

Aus dem Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. P. Eyer
Forschungsgruppe für Chemische Kanzerogenese
Leiter: Prof. Dr. E. Richter

**Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins
N'-Nitrosonornicotin in Gewebeschnitten von Mäusen, Ratten
und Menschen sowie Möglichkeiten der Hemmung durch
Nicotin, Cotinin und Phenethylisothiocyanat**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Haushalts- und Ernährungswissenschaften
(Dr. oec. troph.)

am Fachbereich der Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Giessen
vorgelegt von

Bettina Lassnack
aus München

München 2005

Dissertation am Fachbereich
der Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. W. Köhler

Prüfungsvorsitzende: Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Brückner

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Richter, München

Prüfer: Prof. Dr. E. Weigand

Prüfer: Prof. Dr. med. V. Mersch-Sundermann

Tag der Disputation: 06. Juni 2005

*Meinen Eltern,
meinem Bruder*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
1. Einleitung	1
1.1. Krebserkrankungen in Deutschland	1
1.2. Tabakrauch und die Folgen für die Gesundheit	3
1.2.1. Inhaltsstoffe	6
1.2.2. Tabakalkaloide	8
1.2.3. Myosmin	9
1.3. Nitrosamine	13
1.3.1. Exogene Nitrosaminbelastung	14
1.3.2. Endogene Nitrosierung	16
1.3.3. Entstehung der tabakspezifischen Nitrosamine	17
1.3.4. Gefahrenpotenzial der Nitrosamine	20
1.4. Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins NNN	21
1.4.1. Enzymatische Systeme zur Metabolisierung	23
1.5. Organspezifität der NNN-Tumoren	24
1.6. Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese	27
1.7. Chemoprävention der NNN-Tumoren	29
1.8. Gewebeschnitte zur Charakterisierung des Fremdstoffwechsels	33
1.9. Zielsetzung der Arbeit	37
2. Material und Methoden	39
2.1. Material	39
2.1.1. HPLC-System	39
2.1.2. Laborgeräte	39
2.1.3. Chirurgische Instrumente	40
2.1.4. Chemikalien	40
2.1.5. Radiochemikalien	41
2.1.6. Puffer und Lösungen	41
2.1.7. Materialien	42
2.1.8. Radioaktive Stammlösung und Einstellung der spezifischen Aktivität	42
2.2. Methoden	44
2.2.1. Verwendete Gewebe	44
2.2.2. Gewinnung und Aufbereitung der Gewebeproben	45
2.2.3. Herstellung der Gewebeschnitte	45
2.2.3.1. <i>Leber</i>	45
2.2.3.2. <i>Lunge</i>	45
2.2.4. Inkubation der Gewebeschnitte	46
2.2.5. Proteinbestimmung der Gewebeschnitte	47
2.2.6. Bestimmung des LDH-Gehaltes	48
2.2.7. HPLC-Messung der Proben	48

2.2.8.	DNA-Bindungsstudie	49
2.2.8.1.	<i>Inkubation</i>	49
2.2.8.2.	<i>Fällung der DNA</i>	49
2.2.8.3.	<i>Konzentrationsbestimmung und Szintillationsmessung</i>	50
2.2.9.	Auswertung der Versuche und Statistik	51
3.	Ergebnisse	52
3.1.	DNA-Bindungsstudie	52
3.2.	HPLC-Analytik	52
3.3.	Charakterisierung der Gewebeschnitte	53
3.3.1.	Vitalität der Gewebeschnitte	53
3.3.2.	Proteingehalte der Gewebeschnitte	54
3.4.	Metabolismus von NNN in Gewebeschnitten	55
3.4.1.	NNN-Metabolismus der Maus	55
3.4.1.1.	<i>Mäuseleber</i>	56
3.4.1.2.	<i>Mäuselunge</i>	56
3.4.2.	NNN-Metabolismus der Ratte.....	59
3.4.2.1.	<i>Rattenleber</i>	59
3.4.2.2.	<i>Rattenlunge</i>	59
3.4.3.	NNN-Metabolismus des Menschen	62
3.4.3.1.	<i>Humanleber</i>	62
3.4.3.2.	<i>Humanlunge</i>	62
3.4.4.	Myosmin.....	64
3.5.	Kinetik der Metabolisierung von NNN in Gewebeschnitten	67
3.5.1.	Kinetik der Metabolisierung von NNN bei der Maus	67
3.5.2.	Kinetik der Metabolisierung von NNN bei der Ratte	70
3.5.3.	Kinetik der Metabolisierung von NNN beim Menschen	72
3.6.	Beeinflussung des NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten	74
3.6.1.	Hemmung durch Nicotin	74
3.6.1.1.	<i>Maus</i>	74
3.6.1.1.1.	Metabolismus	74
3.6.1.1.2.	Kinetik	77
3.6.1.2.	<i>Ratte</i>	79
3.6.1.2.1.	Metabolismus	79
3.6.1.2.2.	Kinetik	81
3.6.1.3.	<i>Mensch</i>	84
3.6.1.3.1.	Metabolismus	84
3.6.2.	Hemmung durch Cotinin	85
3.6.2.1.	<i>Maus</i>	85
3.6.2.1.1.	Metabolismus	85
3.6.2.1.2.	Kinetik	87
3.6.2.2.	<i>Ratte</i>	90
3.6.2.2.1.	Metabolismus	90

3.6.2.2.2.	Kinetik	91
3.6.2.3.	<i>Mensch</i>	94
3.6.2.3.1.	Metabolismus	94
3.6.3.	Hemmung durch Phenethylisothiocyanat (PEITC)	95
3.6.3.1.	<i>Maus</i>	95
3.6.3.1.1.	Metabolismus	95
3.6.3.1.2.	Kinetik	97
3.6.3.2.	<i>Ratte</i>	99
3.6.3.2.1.	Metabolismus	99
3.6.3.2.2.	Kinetik	101
3.6.3.3.	<i>Mensch</i>	103
3.6.3.3.1.	Metabolismus	103
3.7.	Vergleich des NNN-Metabolismus bei Hamster, Maus, Ratte und Mensch ..	103
4.	Diskussion	109
4.1.	Gewebeschnitte als Methode für in vitro Studien	110
4.2.	Übertragbarkeit der in vitro Experimente auf die in vivo Situation	112
4.3.	DNA-Addukte	113
4.4.	NNN-Metabolismus in Gewebeschnitte	113
4.4.1.	NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten der Maus	114
4.4.2.	NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten der Ratte	115
4.4.3.	NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten des Menschen	116
4.4.4.	Vergleich des NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten von Maus, Ratte, Hamster und Mensch	117
4.5.	Beeinflussung des NNN-Metabolismus	119
4.5.1.	Hemmung der NNN-Aktivierung durch Nicotin und Cotinin	119
4.5.2.	Chemoprävention mit PEITC	123
5.	Zusammenfassung	126
6.	Literaturverzeichnis	128
7.	Tabellenanhang	141

