

Verteilung von N-[¹⁴C] Methyl-N-nitrosoharnstoff in der Ratte nach systemischer Applikation

P. KLEIHUES und K. PATZSCHKE

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Abteilung Allgemeine Neurologie, Köln-Merheim
Isotopen-Institut der Farbenfabriken Bayer A.G., Werk Elberfeld

Eingegangen am 19. Juni 1970, angenommen am 6. Oktober 1970

Distribution of N-[¹⁴C] Methyl-N-nitrosourea in the rat after systemic application

Summary. 1. The distribution of N-[¹⁴C] methyl-N-nitrosourea in the rat was investigated by the method of total body radioautography.

2. Two minutes following the intravenous application of N-[¹⁴C] methyl-N-nitrosourea (100 mg/kg) a rather uniform distribution of radioactivity was observed in most organs of the rat including the central nervous system and the mucous membranes of the gastro-intestinal tract.

3. At that time quantitative determinations indicated that the concentration of radioactivity in most parenchymatous organs, as compared to the concentration in the blood, deviated not more than by a factor of 2.

Zusammenfassung. 1. Die Verteilung von N-[¹⁴C] Methyl-N-nitrosoharnstoff in der Ratte wurde mit Hilfe der Ganzkörper-Autoradiographie untersucht.

2. Bereits 2 min nach intravenöser Applikation von N-[¹⁴C] Methyl-N-nitrosoharnstoff (100 mg/kg) wurde eine weitgehend gleichmäßige Verteilung der Radioaktivität auf nahezu alle Organe der Ratte, einschließlich des Zentralnervensystems und der Schleimhäute des Magen-Darmtraktes beobachtet.

3. Zusätzliche quantitative Untersuchungen ergaben, daß die Konzentrationen der Radioaktivität in den meisten parenchymatösen Organen zu diesem Zeitpunkt von der Konzentration im Blut nicht mehr als um den Faktor 2 abweichen.

N-Methyl-N-nitrosoharnstoff¹ hat in den vergangenen Jahren im Rahmen der experimentellen Tumorforschung zunehmendes Interesse gefunden. Unter den carcinogenen N-Nitroso-Verbindungen zeichnet sich MNH dadurch aus, daß es maligne Tumoren in zahlreichen Organen der Ratte hervorzurufen vermag und dabei die Art der Applikation den Ort der Tumorentstehung in weitem Maße beeinflusst (Druckrey u. Mitarb., 1964, 1965; Graffi u. Hoffmann, 1966; Wechsler u. Mitarb., 1969). Wie andere alkylierende Substanzen wirkt MNH im akuten Versuch mutagen (Pasternak, 1963; Marquardt u. Mitarb., 1963) und cytostatisch (Schabel u. Mitarb., 1963; Kleihues, 1969).

In wäßrigen Lösungen ist MNH instabil (Garrett u. Mitarb., 1965; Druckrey u. Mitarb., 1967). Soweit bekannt, bedarf seine Metabolisierung *in vivo* keiner enzymatischen Hydroxylierung (Druckrey u. Mitarb., 1967). Man kann deshalb annehmen, daß bei systemischer Applikation die primäre Verteilung auf die

Wir danken Herrn Dr. Swann für die freundliche Überlassung des radioaktiv markierten MNH.

