

Untersuchungen über die alkylierende Wirkung von ^{14}C -Methylnitrosoharnstoff und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Äthyl-nitrosoharnstoff¹

Aus Untersuchungen von DRUCKREY et al.² ist bekannt, dass die Gabe von Nitrosomethylharnstoff und Nitrosoäthylharnstoff bei Ratten vorwiegend zu Hirntumoren führt. Daneben treten nach Nitrosomethylharnstoff vereinzelt Nierengeschwülste auf, während bei Nitrosoäthylharnstoff häufig Leukämien zu beobachten sind. Im Gegensatz zu Dimethylnitrosamin und Diäthylnitrosamin wurden nach Applikation dieser Alkylnitrosoharnstoff-derivate niemals Hepatome beobachtet.

Als mögliche Ursache für die karzinogene Wirkung von Nitrosamiden und Nitrosaminen wird heute der biologische Abbau dieser Verbindungen zu Diazoalkanen diskutiert, welche nach N_2 -Abspaltung eine Alkylation liefern, das unter anderem durch die Reaktion mit den Basen der Nukleinsäuren, insbesondere mit dem Guanin in 7-Stellung, unter Bildung von 7-Alkylguanin eine Änderung der genetischen Information bewirken soll. Über die alkylierende Wirkung von Nitrosomethylharnstoff wurde bereits von anderer Seite berichtet³.

Wir untersuchten, ob ein Zusammenhang zwischen der Menge an 7-Alkylguanin in der RNS und der Organotropie der karzinogenen Wirkung in Hirn bzw. Leber nach Gabe von ^{14}C -Methylnitrosoharnstoff und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Äthyl-nitrosoharnstoff besteht.

Wir verwendeten männliche, 100–120 g schwere SD-Ratten (konventionelle Koloniezucht, Zuchtbetrieb Schwenke, Nauheim über Gross-Gerau), Diät: Altromin® und Wasser ad libitum. ^{14}C -Nitrosomethylharnstoff wurde nach den Vorschriften von JONES et al.⁴ und SEMENOW et al.⁵ aus ^{14}C -Methylamin dargestellt, $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Äthyl-nitrosoharnstoff in analoger Anwendung dieser Ver-

fahren aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Äthylamin synthetisiert. Die spezifische Aktivität der Präparate betrug $1\text{ }\mu\text{Ci/mg}$. In Anlehnung an die DL_{50} injizierten wir $100\text{ mg}/\mu\text{Ci/kg}$ Methylnitrosoharnstoff bzw. $200\text{ mg}/\mu\text{Ci/kg}$ Äthyl-nitrosoharnstoff i.v. Die Tiere wurden 16 h nach Applikation getötet und die RNS aus Hirn, Leber und Niere nach der Methode von KIRBY⁶ isoliert. Nach Hydrolyse mit 1 N-HCl erfolgte die Fraktionierung der Basen über einen Ionenaustauscher (Dowex 50 WX 2, 200–400 mesh, H-Form) durch Gradientenelution (1 N-3 N-HCl).

In den Figuren 1 und 2 ist die Auftrennung des RNS-Hydrolysates aus Hirn und Leber nach Gabe von ^{14}C -Methylnitrosoharnstoff dargestellt. Das Elutionsschema des RNS-Hydrolysates der Niere deckt sich mit dem der Leber. Auch hier lässt sich neben 7-Methylguanin ein biologischer Einbau der Aktivität in die Purinbasen erkennen. Die spezifische Aktivität der RNS aus Hirn, Leber und Niere verhält sich etwa wie 1:3:2. Daraus folgt (vgl. Figuren 1 und 2), dass in der Leber ungefähr die gleiche Menge an 7-Methylguanin gebildet wird wie im Hirn, obgleich nach Gabe von Methylnitrosoharnstoff niemals Hepatome beobachtet werden konnten.

Nach Applikation von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Äthyl-nitrosoharnstoff liess sich in der RNS aus Hirn, Leber und Niere kein 7-Äthylguanin nachweisen. Das Elutionsschema zeigte hier nur einen äusserst geringen biologischen Einbau der Aktivität in die Pyrimidinnukleotide.

Zwischen Alkylierung der RNS in den verschiedenen Organen und der Organotropie der kanzerogenen Wirkung besteht bei Nitrosomethyl- und Nitrosoäthylharnstoff demnach kein kausaler Zusammenhang.