Abkürzungen

AC	Adenokarzinom
BMI	Body Mass Index
Cl_{intr}	intrinsische Clearance
Diol	4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanol
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dpm	decay per minute, radioaktiver Zerfall pro Minute
ETS	environmental tobacco smoke
EU	Europäische Union
h	Stunde(n)
HB	Hämoglobin
HPB	4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon, Ketoalkohol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Hauptstromrauch
Hydroxysäure	4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butansäure
IARC	International Agency for Research on Cancer
i.p.	intraperitoneal
<i>iso</i> -NNAL	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol
KG	Körpergewicht
Ketosäure	4-Oxo-4-(3-pyridyl)-1-butansäure
k_m	Michaelis-Menten-Konstante
M	molar
min	Minute(n)
MW	Mittelwert
MYO	Myosmin
NAB	<i>N'</i> -Nitrosoanabasin
NAT	<i>N'</i> -Nitrosoanatabin
NDMA	<i>N</i> -Nitrosodimethylamin
NIC	Nicotin
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	nicotine derived nitrosamino ketone = 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	<i>N'</i> -Nitrosornicotin

NPRO	<i>N</i> -Nitrosoprolin
NRN	Nornicotin
NS	Nebenstromrauch
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PEITC	β -Phenethylisothiocyanat
p.o.	peroral
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed Phase
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
S.E.	standard error (Standardabweichung vom Mittelwert)
SCC	squamous cell carcinoma, Plattenepithelkarzinom
TSNA	tabakspezifische Nitrosamine
UV	Ultraviolett-Spektroskopie

1. Einleitung

1.1. *Krebserkrankungen in Deutschland*

Krebs stellt heutzutage in Deutschland neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. 1999 wurde für jeden vierten von insgesamt ca. 850000 Todesfällen eine bösartige Krebserkrankung verantwortlich gemacht. Im Jahre 1990 verstarben europaweit etwa 26% der Männer und 21% der Frauen an Krebs [1]. Für das Jahr 1996 hat man für Europa mindestens 800000, für die USA über 550000 und weltweit etwa 3 Millionen Todesfälle durch maligne Tumoren geschätzt [2]. Durch intensive Forschung und stets verbesserte Therapiemöglichkeiten konnte in Europa bei beiden Geschlechtern in den Jahren 1995-1999 ein Rückgang der Krebssterblichkeit um ca. 7% erreicht werden [3].

Abbildung 1-1 zeigt die Neuerkrankungen der häufigsten Krebsformen in Deutschland Ende des 2. Jahrtausend, die bei Männern auf ca. 168500 Fälle und bei Frauen auf ca. 179000 Fälle geschätzt werden. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 65 und für Frauen bei 67 Jahren.

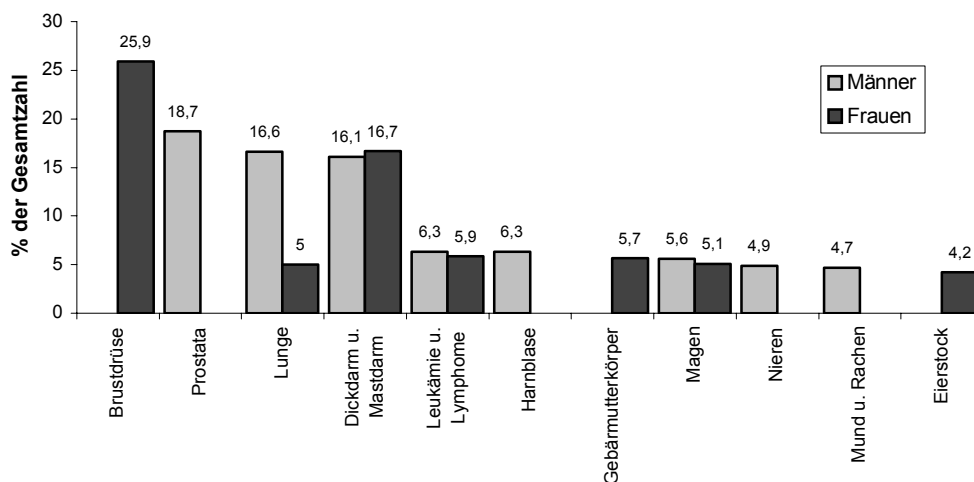


Abbildung 1-1: Neuerkrankungsfälle der häufigsten Krebsformen 1998 in Deutschland

Bei der Erhebung von Daten zur Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen ist wie die geschlechtsspezifische Unterscheidung, auch die Erfassung von Neuerkrankungen gegenüber den Sterbefällen für die Interpretation der Ergebnisse nicht zu vernachlässigen. So ist beim Mann mit 18,7% die Prostata zwar das am häufigsten von bösartigen Tumoren befallene Organ, steht jedoch als Todesursache unter den häufigsten Krebsformen mit 10,5% „nur“ an

dritter Stelle. Der Lungenkrebs ging 1998 mit 16,6% in die Statistik der Neuerkrankungen an Krebs ein, war jedoch unter den Männern mit 26,4% die Krebsform, mit der höchsten Sterberate (Abb. 1-2).

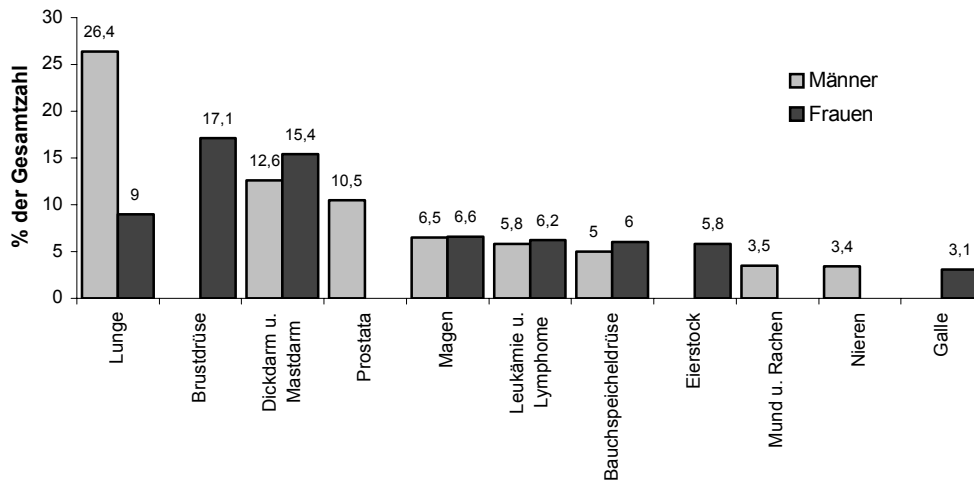


Abbildung 1-2: Tumormortalitätsrate der häufigsten Krebsformen 1998 in Deutschland

