeutet eine Verseuchungsmöglichkeit, die unter Umständen zu Fehlergebnissen führen kann. Ratsam ist ferner eine auffällige Markierung radioaktiver Versuchstiere (farbige Marken). Unerläßlich ist eine sorgfältige Buchführung über jedes einzelne Versuchstier. Die Tiere sollen erst nach völliger Ausscheidung oder entsprechendem Abfall der Aktivität für neue Versuche verwendet

¹⁾ M. Frimmer, diese Ztschr. 64, 638 [1952].

²⁾ H. Götte, Naturwiss. Rundschau, 1951, 463. Strahlentherap. 85, 3 [1951].

³⁾ H. Götte, Strahlentherap. 85, 17 [1951].

⁴⁾ E. Abderhalden: Handb. d. biol. Arbeitsmethoden; Vlg. Urban u. Schwarzenberg.

⁵⁾ L. Ther: Pharmakolog. Methoden, Wiss. Verl. G.m.b.H. Stuttgart 1949.

werden. Auch sollte man die Versuchstiere aus strahlenbiologischen Gründen nicht zu oft für Isotopenversuche heranziehen. Einmal besteht die Gefahr, daß die Tiere noch unvermutete Aktivitäten enthalten, zum anderen muß man erwarten, daß stärker strahlengeschädigte Tiere in ihrem Stoffwechselverhalten gewisse Anomalien zeigen können. Selbstverständlich ist es, daß aktive Versuchstiere, besonders Schlachttiere nicht weiterveräußert werden dürfen. Das Tierpflegepersonal ist über die Gefahr der Strahlenschäden eingehend zu belehren. Der Tierpfleger muß seine Hände und Kleider nach jedem Umgang mit stark aktiven Tieren an einem Geiger-Müller-Zählrohr messen lassen.

Besondere Vorsichtsmaßnahmen erfordern alle Versuchstiere, denen solche ^{14}C markierte Verbindungen verabfolgt wurden, die im Verlaufe des intermediären Abbaus als $^{14}\text{CO}_2$ in der Atemluft ausgeschieden werden. Dies gilt auch bei Verwendung von Substanzen, die nach Ausscheidung in Harn oder Kot durch bakterielle Zersetzung zu freiem $^{14}\text{CO}_2$ führen können. Derartige Versuchstiere dürfen auf keinen Fall in Gebäuden gehalten werden, in denen radiochemische Messungen durchgeführt werden. Es muß bei der Einrichtung der Ställe berücksichtigt werden, daß $^{14}\text{CO}_2$ mit dem Calciumcarbonat von Mauerwerk und Wandanstrich einem Austausch unterliegt, so daß ein derartiger Raum nach einiger Zeit beträchtlich radioaktiv verseucht sein kann. Man wird sich in der Regel dadurch helfen können, daß man solche Tierställe mit einem Ölfarbenanstrich versieht, für dichtschießende Türen sorgt und den Raum ausreichend ventiliert. Manche Autoren empfehlen zusätzlich eine dauernde Durchspülung mit inaktivem CO_2 , um das anfallende $^{14}\text{CO}_2$ zu verdünnen. Durch dieses Vorgehen kann eine Verseuchung der Räume, zumindest vom Standpunkt des Strahlenschutzes aus, vermieden werden. Im Falle, daß jedoch größere $^{14}\text{CO}_2$ -Mengen erwartet werden, oder daß in der Umgebung der Tierställe radiochemische Präzisionsmessungen, insbesondere ^{14}C -Altersbestimmungen durchgeführt werden, ist es ratsam, an die Ventilationseinrichtung eine Absorptionsanlage anzuschließen. Ähnliche Vorsichtsmaßnahmen sind bei der Verbrennung ^{14}C -haltiger Tierkadaver zu ergreifen.

Technik der Darreichung von Isotopen

Die orale Verabfolgung von markiertem Material soll möglichst per Magensonde geschehen. Eine Zumischung zum Futter ist nur in den seltensten Fällen zulässig, auf keinen Fall aber bei Bilanzversuchen. Die Tiere verstreuen fast immer Futter, was zur Vermischung mit den Exkrementen führt. Bezüglich der Technik der Magensondenfütterung sei auf die Fachliteratur verwiesen⁶⁾. Vor dem Herausziehen der Sonde aus dem Schlund ist sie noch mit einer geeigneten inaktiven Flüssigkeit durchzuspritzen, um den größten Teil der Aktivität aus der Sonde zu entfernen. Jedes Tier ist hinterher einige Zeit zu beobachten (Erbrechen!).