1 Abkürzungen: MNH = (N-Methyl-N-nitrosoharnstoff), ¹⁴C-MNH = (N-[¹⁴C] Methyl-N-nitrosoharnstoff).

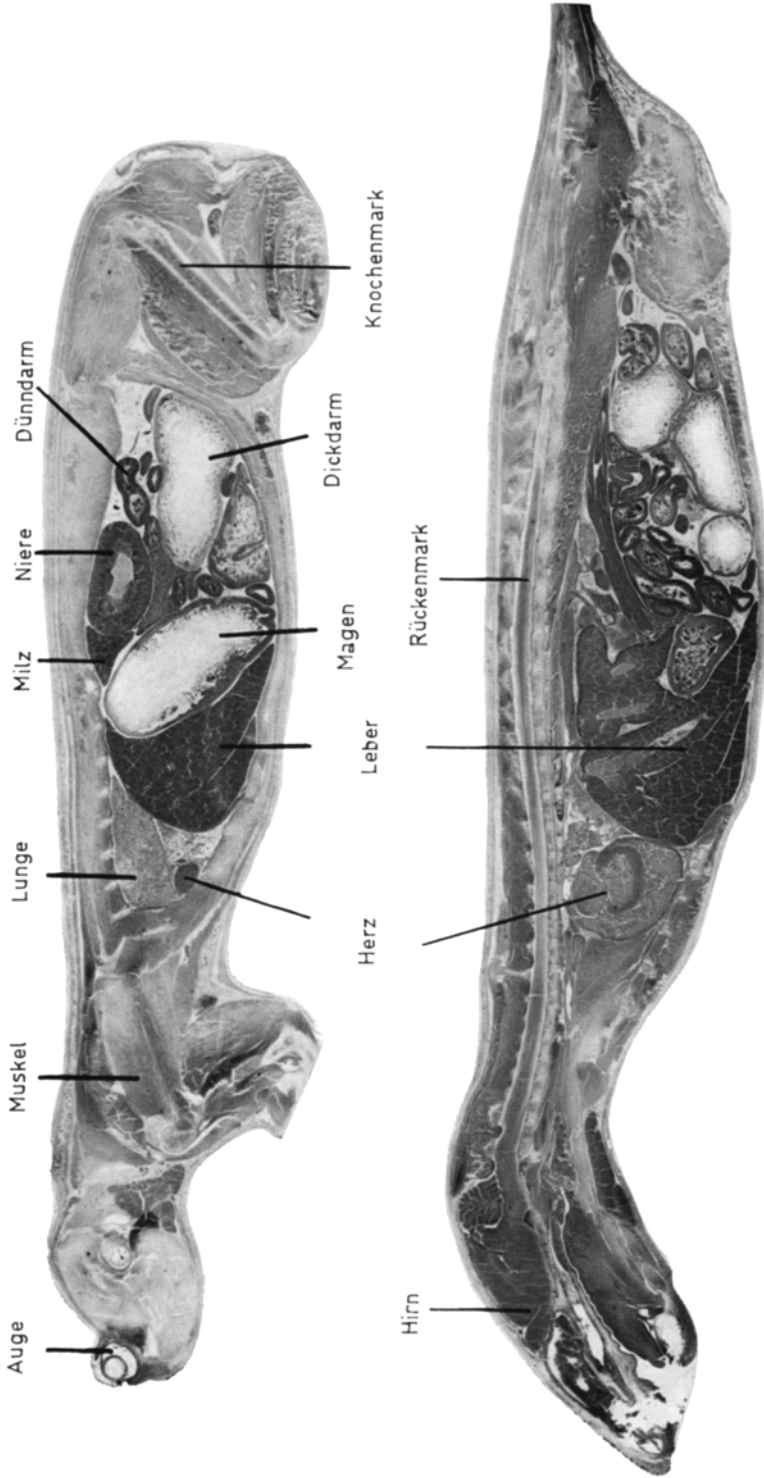


Abb. 1. Ganzkörper-Autoradiogramme von Sagittalschnitten durch die Ratte, 2 min nach intravenöser Injektion von $N\text{-}^{14}\text{C}$ Methyl-N-nitrosourea (100 mg/kg Körpergewicht). Die Schwärzung des Films entspricht der regionalen Verteilung der Radioaktivität. Maßstab 1 : 1. Oben: lateraler Sagittalschnitt durch die Nieren-Augen-Ebene; unten: Sagittalschnitt durch die Medianebene

verschiedenen Organe ein wichtiger Faktor ist für das Ausmaß der Reaktion des Carcinogens bzw. seiner Metaboliten mit Zellbestandteilen. Unter den pharmakokinetischen Untersuchungen stößt jedoch die zeitabhängige quantitative Messung beim MNH auf Schwierigkeiten, da bei der Ratte die Halbwertszeit der Substanz nach intravenöser Injektion nur wenige Minuten beträgt (Swann, 1968; Schein, 1969 a). Geeigneter erschien uns deshalb zur Lösung dieses Problems die Methode der Ganzkörper-Autoradiographie (Ullberg, 1954; Patzschke, 1968). Sie erlaubt für einen definierten, auch sehr kurzen Zeitraum nach der Injektion einer radioaktiv markierten Substanz eine Beurteilung der Aktivitätsverteilung in allen Organen der Ratte.