Bei der Beurteilung von Krebsrisikofaktoren unterscheidet man grundsätzlich zwischen individuell vermeidbaren Risiken, wie eine ungesunde Lebensweise und nicht beeinflussbaren Größen. Dazu zählen unter anderem genetisch bedingte Krebsrisikofaktoren. Studien über Risikofaktoren für Krebserkrankungen ergaben, dass neben falschen Ernährungsgewohnheiten und der Konsum von Tabak mit jeweils einem Drittel als Hauptursachen für die Entstehung von Krebserkrankungen verantwortlich zu machen sind [4] (Abb. 1-3). Lungenkrebs zählt zu denjenigen malignen Tumoren, für die der Hauptrisikofaktor schon seit langer Zeit bewiesen ist. Bei 90% der männlichen und 60% der weiblichen Lungenkrebspatienten ist die Erkrankung auf das Rauchen zurückzuführen. Das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken, steigt mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten, der Dauer des Rauchens sowie der Inhalationstiefe. Während die Inzidenz bei Männern in Deutschland seit Mitte der 80er Jahre rückläufig ist, steigt diese bei den Frauen kontinuierlich an.

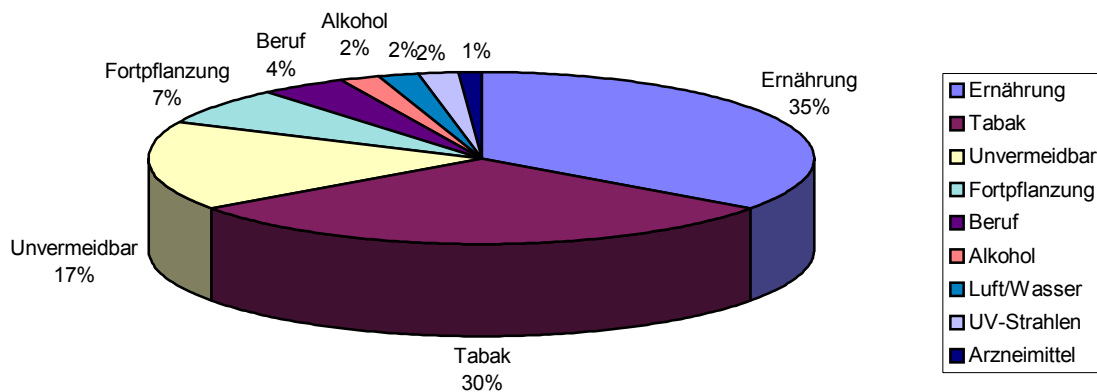


Abbildung 1-3: Risikofaktoren für Krebserkrankungen

Trotz der Vielzahl an Verbesserungen der Therapiemöglichkeiten, zählt der Lungenkrebs zu den prognostisch ungünstig verlaufenden Krebserkrankungen. Die relative 5-Jahresüberlebensrate ist mit etwa 9% bei Männern schlechter als bei Frauen (17%). Ein Lungenkrebspatient in Deutschland hat mit einem Verlust an Lebenserwartung von durchschnittlich 12 bis 13 Jahren zu erwarten [5].

1.2. *Tabakrauch und die Folgen für die Gesundheit*

Seit dem 16. Jahrhundert, als die Tabakpflanze von Übersee nach Europa gebracht wurde spielt der Tabak bzw. der Genuss des Tabakrauchens in der Gesellschaft eine wichtige Rolle. Mit Beginn der industriellen Massenproduktion von Zigaretten Anfang des 20. Jahrhunderts stieg der jährliche Pro-Kopf-Verbrauch (bezogen auf den Bevölkerungsanteil der über 15-jährigen) in den westlichen Staaten bis in die 60er Jahre von 400-800 Zigaretten auf fast das Zehnfache an [6]. Um die Jahrtausendwende pendelte sich in Westdeutschland der Verbrauch pro Kopf auf etwa 2000 Zigaretten pro Jahr ein [7]. Mit dem Anstieg des Zigarettenkonsums wurde auch eine Zunahme der Lungenkrebserkrankungen beobachtet. Dies wurde nach ersten Berichten in den 30er Jahren, aus Deutschland anfangs der 50er Jahre des 20. Jahrhunderts endgültig mit epidemiologischen Untersuchungen bewiesen (Abb. 1-4). Epidemiologische Langzeitstudien zeigten, dass das Zigarettenrauchen für bis zu 90% aller Lungenkrebsfälle und 50 bis 70% aller Krebserkrankungen von Mundhöhle, Speiseröhre und des Kehlkopfes verantwortlich zu machen ist [8].