Subcutane, intramuskuläre und intracardiale Injektion von radioaktivem Material bietet keine Besonderheit gegenüber der sonst üblichen Technik. Man muß jedoch vermeiden, daß aktives Material bei der Entfernung der Luft aus der Injektionsspritze an die Außenseite der Spritze gelangt oder als Tropfen der Kanüle anhaftet (radioaktive Verseuchung des Felles sowie der Hände des Experimentierenden). Spritzen, welche zur Injektion von hochaktivem Material dienen, soll man auch nach sorgfältiger Reinigung nicht zur Blutentnahme für analytische Zwecke verwenden. Am besten bewahrt man Injektionsspritzen und Kanülen für beide Zwecke räumlich getrennt auf. Eine

Besonderheit bietet die intraperitoneale Injektion von aktivem Material. Beim Durchstechen der Bauchdecke soll auch hierbei wegen der Gefahr einer Darmverletzung gleichzeitig injiziert werden (Flüssigkeitswall vor der Nadelspitze). Dies geschieht aber mit einer Spritze, die eine geeignete inaktive Flüssigkeit, z. B. physiologische Kochsalzlösung, enthält. Die Injektion der Isotope folgt mit einer zweiten Injektionsspritze, wenn sich die Nadelspitze bereits in der Bauchhöhle befindet. So wird eine Verseuchung des Stichkanals weitgehend vermieden. Die Injektion in die Schwanzvene von Ratten und Mäusen sollte sich nur der wirklich Geübte zutrauen. Man ist häufig erstaunt, wieviel Aktivität trotz einwandfreier Injektionstechnik bei Messung des Schwanzes einige Minuten nach der Injektion noch nachzuweisen ist. Ähnliches gilt auch bei der scheinbar gelungenen intracardialen Injektion. Auch dabei sind im Herzbeutel oft nicht unbeträchtliche Aktivitäten aufzufinden. Man sollte nach Möglichkeit in gut sichtbare (Kaninchenohr) oder freigelegte Venen (V. jugularis bzw. femoralis des Meerschweinchens) injizieren. Beim Hund wird die V. saphena parva herangezogen. Wer aus Gründen exakter Dosierung eine paravenöse Injektion sicher vermeiden will, sollte die später zur öfteren Blutentnahme angegebene Technik in Narkose benutzen. Zu beachten ist bei der Injektion sog. gewichtsloser Aktivitäten (d. h. Isotope mit hoher spezifischer Aktivität ohne inaktiven Träger), daß sehr erhebliche Aktivitäten in der Spritze adsorbiert werden können. Außerdem verbleiben im kapillaren Spalt zwischen Spritzenwand und Kolben oft beträchtliche Aktivitäten. Die injizierte Dosis muß dann um den nachträglich bestimmten Spritzenrückstand korrigiert werden. Käuflische Injektionsspritzen sind nicht geeicht. Die angegebene Graduierung weicht oft stark vom tatsächlichen Volumen ab. Dies macht sich bei Indikatoruntersuchungen stärker bemerkbar als bei Versuchen mit inaktivem Material. Zur Nacheichung von Injektionsspritzen bewährt sich Xylol aus physikalischen Gründen besser als Quecksilber.

Verfolgung der Ausscheidung markierter Substanzen in den Exkrementen

Will man quantitativ die im Kot ausgeschiedenen radioaktiven Isotope erfassen, so wird man in der Regel das Kaninchen als Versuchstier wählen. Der Boden des Stoffwechselkäfigs soll aus einem weitmäschigen Gitter bestehen, durch das der Kot durchfällt. Darunter ist ein engmaschiges Netz oder eine Siebplatte, die den Kot vom Harn trennt. Manche Unannehmlichkeiten beim Sammeln des Kotes lassen sich vermeiden, wenn man durch geeignete Fütterung für eine ausreichend trockene Konsistenz sorgt. Jeglicher so gesammelter Kot kann durch Aktivitäten aus dem Harn verunreinigt sein. Kommt es hierauf an, so benutzt man besser eine Vorrichtung wie sie in Bild 1 wiedergegeben ist⁶⁾. Stoffwechselkäfige, die zum Sammeln von Harn dienen, sollen keine blanken Metallteile enthalten, einmal um eine gründliche Reinigung zu ermöglichen, zum anderen um eine Adsorp-

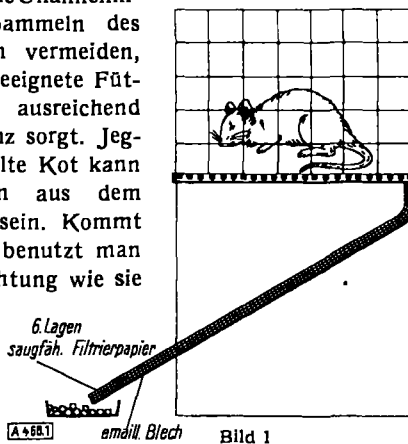


Bild 1

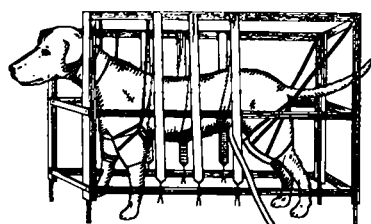
⁶⁾ H. D. Bruner, Nucl. Sci. Abstr. 5, Ref. Nr. 4943.

tion von Radioindikatoren zu vermeiden. Will man quantitativ sammeln, so ist nach jeder Sammelperiode der Käfig gründlich zu reinigen und das Waschwasser zu messen. Wegen der geringen Harnmenge von Mäusen und Ratten ist es verständlich, daß gerade bei diesen kleinen Versuchstieren der Fehler durch Adsorption von Aktivität am Sammeltrichter und auch durch Verschmieren auf dem Fell der Tiere ziemlich groß ist.