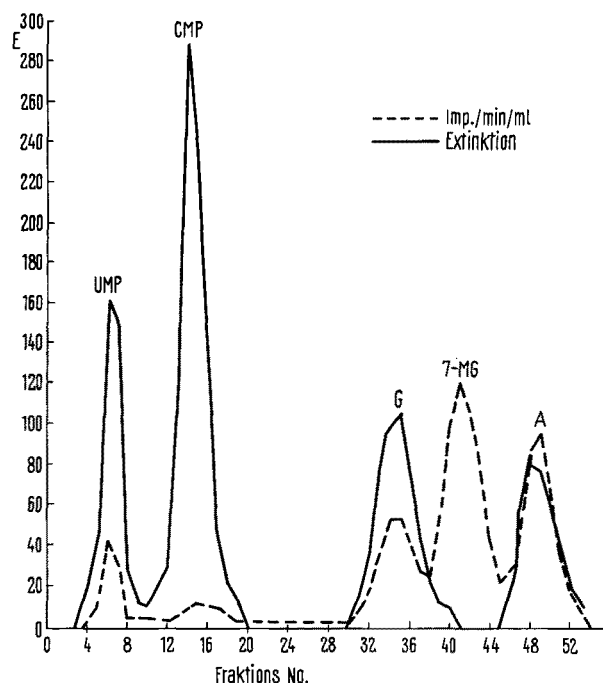


Fig. 1. Elutionsschema eines RNS-Hydrolysates aus Rattenleber nach Gabe von $100\text{ mg}/\mu\text{Ci/kg}$ ^{14}C -Methylnitrosoharnstoff. UMP, Uridinmonophosphat; CMP, Cytidinmonophosphat; G, Guanin; 7-MG, 7-Methylguanin; A, Adenin.

¹ Herrn Professor Dr. O. EICHLER zum 70. Geburtstag gewidmet.

² H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC und D. SCHMÄHL, Z. Krebsforsch. 69, 103 (1967).

³ P. F. SWANN, V. M. CRADDOCK und P. N. MAGEE, Fedn Europ. Biochem. Soc., 2nd Symp., Wien 1965, p. 322.

⁴ A. R. JONES und W. S. SKRABA, Science 117, 252 (1952).

⁵ A. SEMENOW, E. F. COX und J. D. ROBERTS, J. Am. chem. Soc. 78, 3221 (1956).

⁶ K. S. KIRBY, Biochem. J. 64, 405 (1956). – K. S. KIRBY, Modifikation dieses Verfahrens; unveröffentlicht, persönliche Mitteilung von P. N. MAGEE.

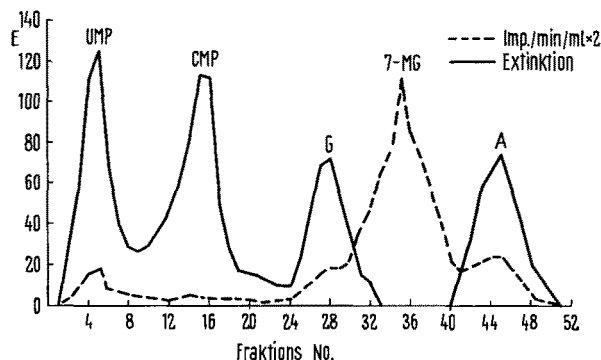


Fig. 2. Elutionsschema eines RNS-Hydrolysates aus Rattenhirn nach Gabe von $100\text{ mg}/\mu\text{Ci/kg}$ ^{14}C -Methylnitrosoharnstoff. Abkürzungen siehe Figur 1.

Summary. Alkylation of RNA from brain, liver and kidney in rats after application of ^{14}C -methylnitrosoarene and ^{14}C -ethylnitrosoarene was investigated. After administration of ^{14}C -methylnitrosoarene the amount of 7-methylguanine in the RNA of brain and liver is about the same. Analogous experiments using ^{14}C -ethylnitrosoarene showed no alkylation of the RNA in the organs investigated. This leads to the conclusion that there is no direct correlation

between the alkylation of RNA and organotropic carcinogenic activity of the compounds studied.

F. W. KRÜGER, H. BALLWEG und W. MAIER-BORST

Institut für experimentelle Geschwulsterzeugung und -behandlung und Institut für Nuklearmedizin, Deutsches Krebsforschungszentrum, 69 Heidelberg (Deutschland), 13. März 1968.

Cytochemical Localization of Monoamine Stores in Sheep Thyroid Gland at the Electron Microscope Level

The determination of the cellular localization of monoamines present in some endocrine organs is of great importance in the assortment of the functional role of these compounds. The thyroid gland of the sheep, in which high amounts of 5-hydroxytryptamine (5-HT) have been demonstrated¹, was found upon examination with the fluorescence histochemical method of FALCK and HILLARP for the demonstration of monoamines^{2,3}, to contain 2 different monoaminergic cell systems. Cells emitting a granular green fluorescence characteristic of primary catecholamines and exhibiting metachromasia were identified as mast cells, which in ruminants are known to store dopamine (DA)⁴. Other cells appearing in clusters between follicles or within follicular epithelium, emitted a yellow light characteristic of tryptamine derivatives and failed to give metachromasia. These cells, probably storing 5-HT, were identified as parafollicular cells named by NONIDEZ⁵, whose existence as a different cell population in mammalian thyroid gland has long been a matter of controversy. However, electron microscopic studies have demonstrated striking morphological differences between follicular and parafollicular cells⁶⁻⁹. These findings, as well as the existence of monoaminergic mechanisms operating in those cells in species in which they do not store amines¹⁰⁻¹¹, support the assumption that the parafollicular cells constitute an independent cell system in the thyroid gland. Recent experiences seem to confirm this hypothesis by demonstrating that the parafollicular cells are involved in the regulation of calcium metabolism mediated by thyrocalcitonin¹².