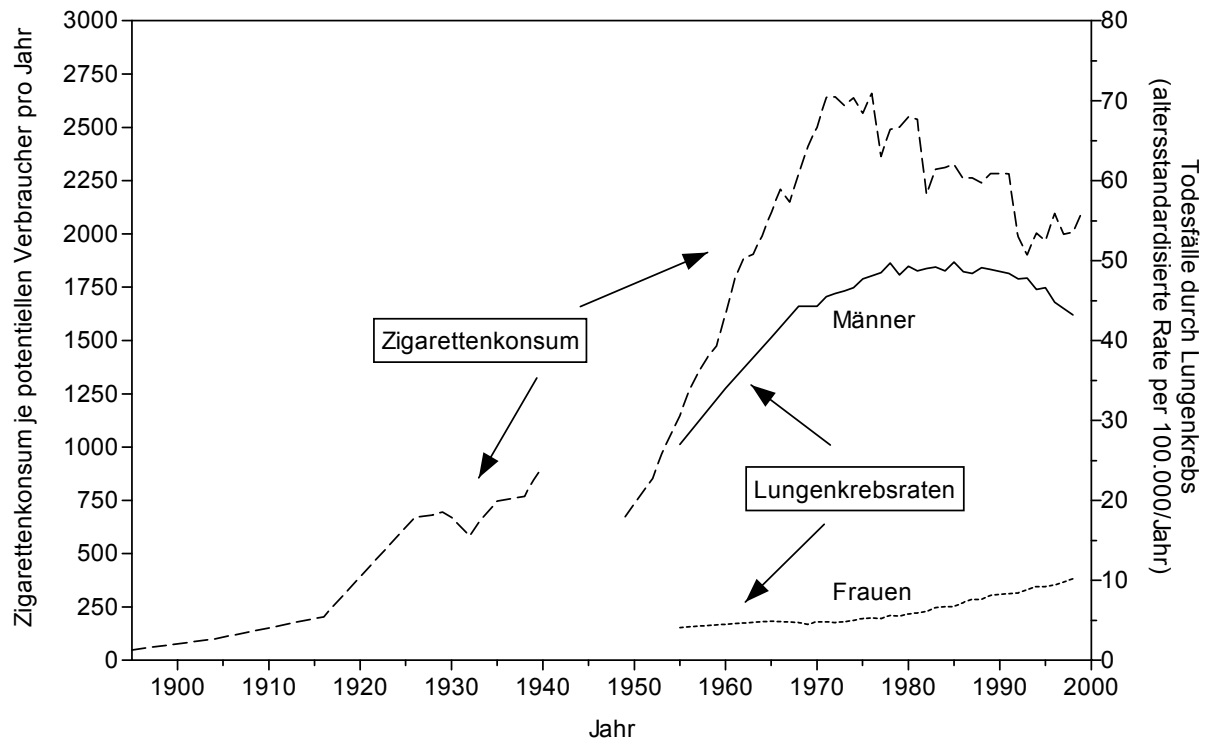


Abbildung 1-4: Entwicklung des Zigarettenkonsums von Erwachsenen (≥ 15 Jahren) von 1895 bis 1999 und die Lungenkrebsraten bei Männer und Frauen von 1955 bis 1997 in Deutschland [7]

Vermeehrt werden Zusammenhänge zwischen Tabakkonsum und Tumoren in Magen, Leber, Gebärmutter und Nieren diskutiert und mittlerweile erhärtet sich auch der Verdacht auf eine Mitwirkung am Entstehen von Leukämie, Krebs des Dickdarms und weiteren Organen. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist der Tabakkonsum heute mit die häufigste Ursache für Krebserkrankungen (Tab. 1-1).

Das Risiko an einem bösartigen Tumor zu erkranken, hängt dabei von einer Reihe von Rauchfaktoren ab. Neben der Menge der gerauchten Zigaretten und deren Teergehalt spielt vor allem die Dauer des Tabakkonsums eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Krebserkrankungen. Raucher mit einem Zigarettenkonsum von 20 Zigaretten pro Tag erkranken durchschnittlich 1,5 bis 3 mal so häufig an Blasenkrebs als Nichtraucher [9,10] und bei lebenslangem Konsum sogar 20 bis 30 mal öfter an Lungenkrebs [11].

Abbildung 1-5 zeigt beispielhaft für den Lungenkrebs die Erhöhung des relativen Risikos gegenüber Nichtrauchern mit zunehmender Anzahl der pro Tag gerauchten Zigaretten ebenso wie mit abnehmendem Einstiegsalter. Außerdem werden die großen Unterschiede zwischen den USA und Japan gezeigt, deren Ursachen noch weitgehend unbekannt sind [7].

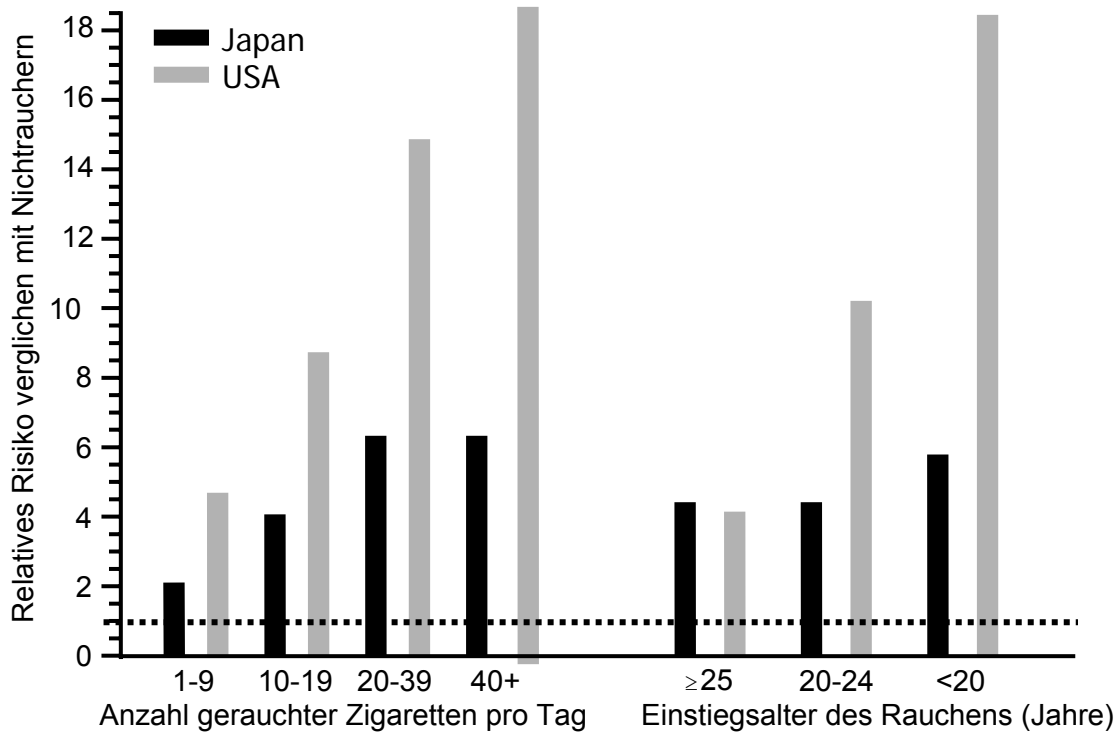


Abbildung 1-5: Sterberate bei Lungenkrebskrankungen unter Männern in Japan und USA

Tabelle 1-1: Geschätzter Anteil an den Krebstodesfällen in Deutschland, der im Jahre 1995 durch das Zigarettenrauchen verursacht wurde (modifiziert nach [12])

Organ	Krebstodesfälle in Deutschland	Prozent der durch Rauchen verursachten Fälle	Anzahl der durch Rauchen verursachten Fälle
Männer			
Mundhöhle	3697	65	2400
Ösophagus	3123	30-50	900-1500
Pankreas	5132	30-50	1500-2600
Kehlkopf	1567	80	1300
Lunge	28887	75-90	22000-26000
Harnblase	4215	50	2100
Niere	3820	30	1100
Magen	7887	20-35	1600-2800
Gesamtzahl	58328	50-70	33000-40000