Dafür sei ein Zahlenbeispiel angeführt: Eine Ratte erhielt intraperitoneal $1,53 \cdot 10^6$ T/min ^{131}J als Jodsulfanilsäure. Im Auffanggefäß werden nach 1 Tag 334500 T/min, nach einem weiteren Tag 3600 T/min gemessen. Eine Reinigung des Käfigs ergab im Waschwasser 196500 T/min. Die Ratte wurde sodann in lauwarmem Leitungswasser gebadet. Das Badewasser enthielt weitere 4200 T/min. Dieses Beispiel zeigt deutlich, wie groß der Fehler bei kleinen Versuchstieren durch Verschmierung und Adsorption sein kann, insbesondere wenn es sich um Substanzen hoher spezifischer Aktivität handelt. Man sollte daher in der Regel für Versuche dieser Art Tiere von mindestens Kaninchengröße nehmen. Katzen eignen sich nicht für den Aufenthalt in Stoffwechselkäfigen.

Die gemessenen Teilchenzahlen werden unter Berücksichtigung der Halbwertszeit des verwendeten Isotops am besten auf die Injektionszeit oder auf den Zeitpunkt der Messung des injizierten Präparates umgerechnet. Aus den erhaltenen Werten und aus der spezifischen Aktivität des injizierten Präparates läßt sich die jeweilige gewichtsmäßige Menge der ausgeschiedenen markierten Verbindung berechnen, falls die chemische Verbindung bekannt ist, in welcher die markierten Atome ausgeschieden werden.

Beabsichtigt man über kürzere Zeitabschnitte die Isotopenkonzentration im Harn kontinuierlich zu verfolgen, so arbeitet man am besten mit Hunden, bei denen vorher operativ eine Blasenfistel angelegt wurde. Ausscheidungsversuche sind in wachem oder narkotisiertem Zustand der Tiere möglich, wobei zu beachten ist, daß die Diurese durch die Narkose beeinflusst sein kann. Gut erzogene Hunde lassen sich jedoch in Seitenlage ohne Narkose für einige Stunden auf einen Tisch legen, was für kürzere Versuche meist ausreicht. Es ist zweckmäßig, daß sich eine Hilfsperson während des Versuches ausschließlich mit dem Hund beschäftigt. Muß man derartige Ausscheidungsversuche über einige Tage ausdehnen, so ist die in Bild 2 wiedergegebene Einrichtung zu empfehlen.



Zum Auffanggefäß
Bild 2
A 468.2

Ein Hund mit bereits angelegter und verheilter Blasenfistel erhält nach sorgfältiger vorheriger Polsterung mit Watte Gipsverbände um die Oberschenkel, in deren oberste Schicht genügend starke Vorhangschnur eingegipst wird. In gleicher Weise legt man eine Gips Halskrause an. Der Hund wird dann in ein Eisengerüst eingesetzt. Er soll mit allen vier Beinen in normaler Haltung auf dem Boden stehen. Der Rumpf ruht auf breiten, verstellbaren Hanfgurten, auf die sich das Tier jederzeit zum Schlafen niederlassen kann. Die an den Gipsverbänden befestigten Schnüre werden an dem Metallgerüst so verspannt, daß der Hund in möglichst bequemer Haltung fixiert bleibt und weder zu wenig noch zu viel Bewegungsfreiheit hat. Derartige Versuchstiere dürfen niemals sich selbst überlassen werden, da sie in unbewachten Momenten durch wilde Ausbruchversuche leicht zu Schaden kommen können. Außerdem ist durch Verstellen der Gurte und Schnüre stets für eine qualifreie Haltung des Hundes zu sorgen. Weiterhin achte man auf Stauungen in den eingegipsten Extremitäten.

Der Harn kann, falls man nicht bestimmte Fraktionen oder Reinsubstanzen isolieren will, bei vielen Isotopen direkt im Flüssigkeitszählrohr gemessen werden. Dies ist allerdings bei weichen Strahlern wie ^{35}S oder ^{14}C vorläufig noch nicht möglich. Trübe Harne (etwa vom Kaninchen)

sind vor der Messung zu klären. Von Messungen getrübert Flüssigkeiten im Flüssigkeitszählrohr ist abzuraten, da während der Messung eine Sedimentation der suspendierten Teilchen stattfinden kann. In anderen Fällen kommt es zu einer Anreicherung durch Adsorption an der Glaswandung des Zählrohres, wobei die Verhältnisse der Selbstabsorption der zu messenden Flüssigkeit in unberechenbarer Weise verändert werden können und zu Meßfehlern Anlaß geben. Klare Harne können, soweit sie eiweißfrei sind, ohne Vorbehandlung gemessen werden. Eiweißgehalt geringer Konzentration führt manchmal, wenn die Aktivität an das Eiweiß adsorbiert wird, dazu, daß sich Eiweiß und Aktivität an der Glaswand während der Messung allmählich niederschlagen. Dies äußert sich in einer Zunahme der Teilchenzahl bei hintereinander folgenden Messungen⁷⁾. Man entfernt das störende Protein am besten nicht durch Koagulation, da bei der Fällung die zu messende Aktivität mitgerissen werden kann. Besser ist je nach Art der aktiven Substanz eine vorhergehende Hydrolyse mit Säure oder Lauge (Vorsicht: die dünnwandigen Flüssigkeitszählrohre sind empfindlich gegen starke Alkalien). Klarer Harn kann selbstverständlich auch in der im folgenden Abschnitt beschriebenen Apparatur gemessen werden.