Material und Methodik

Der Versuch wurde durchgeführt an der weibl. Wistar-Ratte (Zucht der Fa. Madaus, Köln-Merheim). Das Körpergewicht betrug 160 g. N-[¹⁴C]-Methyl-N-nitrosroharnstoff¹ (spez. Aktivität 158 μ Ci/mM) wurde von Herrn Dr. P. F. Swann hergestellt (s. Swann u. Magee, 1968). Unmittelbar vor dem Versuch wurde ¹⁴C-MNH in Citratpuffer (3,0 mM; pH 5,6) gelöst (10 mg/ml). Von dieser Lösung wurden 1,6 ml (entsprechend einer Dosis von 100 mg/kg) in die Schwanzvene injiziert. Eine Minute nach der Injektion wurde das Tier mit Äther narkotisiert und innerhalb einer weiteren Minute in eine Kältelösung (Aceton-Trockeneis; etwa -70° C) eingetaucht. Anschließend wurden im Kryostaten in sagittaler Richtung durch das ganze Tier 50 μ m dicke Gewebeschnitte in verschiedenen Ebenen angefertigt. Diese wurden mit Tesafilm aufgenommen und für etwa 18 Std bei -25° C getrocknet. Für die Herstellung der Autoradiographien wurden Agfa-Gevaert Röntgenfilme verwendet. Die Expositionszeit betrug durchschnittlich 21 Tage. Einzelheiten der Methodik sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Patzschke, 1968).

Zum Ausschluß von Schwärzungen, die durch direkten Kontakt der Substanz oder der tierischen Gewebe mit der Filmemulsion evtl. entstehen könnten, wurden Schnitte eines Tieres, dem 100 mg/kg inaktives MNH verabreicht wurden, mit doppelter Belichtungszeit exponiert. Auf diesen Autoradiogrammen zeigten sich keine Schwärzungen.

Da die histologische Aufarbeitung des Tieres nur bis zur Medianebene erfolgt, war es möglich, von der anderen Hälfte des gleichen Tieres Organproben für die quantitative Bestimmung der Radioaktivität zu entnehmen. Die Organe wurden im Kälteraum präpariert. Etwa 5—15 mg der gefriergetrockneten, homogenisierten Gewebe wurden in ein Szintillationsgläschen eingewogen und nach Zugabe von je 1 ml Hyamin-Hydroxid für etwa 24 Std bei 70° C inkubiert. Die Messung erfolgte nach Zugabe von 10 ml eines toluolhaltigen Szintillationsmediums im Packard Modell 3375 Szintillationsspektrometer. Die Ausbeute wurde mit Hilfe eines internen Standards ([¹⁴C]-Toluol) ermittelt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen sind in den Abb. 1-3 wiedergegeben. Auf den Autoradiogrammen entspricht die Intensität der Schwärzung der Konzentration der Aktivität in den einzelnen Geweben. Eine vergleichende Beurteilung der regionalen Aktivitätsverteilung ist jedoch nur innerhalb eines Bildes zulässig, da bei der photographischen Wiedergabe der Bilder geringfügige Intensitätsschwankungen der Schwärzungen im Vergleich zu denen der Originalautoradiogramme möglich sind.

Aus den in Abb. 1 wiedergegebenen Autoradiographien ist die Verteilung der Radioaktivität in verschiedenen Organen der Ratte 2 min nach systemischer Applikation von ¹⁴C-MNH ersichtlich. Die geringste Aktivität findet sich in Knochen und Fettgewebe. Über der Muskulatur ist die Schwärzung deutlich stärker, jedoch mit erheblichen regionalen Unterschieden. Relativ stark ist z. B.