Tabelle 1-1, Fortsetzung

Frauen			
Mundhöhle	987	65	600
Ösophagus	950	30-50	300-500
Pankreas	6017	15-20	900-1200
Kehlkopf	221	80	200
Lunge	8260	30-60	2500-4900
Harnblase	2229	25	600
Niere	2792	30	800
Magen	7502	20-35	1500-2600
Gesamtzahl	28958	25-40	7400-11000

1.2.1. Inhaltsstoffe

Beim Rauchen von Zigaretten, Zigarren und Pfeifentabak wird zwischen Hauptstromrauch (HS) und Nebenstromrauch (NS) unterschieden (Abb. 1-6). Der Hauptstromrauch entsteht bei ca. 850 bis 950 °C während des Zuges an der Zigarette und wird vom Raucher größtenteils inhaliert. Als Nebenstromrauch bezeichnet man den Rauch, der sich in der Zugpause bildet und nicht nur vom Raucher selbst, sondern auch vom Nichtraucher in seiner Umgebung eingeatmet wird. Die Zusammensetzung des Nebenstromrauchs, der bei wesentlich niedrigeren Temperaturen entsteht (500 bis 650 °C), unterscheidet sich von der des Hauptstromrauchs. Sowohl Haupt- als auch Nebenstromrauch bestehen aus einer gasförmigen Phase, die flüchtige Substanzen wie Benzol, Vinylchlorid, Acrolein, etc. enthält und einer Partikelphase, dem Kondensat („Teer“), in dem sich die halb- und nichtflüchtigen Stoffe befinden wie Alkaloide (Nicotin und seine Derivate), aromatische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK). Von den über 4800 chemischen Verbindungen, die sich im Tabakrauch befinden [7], konnten bisher mehr als 3000 isoliert werden [13,14]. Einige dieser Verbindungen zählen zu den organspezifischen Kanzerogenen, Co-Kanzerogenen, Tumorpromotoren, aber auch zu Tumorinhibitoren [15].

Zu den circa 69 Substanzen mit nachgewiesener kanzerogener Wirkung gehören Formaldehyd, PAK, aromatische Amine und tabakspezifische Nitrosamine (TSNA) [13,16]. In Tabelle 1-2 werden die Verteilung einiger kanzerogener Inhaltsstoffe zwischen Haupt- und Nebenstromrauch und die aus der Arbeitsmedizin und Epidemiologie bekannten Zielorgane

beim Menschen und die im Tierversuch ermittelten Krebsarten zusammengefasst. Gegenüber dem Hauptstromrauch sind diese kanzerogenen Stoffverbindungen im Nebenstromrauch in bis zu 130-facher Konzentration enthalten.

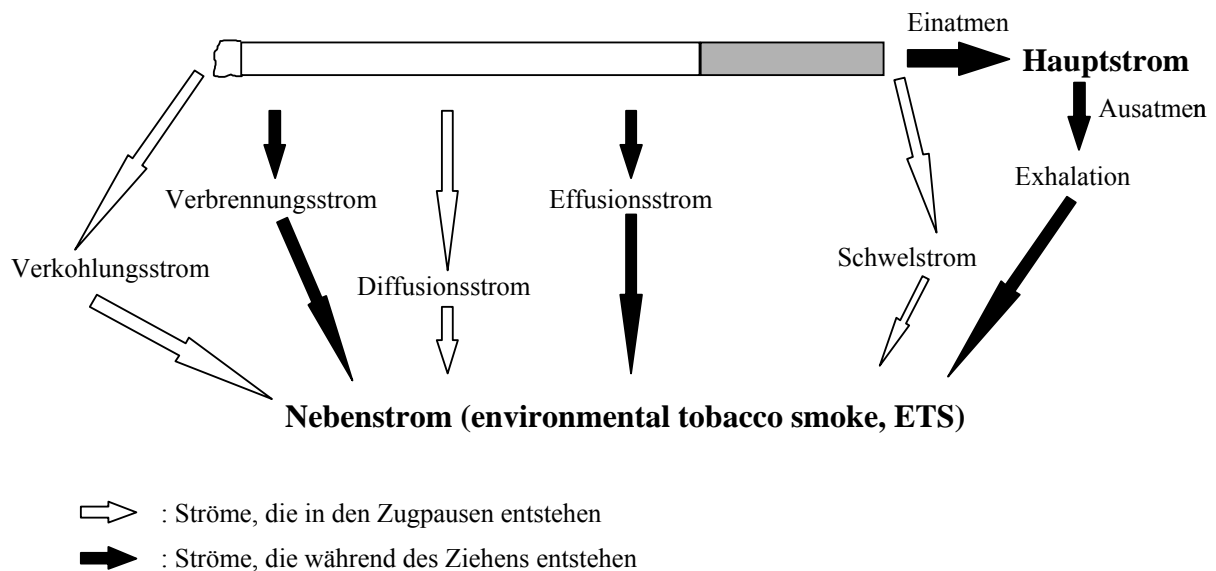


Abbildung 1-6: Rauchströme beim Rauchen einer Zigarette [17,18]

Tabelle 1-2: Kanzerogene im Haupt- und Nebenstromrauch von Zigaretten

Substanz	µg/Zigarette	NS/HS	Zielorgane ²
Benzol	240-490	8-10	Knochenmark (Leukämie)
Formaldehyd	1500	50	Nase
Benzo[a]pyren	0,04-0,07	2,5-20	Lunge, Kehlkopf
N-Nitrosodimethylamin	0,2-1,0	20-130	Leber, (Niere)
4-Aminobiphenyl	0,14	31	Harnblase
N'-Nitrosoornicotin	0,15-1,7	0,5-5,0	Ösophagus, Mundhöhle
NNK ¹	0,2-1,4	1-22	Lunge, Kehlkopf, Pankreas Leber

¹NNK = nicotine derived nitrosamino ketone = [4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon]

²Nachweis im Tierversuch (fett gedruckt: für den Menschen sicher nachgewiesen)

Als „Environmental Tobacco Smoke“ (ETS) wird in der Fachliteratur der vom Nichtraucher aus der Umgebungsluft eingeatmete Tabakrauch bezeichnet. Dieser stellt ein hoch verdünntes, dynamisches Gemisch aus etwa 80 bis 85% Nebenstromrauch und 15 bis 20% exhaliertem Hauptstromrauch dar [19].