Es sei hier noch darauf hingewiesen, daß die Verwendung von Flüssigkeitszählrohren auch bei der Anwendung von Fällungsreaktionen möglich ist. Dabei wird zuerst die Aktivität des unbehandelten klaren Harnes gemessen. Durch Messung des nach Fällung gewonnenen Filtrates kann die im Niederschlag befindliche Aktivität errechnet werden. Es versteht sich von selbst, daß Flüssigkeitszählrohre nach jeder Messung sorgfältig mit Chromschwefelsäure oder rauchender Salpetersäure sowie mit destilliertem Wasser zu reinigen sind. Da eine Trocknung im Trockenschrank nicht möglich ist, kann man für Präzisionsmessungen das anhaftende Wasser schnell durch Spülen mit Tetrahydrofuran und anschließendes Einblasen von Luft entfernen. Das Entfernen des Wassers durch kräftiges Ausschleudern verringert die Lebensdauer der Zählrohre erheblich.

Bestimmung von Isotopenkonzentrationen im Blut

Die Bestimmung des Blutspiegels einer Substanz ist eine Aufgabe, vor die der Pharmakologie häufig gestellt wird. Besonders für die kontinuierliche Verfolgung sind die Isotopenmethoden deswegen gut geeignet, weil unter Voraussetzung genügend hoher spezifischer Aktivitäten eine Bestimmung mit weniger Material möglich ist und somit durch häufige Blutentnahmen keine größeren Blutmengen dem Kreislauf entzogen werden. In der Regel wird man im Parallelversuch qualitativ ermitteln, in welcher chemischen Verbindung die verabfolgte Aktivität in einzelnen Zeitabschnitten des Versuches vorliegt. Dies kann mit Hilfe der gebräuchlichen Analysemethoden geschehen. Häufig erleichtert aber auch hier die sog. Isotopenverdünnungsanalyse die Arbeit¹⁾. Aussichtsreiche Möglichkeiten ergeben sich durch die Verwendung der Papierchromatographie. Man kann einem zu bestimmenden Substanzgemisch nacheinander alle erwarteten Verbindungen in inaktiver Form im Überschuß zugeben. Kennt man die Lage der betreffenden Substanz im Chromatogramm, so kann man durch Messung der ausgeschnittenen Farbflecke unter einem Fensterzählrohr feststellen, ob die zugegebene Substanz die Aktivität enthält oder nicht und somit mit der gesuchten radioaktiven Verbindung identisch ist.

Hat man erst qualitativ die zu bestimmende Substanz geklärt, so ist die quantitative, fortlaufende Bestimmung der Blutkonzentration markierter Verbindungen (abgesehen von weichen Strahlern) ohne besondere Schwierigkeiten im Flüssigkeitszählrohr möglich. Der Arbeitsauf-

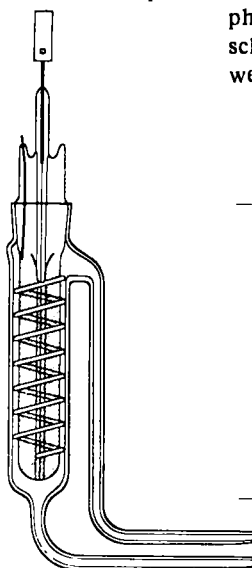
⁷⁾ H. Götte u. M. Frimmer, unveröffentlicht.

wand für eine derartige Analyse liegt meist weit unter dem einer entsprechenden quantitativen, etwa kolorimetrischen Bestimmung. Dies fällt bei Serienuntersuchungen besonders ins Gewicht.

Gilt es die Blutkonzentration einer markierten Verbindung ein einziges Mal zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Verabfolgung des aktiven Präparates zu bestimmen, so kommt man mit Ratten aus. Man läßt das Blut nach Tötung der Tiere auf vorgewogenes Filtrierpapier tropfen. Die Menge des Blutes wird durch Wägen in einem sofort nach der Blutentnahme zu verschließenden Wägeschälchen ermittelt. Die zugehörige Aktivität bestimmt man nach einer der chemischen Eigenart der zu untersuchenden Verbindung angepaßten Veraschung im Flüssigkeitszählrohr. Bei weichen Strahlern läßt es sich vorläufig nicht umgehen, das zu bestimmende Element in Form eines Niederschlags unter einem Fensterzählrohr zu messen. Methoden zur Messung in Gasform dürften nur in seltenen Fällen geeignet sein. Das Filtrierpapierverfahren zur Blutentnahme an der Ratte läßt sich unter der Voraussetzung verfügbarer hoher spezifischer Aktivitäten auch für mehrmalige Einzelentnahmen verwenden. Man macht dann mit einem Rasiermesser einen Einschnitt in das Schwanzende des Tieres und nimmt den austretenden Bluttropfen mit Filtrierpapier auf. Da bei kleinen Blutmengen die Wasserverdunstung während der Manipulation sehr stark ist, bezieht man die Aktivitäten zweckmäßig auf das Trockengewicht des Blutes. Das Verfahren sollte nur angewandt werden, wenn pro Blutentnahme mindestens 50 T/min über dem Nulleffekt des Zählrohres zu erwarten sind.