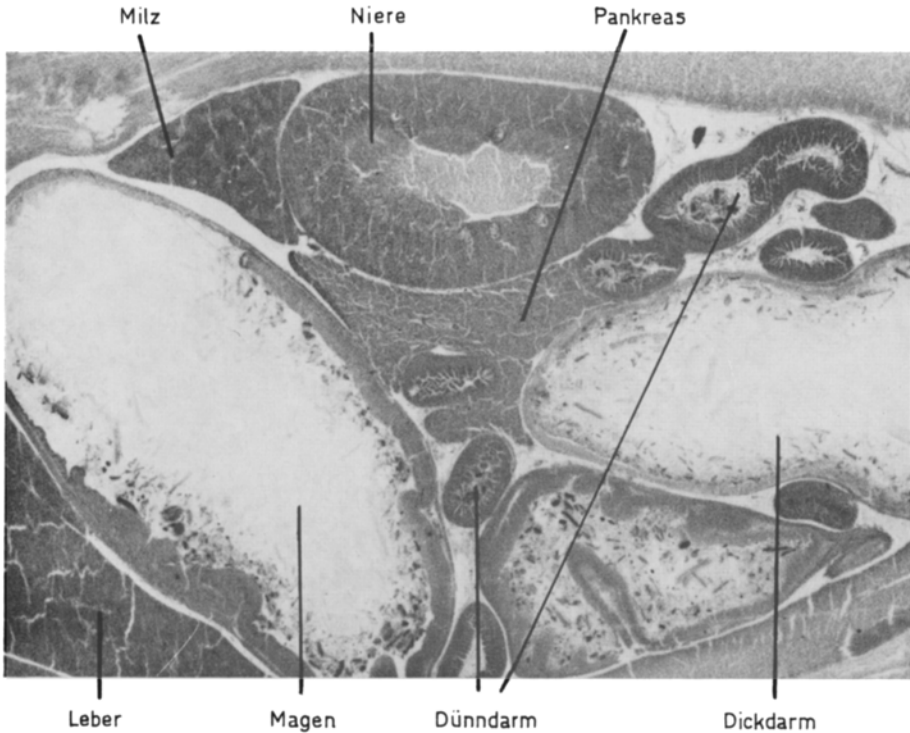


Abb. 2. Verteilung der Radioaktivität im Bereich der Abdominalorgane. Ausschnittvergrößerung aus dem in Abb. 1 (oben) wiedergegebenen Autoradiogramm. Maßstab 3,3:1

die Aktivitätskonzentration in der Zungenmuskulatur, sowie in umschriebenen Teilen der Nackenmuskeln. Unter den parenchymatösen Organen findet sich die stärkste Schwärzung über Leber, Niere (mit Ausnahme der Papille), Hals- und Ohrspeicheldrüsen, Pankreas und Milz. Die Verteilung der Radioaktivität im Bereich der Abdominalorgane ist in Abb. 2 detailliert wiedergegeben. In allen Wandschichten des Magens und der Därme zeigt sich Aktivität; sie ist über dem Dünndarm auch in den Schleimhautzotten erkennbar. In Schleimhautnähe sind Schwärzungen auch über dem Magen- und Darminhalt nachweisbar, während die zentralen Bereiche des Inhalts von Magen und Colon frei von Aktivität sind.

Im Zentralnervensystem ist 2 min nach systemischer Applikation von ^{14}C -MNH ebenfalls eine deutliche Aktivitätskonzentration vorhanden. Das Großhirn (Abb. 1, unten) zeigt eine relativ homogene Schwärzung, in der sich das Marklager als hellere Sichel kaum abhebt. Im Bereich des Rückenmarkes ist das zentrale Grau durchweg stärker aktiv, als die peripher gelegenen Bahnsysteme der weißen Substanz. In Abb. 3 ist die Aktivitätsverteilung im Bereiche des Kleinhirns als Ausschnittvergrößerung wiedergegeben. Durch die im Verhältnis zum Marklager und zur Molekularschicht stärkere Schwärzung über der Körnerzellschicht wird die charakteristische Kleinhirn-Architektur sichtbar. Die Aktivität im Bereich der Epiphyse ist der des Hirnstammes vergleichbar, während über der Hypophyse



Abb. 3. Verteilung der Aktivität in Hirnstamm und Kleinhirn. Ausschnittvergrößerung aus dem in Abb. 1 (unten) wiedergegebenen Autoradiogramm. Maßstab 9:1

eine deutliche lokale Anreicherung vorliegt. In den Subarachnoidalräumen und basalen Zisternen ist keine Aktivität nachweisbar.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Radioaktivität in verschiedenen Organen sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Diskussion