1998 wurde der ETS von der MAK-Kommission in die höchste Klasse der kanzerogenen Substanzen und Substanzgemische (Klasse IIIA1, eindeutig kanzerogen für den Menschen) eingestuft [20]. Die Beurteilung von ETS bezüglich der individuellen Belastung durch Kanzerogene und sein Beitrag zur Umweltbelastung erweist sich als schwierig und wird von Experten kontrovers diskutiert [21-23]. Das größte kanzerogene Potenzial unter der Vielzahl an Inhaltsstoffen des Tabakrauches wird neben den PAK den TSNA zugeschrieben. Während für die PAK und andere Kanzerogene, wie zum Beispiel aromatische Amine und Benzol, neben dem Tabakrauch auch andere Umweltquellen, wie zum Beispiel die Ernährung oder gängige Lebensgewohnheiten, bekannt sind, hat man für die Aufnahme von TSNA bisher allein den Genuss von Tabakwaren durch Rauchen, aber auch durch Schnupfen und Kauen verantwortlich gemacht.

1.2.2. Tabakalkaloide

Die Tabakpflanze (*Nicotiana ssp.*) gelangte als Kulturpflanze aus ihren beheimateten Gebieten dem amerikanischen Kontinent, Australien und einigen pazifischen Inseln nach Europa. Zur Herstellung von Tabakwaren werden hauptsächlich Virginia-Tabak (*Nicotiana tabacum*) und in geringeren Mengen Burley-Tabak (*Nicotiana rustica*) verwendet. Der Alkaloidgehalt dieser Tabakarten liegt zwischen 0,5 und 8,0%. Für die Verarbeitung werden bevorzugt Sorten mit einem durchschnittlichen Alkaloidgehalt von 1,5% verwendet. Die Alkaloide der Tabakpflanze übernehmen bei der Entwicklung der Pflanze wichtige Funktionen. Sie fungieren als Stickstoffreserven und Wachstumsregulatoren und schützen die Pflanze vor Fraß durch Insekten und vor anderen Pflanzenfressern [24].

Das Grundgerüst der Alkaloide bildet ein in Position 3 substituierter Pyridylring. Die wichtigsten Vertreter sind Nicotin, Nornicotin, Anabasin und Anatabin (Abb. 1-7).

Das bekannteste Tabakalkaloid, das Nicotin, stellt in 34 von 65 Tabakarten das Hauptalkaloid dar. Es ist lipidlöslich und wird schnell über Schleimhäute und Haut resorbiert. Es passiert die Blut-Hirn-, und die Placentarschranke und tritt auch in die Muttermilch über. Nicotin wird hauptsächlich in der Leber, aber auch in Lunge und Niere metabolisiert und zum größten Teil

renal ausgeschieden [25]. Die tödliche Dosis des stark toxischen Nicotins liegt für einen erwachsenen Menschen bei 40-60 mg [26]. Nornicotin ist in 19 Arten als Hauptalkaloid vertreten und entsteht durch enzymatischen Abbau von Nicotin. Das dritthäufigste Alkaloid ist das Anabasin.

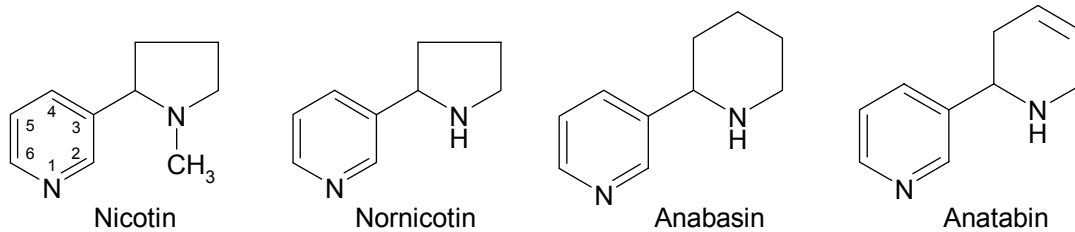


Abbildung 1-7: Strukturen der bekanntesten Tabakalkaloide

Der Gehalt an Tabakalkaloiden wird hauptsächlich durch Pflanzenart, Anbauweise, Reifungsgrad und Einsatz von Düngemitteln beeinflusst. Den höchsten Nicotingehalt findet man in den Blättern. Während des Reifungsprozesses steigt der Alkaloidgehalt der Pflanze an, weshalb die Ernte zu verschiedenen Reifestadien einsetzt, je nachdem wofür der Tabak Verwendung findet. So werden die hellen, grünen Blätter zu Beginn der Reife für Zigarren, die fast gelben Blätter für die Herstellung von Zigaretten, erst zu einem späteren Zeitpunkt abgeerntet. Nach Ernte, Trocknung und Fermentation enthält der Rohtabak je nach Sorte 5 bis 180 mg/g Nicotin. Die Gehalte für Nornicotin und Anatabin liegen bei 2 mg/g bzw. 1 mg/g [27,28].

1.2.3. Myosmin

1944 wurde die Gewinnung von Myosmin mittels Dehydrogenierung von Nicotin bei 570 °C über Quarz beschrieben [29]. Neben dem Nicotin wurde die Struktur des Myosmins schon früh aufgeklärt. Ihm wurde jedoch bisher nur wenig Beachtung geschenkt. Untersuchungen von Tabakproben der Spezies *Nicotiana tabacum* ergaben Myosmingehalte von 0,09 bis 0,14% [30,31]. Die Trennung verschiedener Alkaloide in *Nicotiana tabacum* mit Hilfe der Papierchromatographie sowie deren quantitativer Nachweis über UV-Absorptionsspektren ergaben, bei einem Gesamtanteil von 2,68% Alkaloiden die folgende Reihenfolge: Nornicotin (1,42%), Nicotin (0,47%), Anabasin (0,27%) und Myosmin (0,14%) [31]. Die Untersuchung des Tabakrauches verschiedener Zigarettenarten ergaben einen Myosmingehalt von 13-33

$\mu\text{g}/\text{Zigarette}$ im Hauptstromrauch und $73\text{-}224 \mu\text{g}/\text{Zigarette}$ im Nebenstromrauch [32]. Die Luft eines Raumes, in dem geraucht wird, enthält etwa $0,04$ bis $0,185 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Myosmin [33].

In der jungen Pflanze entsteht Myosmin durch Dehydrogenierung von Nornicotin [34,35] (Abb. 1-8). Die Behandlung von intakten Tabakpflanzen mit ^{14}C -markiertem Nornicotin über einen Zeitraum von acht Tagen ergaben eine Wiederfindung an Radioaktivität von 55% in Nornicotin und 15% in Myosmin. Auch die Irreversibilität der Bildung von Myosmin in der Tabakpflanze konnte von *Leete* 1984 bewiesen werden [36]. Nach Gabe von $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Myosmin an Pflanzen der Spezies *Nicotiana glauca* wurde weder Nicotin noch Nornicotin in der extrahierten Radioaktivität nachgewiesen. Dagegen fand sich als Hauptprodukt des Myosminabbaus radioaktiv markierte Nicotinsäure, wobei der größte Teil der ^{14}C -Atome in der Carboxylgruppe gebunden war.