Bei Meerschweinchen läßt sich durch Herzpunktion für radiochemische Zwecke meist ausreichend Blut gewinnen. Technisch einfacher ist jedoch die Blutentnahme am Kaninchenohr mit Hilfe einer Saugglocke. Am Hund sind häufige Venenpunktionen ohne besondere Schwierigkeiten möglich. Wenn sehr viele Meßpunkte nötig sind und es die Eigenart des Versuches erlaubt, arbeitet man am vorteilhaftesten in Narkose und legt am besten in der Leistenbeuge beiderseits die großen Gefäße frei. Diese kann man dann beliebig oft punktieren.

Die spezifische Aktivität der verabfolgten markierten Verbindungen sollte nach Möglichkeit so eingerichtet werden, daß man pro Punction mit 0,5 bis 1,0 cm³ Blut auskommt. D. h. in jeder Probe sollten mindestens 50 Zerfälle pro Minute (über dem Nulleffekt) meßbar sein. Diese gewünschten Isotopenkonzentrationen im Blut sind je nach der chemischen Eigenart der verabfolgten Stoffe und je nach Art der Darreichung durch sehr unterschiedlich hohe applizierte spezifische Aktivitäten zu erreichen. Von einem Stoff wie z. B. dem „Periston“ (W. Z.), der sich bei intravenöser Injektion nur über das Blutvolumen verteilt und nur langsam wieder aus der Blutbahn verschwindet, wird man mit verhältnismäßig niederen spezifischen Aktivitäten auskommen. Hat man hingegen eine Substanz, die nur langsam aus dem Darm resorbiert wird, etwa ein Schwermetall, und die sich vom Blute aus auf größere Gewebsbezirke verteilt oder gar während der Resorption schon durch Harn und Kot wieder ausgeschieden wird,



A 468 3

so sind für eine sicher meßbare Konzentration im Blut sehr erhebliche Ausgangsaktivitäten erforderlich.

Aus Gründen einer möglichen radioaktiven Verseuchung sollte man niemals aus demjenigen Blutgefäß zur Analyse Blut entnehmen, in das man die Aktivität injiziert hat. Das entnommene Blut wird sofort nach der Punction in Natriumcitrat-Lösung übergeführt. Haben sich die Blutkörperchen zwischen Entnahme und Messung abgesetzt, so ist das Gemisch vor der Messung gründlich aufzuschütteln, da sonst die früher erwähnten Fehler durch Eigenabsorptionsänderungen auftreten können.

Für manche Zwecke, vorwiegend für Blutkreislaufarbeiten, bei denen es auf Erkennung rascher Konzentrationsänderungen ankommt, eignet sich das in Bild 3 angegebene Durchströmungszählrohr*). Die bis jetzt im Handel befindlichen Durchströmungszählrohre sind für die Durchströmung mit Blut ungeeignet. In dem angegebenen Modell ist durch eine eingebaute Glasspirale für eine gleichmäßige wendelförmige Umspülung des eigentlichen Zählrohres gesorgt. Das Zählrohr kann nach Abschirmung mit Blei und vorheriger Füllung mit Ringerlösung mittels Schlauchverbindungen und Glaskanülen am narkotisierten heparinisierten Hund direkt an eine große Arterie angeschlossen werden, wobei das ausfließende Blut in das periphere Arterienende zurückgeleitet wird (Bild 4). Beim Anschluß an eine Vene muß eine Pumpe dazwischengeschaltet werden. Die Hauptschwierigkeit des Verfahrens ist die Ver-

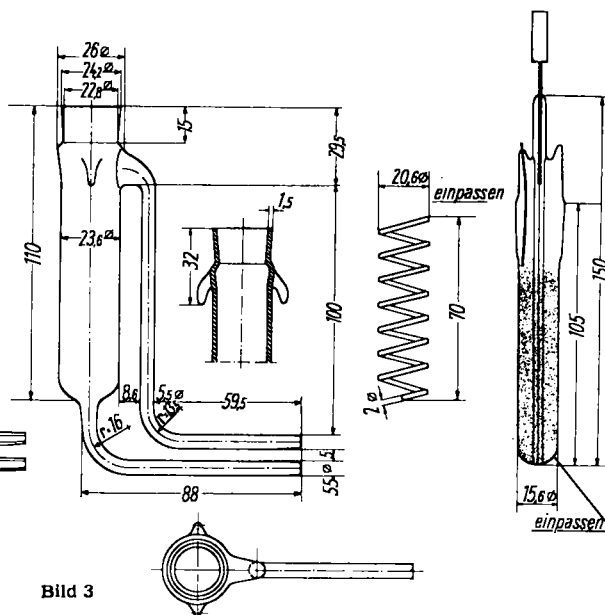


Bild 3

meidung jeglicher Gerinnung innerhalb des Zählrohres. Das Durchströmungszählrohr wird an einen Verstärker mit Integriereinrichtung angeschlossen. Dadurch ist eine fortlaufende Registrierung auf einem optischen Kymographion möglich. Das Verfahren eignet sich selbstverständlich auch zur fortlaufenden Registrierung von Konzentrationen markierter Pharmaka in isolierten Organsystemen, mit denen der Pharmakologe häufig arbeitet.

So lassen sich z. B. in ein Herz-Lungen-Nieren-Präparat zwei Durchströmungszählrohre einbauen, wodurch es möglich wird, die Konzentration eines zu untersuchenden Stoffes in Blut und Harn gleichzeitig fortlaufend zu registrieren (Clearance-Versuche).