In order to localize amine stores of sheep thyroid gland at a finer structural level, a cytochemical reaction that was shown to be efficient in differentiating between catechol- and indoleamine containing structures¹³⁻¹⁵, was performed in this organ. Morphological findings were correlated with the results obtained with the assay of biogenic amines present in the gland.

Thyroid glands were obtained from sheep at the slaughter house immediately after death. Small pieces were processed for electron microscopy as previously described¹³⁻¹⁵. Fixation was carried on in 3% glutaraldehyde followed by 2.5% potassium dichromate in 0.2 M acetate buffer pH 4.1 (glutaraldehyde-dichromate or GD reaction), or in 8% formaldehyde followed by glutaraldehyde and potassium dichromate as above (formaldehyde-glutaraldehyde-dichromate or FGD technique). Some blocks were routinely fixed in glutaraldehyde followed by osmium tetroxide. After dehydration in ethanol, the blocks were embedded in Epon 812 and sections observed without further staining under a Siemens Elmiskop I electron microscope. Fluorometric assays of 5-HT¹⁶, noradrenal-

ine¹⁷, DA¹⁸ and histamine¹⁹ were performed in thyroid tissue.

In material processed with GD reaction revealing catechol- and indole-reactive structures, dense precipitates indicating a positive reaction were observed in 2 different cell populations. Some cells, widely distributed in the perifollicular connective tissue, were characterized by large granules of about 4000–6000 Å displaying a positive reaction and exhibiting varying shapes and internal densities (Figure 1a). Their ultrastructural appearance was characteristic of that of mast cells and corresponded to the numerous metachromatic cells observed in the sheep thyroid under the light microscope. The other cells giving a positive reaction were very sparsely and unevenly distributed within the gland and localized between the follicular epithelium and the perifollicular connective tissue or in clusters between follicular cells. The reaction observed in these cells, less intense than that of mast cells, was localized in cytoplasmic granules of varying size and density, most of them being oval or round-shaped.

After prefixation with formaldehyde, prior to glutaraldehyde-dichromate treatment, a procedure resulting in

¹ V. ERSFAMER, Fortschr. Arzneimitt. Forsch. 3, 151 (1961).

² B. FALCK, T. NYSTEDT, E. ROSENGREN and J. STENFLO, Acta pharmac. tox. 21, 51 (1964).

³ B. FALCK, B. LARSON, C. V. MECKLENBURG, E. ROSENGREN and K. SVENAEUS, Acta physiol. scand. 62, 491 (1964).

⁴ B. FALCK, N.-Å. HILLARP and A. TORP, J. Histochem. Cytochem. 7, 323 (1959).

⁵ J. F. NONIDEZ, Am. J. Anat. 49, 479 (1932).

⁶ G. AZZALI, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 38, 1319 (1962).

⁷ S. L. WISSIG, in Proc. Fifth Int. Congr. Electron Microsc. 2, WW1 (1962).

⁸ L. LUCIANO and E. REALE, Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 64, 751 (1964).

⁹ G. AZZALI, Annls. endocr. 25, Suppl. 8 (1964).

¹⁰ B. LARSON, C. OWMAN and F. SUNDLER, Endocrinology 78, 1109 (1966). – A. G. E. PEARSE, Nature 211, 598 (1966).

¹¹ M. RITZÉN, L. HAMMARSTRÖM and S. ULLBERG, Biochem. Pharmac. 14, 313 (1965).

¹² T. MATSUZAWA and K. KUROSUMI, Nature 213, 927 (1967). – B. A. YOUNG, A. CARE and T. DUNCAN, J. Anat. 102, 275 (1968).

¹³ G. JAIME ETCHEVERRY and L. M. ZIEHER, 81st Meet. Am. Ass. Anat. (1968).

¹⁴ G. JAIME ETCHEVERRY and L. M. ZIEHER, J. Histochem. Cytochem., in press (1968).

¹⁵ G. JAIME ETCHEVERRY and L. M. ZIEHER, Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 86, 393 (1968).

¹⁶ N. E. ANDÉN and T. MAGNUSSON, Acta physiol. scand. 69, 87 (1967).

¹⁷ J. HÄGGENDAL, Acta physiol. scand. 59, 242 (1963).

¹⁸ A. CARLSSON and B. WALDECK, Acta physiol. scand. 44, 293 (1958).

¹⁹ H. GREEN and R. ERICKSON, Int. J. Neuropharmac. 3, 315 (1964).