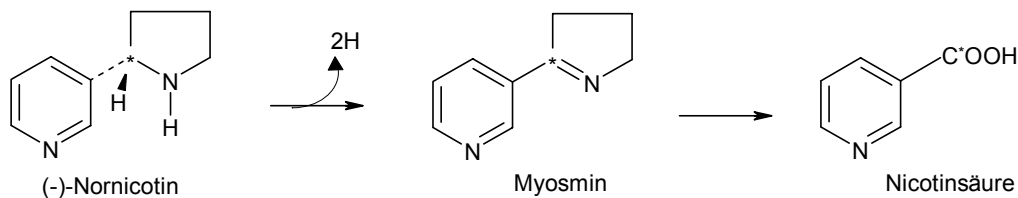


Abbildung 1-8: Bildung von Myosmin aus Nornicotin und weiterer Abbau zu Nicotinsäure

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass sich das Vorkommen von Myosmin hauptsächlich auf die Tabakpflanze beschränkt. Auch dem Nachweis in Blättern und Wurzeln der in Australien beheimateten Pflanze *Duboisia hopwoodii*, deren Blätter aufgrund ihrer narkotisierenden Wirkung von den Aborigines gekaut werden [37], wurde keine Beachtung geschenkt. Erst, als in unserem Arbeitskreis von *Zwickenpflug et al.* [38] das Myosmin in Nüssen nachgewiesen wurde, schien sich der Verdacht zu erhärten, dass es sich hierbei um kein ausschließlich tabakspezifisches Alkaloid handelt. Die in den verschiedenen Nussproben gefundenen Myosmingehalte liegen zwischen $0,2$ und 2 ng/g . Mit dem Verzehr von 100 g Nüssen nimmt man demnach $0,02$ bis $0,2 \mu\text{g}$ Myosmin zu sich. Dies ist vergleichbar mit der Belastung durch ETS, die, wenn man von den Werten von *Jenkins et al.* [33] ausgeht und ein Atemaustauschvolumen von $20 \text{ m}^3/\text{Tag}$ mit einer 70%-igen Resorptionsrate des Alkaloids, wie beim Nicotin [39], für Erwachsene annimmt, zu einer täglichen Aufnahme durch Passivrauchbelastung von $0,06\text{-}2,6 \mu\text{g}$ Myosmin führt. Weitere Untersuchungen in unserem Arbeitskreis zeigten, dass sich das Vorkommen von Myosmin auf wesentlich mehr Pflanzen

erstreckt als bisher angenommen. So konnte Myosmin in Grundnahrungsmitteln wie Reis, Mais, Weizen und Kartoffeln, sowie in Genussmitteln wie Kakao und Mandeln, aber auch in verschiedenen Obst- und Gemüsesorten nachgewiesen werden (Tabelle 1-3) [40]. Der überraschende Befund, dass Myosmin auch in Kuhmilch und Sahne vorkommt, war Anlass zur Untersuchung von Muttermilch, die ebenfalls Myosmin im unteren ppb-Bereich enthält, und schließlich in Plasma- und Speichelproben, die auf eine wesentlich höhere Belastung des Menschen mit Myosmin hinweisen [41].

Tabelle 1-3: Vorkommen von Myosmin in Nahrungsmitteln und Milchprodukten [38,40]

Myosmin nachgewiesen			Myosmin nicht nachgewiesen	
Pflanzenfamilie	Quelle	Konzentration ng/g	Pflanzenfamilie	Quelle
Haselgewächse (Corylaceae)	Haselnuss	0,7	Korbblütler (Compositae lig.)	Blattsalat
Schmetterlingsblütler (Papilionaceae)	Erdnuss	0,2 – 2,0	Gänsefußgewächse (Chenopodiaceae)	Spinat
Nachtschattengewächse (Solanaceae)	Kartoffel Tomate	2,41 – 4,47 0,53 – 0,66	Kürbisgewächse (Scrophulariaceae)	Gurke
Doldenblütler (Umbelliferae)	Karotte	0,01 – 0,03	Lauchgewächse (Liliaceae)	Zwiebel
Sterkuliengewächse (Sterculiaceae)	Kakao	0,68 – 0,85	Weinrebengewächse (Vitaceae)	Weintraube
Rosengewächse (Rosaceae)	Apfel	1,12 – 1,25	Bananengewächse (Musaceae)	Banane
Ananasgewächse (Bromeliaceae)	Ananas	0,66 – 0,72	Rautengewächse (Rutaceae)	Mandarine Zitrone
Strahlengriffelgewächse (Actinidiaceae)	Kiwi	1,15 – 1,61		
Süssgräser (Gramineae)	Hirse Weizen Reis Mais	0,41 – 0,43 0,37 – 0,51 0,19 – 1,15 0,48 – 1,60		
Kuhmilchprodukte	Milch Sahne	1,16 – 1,35 5,93 – 6,26		

Myosmin reagiert mit einer wässrigen Hydroxylamin-Lösung als Carbonyl-Komponente. Daraus konnte auf ein reversibles Hydrolysegleichgewicht in wässriger Lösung geschlossen werden (Abb. 1-9) [42]. Anhand von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren ließ sich das pH-abhängige Gleichgewicht belegen. Im sauren pH-Bereich dominiert die offenkettige Aminoketon-Form, während im neutralen und alkalischen Milieu die geschlossene Ringform überwiegt. In Pufferlösungen mit physiologischen pH-Wert von 7,4 liegt nur noch 1% des Myosmins in der offenkettigen Form vor [43].