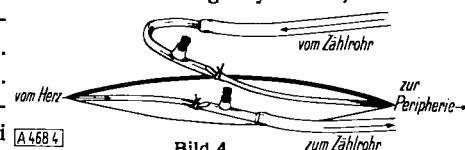


Bild 4

*) Das beschriebene Durchströmungszählrohr wurde gemeinsam mit Herrn Glasbläsermeister P. Kasper entwickelt.

In manchen Fällen werden Stoffe spezifisch in bestimmten Organen innerhalb kurzer Zeit angereichert. Man kann dann das betreffende Organ vor dem eigentlichen Versuch operativ freilegen und das Einwandern der Aktivität mit Hilfe eines angelegten Glockenzählrohrs fortlaufend verfolgen. Bild 5 zeigt eine Kurve, die derart an der Milz eines Hundes aufgenommen wurde, der radioaktiv markiertes Polyphosphat intravenös erhalten hatte⁶⁾. In nicht allzuferner Zukunft ist auch in Deutschland mit der Einführung nadelförmiger Scintilationszähler zu rechnen, die in die Blutbahn oder in Organe eingestochen werden können.

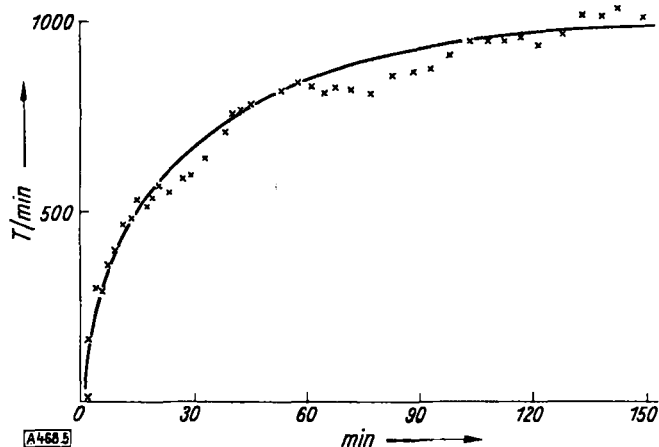


Bild 5
Zunahme der ^{32}P -Aktivität in der Milz nach Injektion von Polyphosphat

Verarbeitung von Organen

Der Nachweis der Speicherung eines Pharmakons macht die Aufarbeitung von Organen häufig notwendig. Nur selten reicht es aus, nur die Strahlung der markierten Verbindung quantitativ zu bestimmen, wobei natürlich nichts über die Art der chemischen Verbindungen ausgesagt werden kann, in der die radioaktiven Atome vorliegen. Handelt es sich um genügend energiereiche Strahler, so kann man für orientierende Versuche etwa gleich dicke Organ-schnitte anfertigen und diese unter Berücksichtigung der Zählrohrgeometrie unter einem Glockenzählrohr messen. Genauere Werte können jedoch nach vorangegangener Veraschung im Flüssigkeitszählrohr erhalten werden. Bei der Auswahl der Veraschungsmethode ist die Chemie des zu bestimmenden Elementes zu berücksichtigen. Es muß vermieden werden, daß sich während der Veraschung Teile der Aktivität verflüchtigen. Die in der physiologischen Chemie üblichen Veraschungsmethoden sind für radiochemische Untersuchungen nicht immer die günstigsten. Verascht man z. B. in konzentrierter Schwefelsäure, so muß bei der Messung im Flüssigkeitszählrohr die durch die Dichte der Schwefelsäure bedingte Erhöhung der Selbstabsorption (im Vergleich zu Wasser) berücksichtigt werden. Unerwünscht sind ferner Niederschläge in der Veraschungsflüssigkeit, da an diese wesentliche Aktivitäten adsorbiert werden können. Unzulässig ist die Messung von getrübbten oder inhomogenen Veraschungsflüssigkeiten. Es muß angestrebt werden, bei der Veraschung möglichst zu Endprodukten zu kommen, die eine gegenüber Wasser zu vernachlässigende Dichte haben (Veraschung in rauchender Salpetersäure oder in Salpetersäure-Perhydrol mit anschließendem Abrauchen der Säure und Auffüllen mit Wasser). Weniger wichtig in der radiochemischen Analyse ist häufig die Vollständigkeit der Veraschung, wie sie z. B. bei Eiweiß für Kjeldahl-Analysen

gefordert wird. Wesentlich ist nur die homogene Verteilung des Meßgutes sowie die Dichte der zu bestimmenden Flüssigkeit. Man tut jedoch gut daran, sich bei Berücksichtigung der Dichte des Meßmediums nicht auf schwierige Berechnungen einzulassen, sondern den Korrekturfaktor empirisch durch Eichung bekannter Aktivitäten in den jeweiligen Veraschungsendprodukten zu ermitteln. Dies gilt auch für Messung von Organextrakten in organischen Lösungsmitteln. In manchen Fällen wird man eine trockene Veraschung vorziehen (Messung von Ca in Knochen und Organen). In seltenen Fällen (^{131}J) ist eine Bombenveraschung angebracht. Es sei darauf hingewiesen, daß bei sehr niedrigen Teilchenzahlen in der Veraschungsflüssigkeit häufig sicher meßbare Werte erreicht werden können, wenn man das gesuchte Isotop durch geeignete Fällungsmethoden anreichert. Von einer Veraschung in konzentrierter Kalilauge sollte abgesehen werden, da sich die natürliche Radioaktivität des gewöhnlichen Kaliums bei den meisten Messungen schon störend bemerkbar macht.