Über die Verteilung und Metabolisierung von MNH in der Ratte liegen bisher nur wenige Berichte vor. Swann (1968) fand 15 min nach intravenöser Applikation (100 mg/kg) polarographisch nur noch etwa 5% der unmittelbar nach der Injektion festgestellten Konzentration. Das entspricht einer biologischen Halbwertszeit im Serum von weniger als 5 min. Die von Schein (1969a) aus kolorimetrischen Bestimmungen errechnete Halbwertszeit im Serum liegt mit 25 min deutlich höher. Die Untersuchungen von Schein (1969a, b) zeigen ferner, daß innerhalb

einzelner Organe der Ratte (Leber, Hirn) der Abfall der MNH-Konzentration noch rascher ist. Wir haben bei den vorliegenden Untersuchungen die Versuchsdauer sehr kurz gewählt, weil es uns darauf ankam, die Verteilung des Carcinogens selbst, nicht aber die seiner (radioaktiven) Metaboliten auf die verschiedenen Organe der Ratte zu verfolgen. Bei einer Versuchsdauer von 2 min kann man unterstellen, daß trotz der raschen Metabolisierung des MNH der weitaus größte Teil der autoradiographisch und quantitativ nachgewiesenen Radioaktivität noch der unveränderten Substanz zuzuordnen ist.

Aus den autoradiographischen Befunden geht hervor, daß sich MNH nach systemischer Applikation sehr schnell und weitgehend gleichmäßig auf nahezu alle Gewebe verteilt. Geringe Konzentrationen wurden lediglich in Knochen und Fettgewebe gefunden, während die Muskulatur und insbesondere die parenchymatösen Organe zu diesem Zeitpunkt bereits eine deutliche Anreicherung aufwiesen. Besonders hervorzuheben ist der rasche Übertritt von MNH in das Zentralnervensystem und die Schleimhäute des Magen-Darmtraktes. Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen stimmen mit den autoradiographischen Befunden im allgemeinen gut überein (Tab. 1). Eine Ausnahme stellt die Lunge dar, bei der die quantitativ ermittelten Werte deutlich höher liegen, als nach den autoradiographischen Befunden zu erwarten gewesen wäre. Dieses dürfte im wesentlichen dadurch begründet sein, daß die Schwärzungen bei der Ganzkörper-Autoradiographie der Aktivität entsprechen, die sich auf das Volumen des betreffenden Organs bezieht, während bei der quantitativen Bestimmung die Meßwerte die Aktivitätskonzentrationen pro Gewichtseinheit des Organs kennzeichnen. Da das spezifische Gewicht der Lunge infolge des hohen Luftgehaltes im Vergleich zu den anderen Organen klein ist, muß bei gleicher Aktivitätsverteilung pro Gewicht dieses Organ autoradiographisch eine geringere Schwärzung aufweisen.

Die Ursache für die hohe Konzentration in der Lunge ist uns nicht bekannt. Es ist jedoch auf Untersuchungen von Swann (1968) hinzuweisen, aus denen hervorgeht, daß nach intravenöser Injektion von ^{14}C -MNH innerhalb von 5 Std bis

Tabelle 1. Bestimmung der Radioaktivität in verschiedenen Organen der Ratte. 2 min nach intravenöser Injektion von N - ^{14}C -Methyl- N -nitrosoharnstoff. Die Messung erfolgte nach vollständiger Trocknung der tiefgefrorenen Organe. Gleicher Versuch wie in Abb. 1—3

Organ	dpm/mg	Trockengew. ^b	dpm/mg
	Trockengew. ^a	Frischgew.	Frischgew.
Haut	427	0,34	~ 150
Thymus	1161	0,21	~ 240
Muskulatur	1059	0,24	~ 250
Hirn	1245	0,22	~ 270
Blut	1510	0,20	~ 300
Nebennieren	1151	0,28	~ 320
Niere	1919	0,24	~ 460
Lunge	2426	0,21	~ 510
Leber	1798	0,29	~ 520

^a Mittelwert aus 3—5 Bestimmungen.