In der Regel wird bei pharmakologischen Arbeiten die quantitative Bestimmung der Zerfälle/min pro Organge-wichtseinheit nicht ausreichen, sondern eine Identifizierung der chemischen Verbindung, in der die aktiven Atome vorliegen, notwendig sein. Auch hier bilden die Isotopenverdünnungsanalyse und die Papierchromatographie die wichtigsten Möglichkeiten des experimentellen Vorgehens. In besonderem Maße ist die chemische Identifizierung der Aktivität bei den Verbindungen des Kohlenstoffs notwendig. Der ^{14}C dürfte in Zukunft ähnlich wie in der Biochemie den wichtigsten Eckpfeiler der pharmakologischen Isotopenforschung bilden.

Arbeiten mit ^{14}C

Die Messung des ^{14}C ist wegen der besonders weichen Strahlung des Isotops mit Schwierigkeiten verbunden. Deshalb spielt auch die Selbstabsorption des Meßgutes eine viel größere Rolle als bei anderen Isotopen. Der Meßvorgang dürfte im pharmakologischen Experiment in der Regel folgender sein: Die isolierte oder stark angereicherte ^{14}C -haltige Verbindung wird trocken oder feucht verascht und das entstandene $^{14}\text{CO}_2$ in Natronlauge aufgefangen. Aus dieser Natronlauge wird das CO_2 bei Gegenwart von Ammoniumchlorid mit überschüssiger Bariumchlorid-Lösung gefällt. Die entstandene Bariumcarbonat-Fällung wird unter Vermeidung des Zutritts von atmosphärischer Kohlensäure in verschiedenen, aber gleichmäßigen Schichtdicken auf Aluminium-Schälchen eingetrocknet. Die jeweiligen Schichtdicken werden durch Wägung der getrockneten Schälchen ermittelt und die Aktivitäten mit Fensterzählrohren für sehr weiche Strahlen gemessen. Für jedes exakt zu bestimmende Kohlenstoffpräparat ist nicht wie bei anderen Isotopen eine einzige Zählrohrmessung ausreichend, sondern es ist ratsam, den erzeugten Bariumcarbonat-Niederschlag in verschiedener Schichtdicke zu messen. Gemessen wird jeweils die spezifische Aktivität des Bariumcarbonats, aus der sich bei bekanntem Gewicht der gesamten Fällung die Aktivität des veraschten Kohlenstoffs berechnen läßt. Die Grenze der ohne Schwierigkeiten exakt meßbaren spezifischen Aktivität liegt beim Bariumcarbonat bei etwa 10^{-7} ml pro mg bei Sättigungsschichtdicke in Schälchen von 25 mm Durchmesser. Schon aus diesem Grunde erscheint es angebracht, das Meßgut weitgehend anzureichern. Hat man nicht sehr hohe spezifische Ausgangsaktivitäten zur Verfügung, so ist es meist schon aus meßtechnischen Gründen unmöglich, ein unvorbereitetes Organ einfach zu verbrennen. Der inaktive Kohlenstoff des Organs verdünnt das ^{14}C der

⁶⁾ M. Frimmer, Arch. exper. Pathol. (im Druck).

gesuchten Verbindung bei diesem Vorgehen häufig so stark, daß die spezifische Aktivität des Bariumcarbonats jenseits exakter Meßbarkeit liegt. Selbst wenn man die gesuchte Verbindung in inaktiver Form dem Organ in erheblicher Menge zusetzt und diese Verbindung dann zusammen mit der aktiven isoliert, ist die resultierende Verdünnung des Kohlenstoffs weit geringer als diejenige bei der Veraschung des gesamten Organs.

Eine Besonderheit für biologische Versuche bildet die Möglichkeit der Messung des $^{14}\text{CO}_2$ in der Atemluft von Versuchstieren. Auch dabei ist bei der Versuchsplanung zu berücksichtigen, daß das ausgeatmete $^{14}\text{CO}_2$ durch das inaktive CO_2 der Atemluft so stark verdünnt werden kann, daß bei ungenügender spezifischer Aktivität des verabfolgten ^{14}C markierten Pharmakons die spezifische Aktivität der ausgeatmeten Gesamtkohlensäure jenseits der Meßbarkeit mit den üblichen Verstärkern liegen kann.

Die Versuchsanordnung richtet sich nach der Art der verwendeten Tiere. Kleine Versuchstiere wie Ratten und Mäuse bringt man in geschlossene Kammern, die mit CO_2 -freier Luft durchspült werden. Das austretende Gasgemisch wird durch ein Absorptionssystem mit NaOH geleitet, das in gewissen Zeitabständen gegen ein neues ausgewechselt wird. Größere Versuchstiere kann man in Nar-kose mit Hilfe einer Atempumpe künstlich beatmen, wobei die der Pumpe zugeleitete Einatemluft von CO_2 gereinigt werden muß, während die ausgeatmete Luft durch ein Absorptionssystem gesaugt wird.

Arbeiten mit radioaktivem Kohlenstoff sind durchschnittlich mit bedeutend größeren technischen Schwierigkeiten verbunden als solche mit anderen Isotopen. Die Schwierigkeiten beginnen bereits bei der Synthese der zu markierenden Verbindungen, die gegenüber den gebräuchlichen organischen Syntheseverfahren meist erhebliche Abweichungen notwendig macht, insbes. wenn die durch den möglichen Einbau von ^{14}C an verschiedenen Stellen einer organischen Molekel bedingte Isomerie ausgenutzt werden soll. Bezüglich näherer Einzelheiten der

Synthese und Meßverfahren für ^{14}C sei auf die einschlägige Literatur verwiesen^{9, 10)}.

Dosierung radioaktiver Isotopen im Tierversuch und Strahlenschäden

Die beim Zerfall radioaktiver Atomarten auftretende ionisierende Strahlung führt bei hinreichender Intensität im lebenden Gewebe zu schweren Zerstörungen. Man ist bei Tracer-Untersuchungen am Menschen sehr vorsichtig geworden und hat die früher üblichen Zahlen der Toleranzdosis erheblich reduziert. Die neue international festgesetzte Toleranzdosis beträgt 0,05 r/Tag. Unter der Voraussetzung gleichmäßiger Verteilung über den ganzen Körper darf eine verabfolgte Isotopendosis beim Menschen nur eben so groß sein, daß die Strahlendosis an keiner Stelle des Körpers höher als 0,05 r/Tag liegt. Nach Angaben von Höhne und Künkel (Hamburg-Eppendorf) ergibt die Toleranzkonzentration der wichtigsten Isotope ausgedrückt in Mikrocurie pro kg Körpergewicht folgende Werte: ^{14}C 12,35; ^{24}Na 0,65; ^{32}P 1,15; ^{35}S 15; ^{42}K 0,94; ^{45}Ca 10,5; ^{55}Fe 132; ^{59}Fe 1,35; ^{60}Co 0,74; ^{64}Cu 7,6; ^{76}As 0,76; ^{77}As 4,2; ^{111}Ag 3,3; ^{131}I 2,25; ^{203}Hg 4,45. Diese Zahlen sollen beim Menschen möglichst unterschritten werden. Bei radioaktiven Tierversuchen können die für den Menschen festgesetzten Toleranzdosen je nach Versuchsdauer erheblich überschritten werden, ohne daß man zu befürchten braucht, daß die Versuchsergebnisse durch akute Strahlenschäden beeinflusst werden. Mit akuten Strahlenschäden ist im kurzfristigen Isotopenexperiment bei den für Tracer-Untersuchungen gebräuchlichen Dosierungen wohl kaum zu rechnen. Dagegen können Spätschäden bei den manchmal nötigen Dosierungen durchaus erwartet werden. Man sollte deshalb Tiere, die größere Isotopenmengen erhalten haben, nicht für weitere Untersuchungen verwenden. Eingeg. am 23. Juli 1952 [A 468]

⁹⁾ M. Calvin, Ch. Heidelberger, J. Reid, M. Tolbert u. P. F. Yen-kwich: Isotopic Carbon, Verlag John Wiley and Sons Inc., New York [1949].

¹⁰⁾ H. Götze, diese Ztschr. 63, 89 [1951].

Analytisch-technische Untersuchungen

Fluor-Bestimmung mit Destillation als H_2SiF_6 unter Kreislaufführung des Wassers

Von Dipl.-Chem. G. PIETZKA und Priv.-Doz. Dr. P. EHRLICH

Aus dem Institut für Anorganische Chemie der T. H. Hannover und Hauptlaboratorium der Riedel-de Haën A.-G., Seelze

Für die Analyse des Fluors wurde eine Apparatur entwickelt, in der das zur Abdestillation des H_2SiF_6 erforderliche Wasser im Kreislauf geführt wird; damit ist mit einfachen Mitteln das Problem der unbeaufsichtigten Destillation gelöst. Die anschließende maßanalytische Bestimmung des Fluors nach Fällung als Bleibromofluorid ist unter Benutzung einer neu ausgearbeiteten Schnellmethode in 10–15 min möglich.

Für die analytische Bestimmung des Fluors ist eine große Anzahl von Verfahren beschrieben, bei denen die Schwierigkeiten noch nicht überwunden sind.

Im Kapitel I beschreiben wir eine Verbesserung des Destillationsverfahrens. Dessen Anwendungsbereich und maßanalytische Methoden zur Bestimmung des Fluors im Destillat werden im Kapitel II besprochen. Im Kapitel III wird schließlich gezeigt, wie die „Bleibromofluorid“-Methode¹⁾, die viel Zeit erfordert, mit nicht ganz so großer Genauigkeit schnell ausgeführt werden kann.

¹⁾ P. Ehrlich u. G. Pietzka, Z. analyt. Chem. 133, 84 [1951].

I. Kreislaufdestillation

In schwierigeren Fällen gilt heute als genauestes und am vielseitigsten anwendbares Verfahren zur Fluor-Bestimmung die Methode nach Willard und Winter²⁾. Danach wird das Fluor bei Gegenwart von Kieselsäure aus stark saurer Lösung als H_2SiF_6 abdestilliert und kann dann in der Vorlage auf verschiedene Weise maßanalytisch bestimmt werden. Ein Nachteil dieses sonst sehr eleganten Verfahrens ist darin zu sehen, daß die Destillation, die bis

²⁾ H. H. Willard u. O. B. Winter, Ind. Engng. Chem., Analyt. Edit. 5, 7 [1933].