^b Die Zahlen basieren auf Ergebnissen eigener Untersuchungen.

zu 45 % der Aktivität als ¹⁴CO₂ exhaliiert werden. Ein weiterer Hinweis für den raschen Übertritt von MNH in die verschiedenen Organe ergibt sich aus der Berechnung des Anteils der Radioaktivität, der 2 min nach systemischer Applikation von ¹⁴C-MNH noch im Blutkreislauf vorhanden ist. Unter Zugrundelegung eines Blutvolumens von 6 % des Körpergewichtes ergibt sich aus dem in Tab. 1 angegebenen Wert, daß zu diesem Zeitpunkt nur noch etwa 5 % der injizierten Aktivität im Blut nachweisbar sind. Die Aktivitätskonzentrationen in den untersuchten Organen wick (nach Umrechnung auf dpm/mg Frischgewicht) vom Aktivitätsspiegel im Blut nicht mehr als um den Faktor 2 ab.

Aus den Autoradiographien der Organe des Magen-Darmtraktes (Abb. 1 u. 2) geht ferner hervor, daß ein Teil der Aktivität über die Schleimhäute, insbesondere des Dünndarms und des Magens sezerniert wird. Ob es sich bei dieser im Lumen des Magen-Darmtraktes nachgewiesenen Aktivität noch um die unveränderte Substanz oder aber um radioaktiv markierte Metaboliten handelt, kann nicht entschieden werden. Swann (1968) hält es für wahrscheinlich, daß der größte Teil der Radioaktivität aus ¹⁴C-MNH nach der Metabolisierung als radioaktives Methanol vorliegt. Da die Herstellung der Autoradiogramme eine Gefriertrocknung der Gewebsschnitte einschließt, halten wir es für nicht wahrscheinlich, daß die im Lumen des Magen-Darmtraktes nachgewiesene Radioaktivität auf das Vorliegen von [¹⁴C]-Methanol zurückzuführen ist.

Die Autoradiogramme vom Zentralnervensystem (Abb. 1 unten; Abb. 3) verdienen besondere Beachtung, da MNH bei diskontinuierlicher, chronischer Applikation nahezu selektiv Tumoren des zentralen, gelegentlich auch des peripheren Nervensystems induziert (Druckrey u. Mitarb., 1965). Bei verschiedenen Tierarten (Ratte, Kaninchen) waren die Großhirnhemisphären eindeutig Vorzugssitz der Geschwülste (Druckrey u. Mitarb., 1965, 1967; Stroobandt u. Brucher, 1968; Jänisch u. Schreiber, 1969; Wechsler u. Mitarb., 1969; Kleihues u. Mitarb., 1970), während eine Lokalisation im Hirnstamm, Kleinhirn oder Rückenmark sehr viel seltener beobachtet wurde. Den Autoradiogrammen (Abb. 1 unten; Abb. 3) können jedoch eindeutige regionale Unterschiede in der Aktivitätsverteilung nach Gabe von ¹⁴C-MNH nicht entnommen werden. Die allgemein etwas geringe Aktivität über der weißen Substanz könnte auf die gegenüber der grauen Substanz geringere Capillarisation zurückzuführen sein. Andererseits fand sich eine deutliche Anreicherung der Aktivität über der Hypophyse (Abb. 3), während hier ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Tumoren und der Applikation von MNH nicht nachgewiesen werden konnte (Mennel, 1969). Dies spricht dafür, daß die auffällige Häufung der Tumoren in bestimmten Abschnitten des Zentralnervensystems, die in ähnlicher Weise auch bei pränataler Applikation von Äthylnitrosoharnstoff beobachtet wurde (Kleihues u. Mitarb., 1968; Ivankovic u. Druckrey, 1968; Wechsler u. Mitarb., 1969), nicht auf regionale Unterschiede in der primären Verteilung des Carcinogens im Zentralnervensystem zurückzuführen ist.

Literatur

- Druckrey, H., Steinhoff, D., Preussmann, R., Ivankovic, S.: Krebserzeugung durch einmalige Dosis von Methylnitrosoharnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen. *Naturwissenschaften* **50**, 735 (1964).

- Druckrey, H., Ivankovic, S., Preussmann, E.: Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-N-nitrosroharnstoff. *Z. Krebsforsch.* **66**, 389—408 (1965).
- Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmähl, D.: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Z. Krebsforsch.* **69**, 103—201 (1967).
- Garrett, E. R., Goto, S., Stubbins, J. F.: Kinetics of solvolyses of various N-alkyl-N-nitroso-ureas in neutral and alkaline solutions. *J. Pharmac. Sci.* **54**, 119—123 (1965).
- Graffi, A., Hoffmann, F.: Starke kanzerogene Wirkung von N-Methyl-N-nitrosroharnstoff auf die Hamster- und Rattenhaut im Tropfungsversuch. *Arch. Geschwulst-Forsch.* **28**, 234—248 (1966).
- Jänisch, W., Schreiber, D.: Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystems. Induktion, Morphologie, Transplantation und Anwendung. Jena:VEB Gustav Fischer 1969.
- Ivankovic, S., Druckrey, H.: Transplacentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems I. Äthyl-nitrosroharnstoff (ÄNH) an BD IX-Ratten. *Z. Krebsforsch.* **71**, 320—360 (1968).
- Kleihues, P., Matsumoto, S., Wechsler, W., Zülch, K. J.: Morphologie und Wachstum der mit Äthylnitrosroharnstoff transplazentar erzeugten Tumoren des Nervensystems. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **52**, Tagung 371—379 (1968).
- Zülch, K. J., Matsumoto, S., Radke, U.: Morphology of malignant gliomas induced in rabbits by systemic application of N-methyl-N-nitroso-urea. *Z. Neurol.* **198**, 65—78 (1970).
- Blockierung der DNS-Synthese durch N-Methyl-N-nitrosroharnstoff in vivo. *Arzneim.-Forsch.* **19**, 1041—1043 (1969).
- Marquardt, H., Zimmermann, F. K., Schweier, R.: Nitrosamide als mutagene Agentien. *Naturwissenschaften* **50**, 625 (1963).
- Mennel, H. G.: Zur Morphologie der Hypophysentumoren bei der Ratte. *Arzneim.-Forsch.* **19**, 1055—1059 (1969).
- Pasternak, L.: Untersuchungen über die mutagene Wirkung von Nitrosaminen und Nitrosomethylharnstoff. *Acta biol. med. germ.* **10**, 436—438 (1963).
- Patzschke, K.: Ganztier-Autoradiographie. Eine Methode in der Arzneimittelforschung. *Münch. med. Wschr.* **110**, 2043—2053 (1968).
- Schabel, F. M., Johnston, T. P., McCaleb, G. S., Montgomery, J. A., Russell Laster, W., Skipper, H. E.: Experimental evaluation of potential anticancer agents. VIII. Effects of certain nitroso-ureas on intracerebral L1210 leukemia. *Cancer Res.* **23**, 725—733 (1963).
- Schein, Ph. S.: (a) 1-methyl-1-nitroso-urea and dialkylnitrosamine depression of nicotinamide adenine dinucleotide. *Cancer Res.* **29**, 1226—1232 (1969).
- (b) 1-methyl-nitroso-urea depression of brain nicotinamide adenine dinucleotide in the production of neurologic toxicity. *Proc. Soc. exp. Med.* **131**, 517—520 (1969).
- Stroobandt, G., Brucher, J. M.: Etude de tumeurs nerveuses obtenues par l'administration de méthylnitrosourée au rat. *Neurochirurgie* **14**, 515—533 (1968).
- Swann, P. F.: The rate of breakdown of methyl methanesulphonate, dimethyl sulphate and N-methyl-N-nitroso-urea in the rat. *Biochem. J.* **110**, 49—52 (1968).
- Magee, P. N.: Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitroso-urea, dimethylnitrosamine, dimethyl sulphate and methyl methane-sulphonate. *Biochem. J.* **110**, 39—47 (1968).
- Ullberg, S.: Studies on the distribution and fate of ³⁵S-labelled benzyl-penicillin in the body. *Acta radiol. Stockh. Suppl.* **118**, 1954.
- Wechsler, W., Kleihues, P., Matsumoto, S., Zülch, K. J., Ivankovic, S., Preussmann, R., Druckrey, H.: Pathology of experimental neurogenic tumors chemically induced during prenatal and postnatal life. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **159**, 360—408 (1969).

Dr. P. Kleihues
Max-Planck-Institut für Hirnforschung
Abteilung Allgemeine Neurologie
D-5000 Köln-Merheim