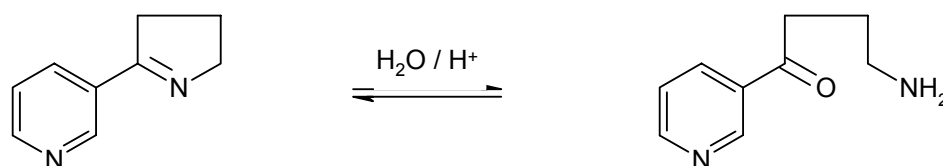


Abbildung 1-9: Reversibles Hydrolysegleichgewicht von Myosmin

Die Nitrosierung von Myosmin wurde erstmalig in einer Veröffentlichung von *Zwickenpflug* [44] detailliert beschrieben. Er untersuchte die direkte Nitrosierung von Myosmin mit N_2O_3 in Pufferlösungen der pH-Werte 5,5, 7,5 und 9. Es resultierte ein Reaktionsgemisch, welches in Abhängigkeit des vorherrschenden pH-Milieus zu unterschiedlichen Anteilen aus NNN und dem Ketoalkohol 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) bestand. Diese Nitrosierungsprodukte konnten von *Zwickenpflug* [44] außerdem in humanem Magensaft, dem NaNO_2 zugesetzt wurde, nachgewiesen werden. Eine Erklärung liefert das zuvor beschriebene reversible Hydrolysegleichgewicht des Myosmins. Unter sauren Bedingungen hydrolysiert Myosmin zur offenkettigen Aminoketonform, und die Nitrosierung des primären Amins führt zu einem instabilen Diazohydroxid, welches wahrscheinlich *in situ* zum Ketoalkohol zerfällt. Höhere pH-Werte begünstigen dagegen die Bildung von NNN aus der geschlossenen Iminform des Myosmins (Abb. 1-10). Weitere ausführliche Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Myosminnitrosierung mit radioaktiv markiertem Myosmin zeigten jedoch überraschenderweise auch eine Zunahme der NNN-Bildung bei sehr niedrigen pH-Werten unter 2 [45]. Von besonderer Bedeutung scheint die Bildung des Ketoalkohols HPB zu sein, der im pH-Bereich von 2-4 innerhalb von wenigen Stunden zu mehr als 50% gebildet wird. Dieser entsteht im Gegensatz zum NNN, welches eine metabolische Aktivierung benötigt, direkt durch die Nitrosierung von Myosmin. Die hierbei auftretende reaktive, instabile Zwischenstufe, das Diazohydroxid, ist als starkes Elektrophil in der Lage, mit zellulären Makromolekülen, zum Beispiel DNA, RNA oder Proteinen, kovalente Bindungen einzugehen. Dies

wurde *in vitro* durch kovalente Bindung radioaktiv markierten Myosmins in Nitrosierungsansätzen in Gegenwart von Kalbsthymus-DNA [45] und *in vivo* an Myosmin-behandelten Ratten durch Nachweis erhöhter Hämoglobin- und DNA-Addukte, die nach alkalischer/saurer Hydrolyse HPB freisetzen, bestätigt [46].

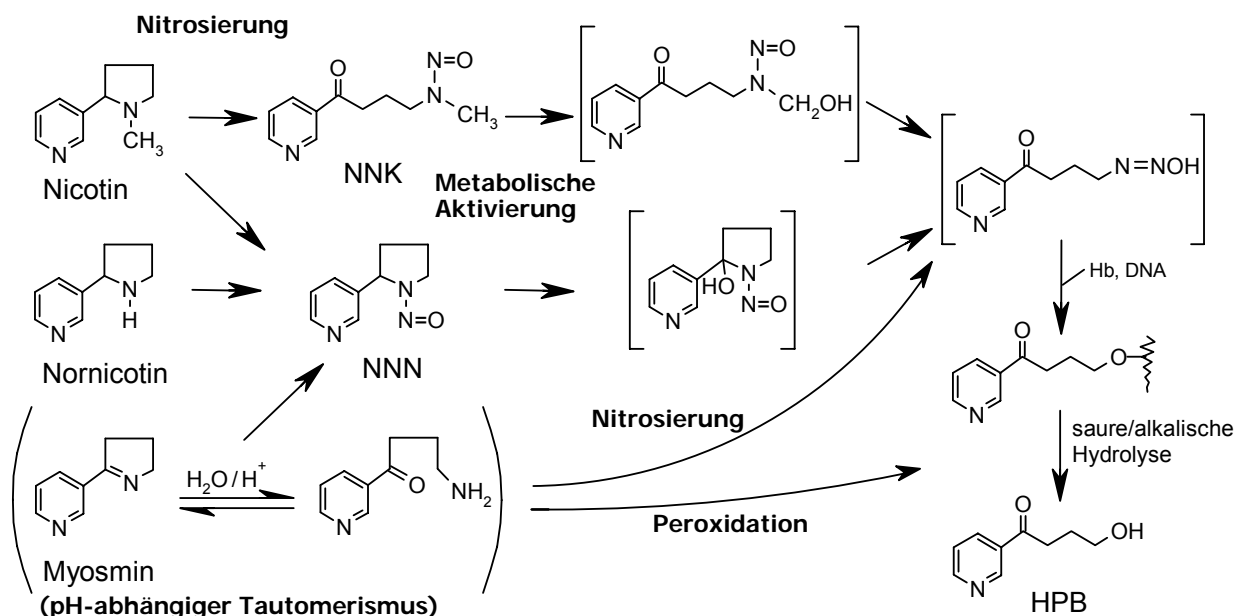


Abbildung 1-10: Bildung von HPB-freisetzenden Addukten aus Tabakalkaloiden und deren Nitrosierungsprodukten

1.3. Nitrosamine

Das gemeinsame chemische Strukturmerkmal aller Nitrosamine ist eine an ein Stickstoffatom gebundene Nitrosogruppe. Nitrosamine entstehen bevorzugt in saurem Milieu aus sekundären Aminen und salpetriger Säure (Abb. 1-11). Primäre und sekundäre Amine können auch in neutraler und alkalischer Lösung von Stickoxiden nitrosiert werden, unabhängig von der Basizität des Amins [47]. Die Bildung von Nitrosaminen aus tertiären Aminen erfordert die vorangehende Spaltung einer Stickstoff-Kohlenstoff-Bindung, weshalb diese Reaktion wesentlich langsamer verläuft. Als reaktives Agens fungiert nicht das Nitrit, sondern die Nitrosierung erfolgt durch das Nitrosylkation oder Nitrosylhalogenid. Durch das pH-Milieu des Reaktionsmediums lässt sich der Anteil des Nitrosierungsagens und somit die Ausbeute an Nitrosaminen steuern. Das pH-Optimum der Nitrosierungsreaktion liegt in einem Bereich von 3,0 bis 3,5. pH-Werte unterhalb dieses Bereiches führen zu einer Protonierung des

Stickstoffes des sekundären Amins zum Iminiumion und würden die Reaktion mit nitrosierenden Substanzen behindern. pH-Werte über 5 unterbinden weitgehend die säurekatalysierte Nitrosierung.

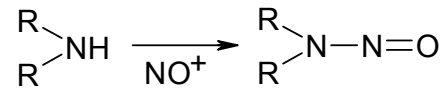
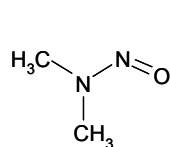


Abbildung 1-11: Vereinfachtes Schema der Nitrosierung

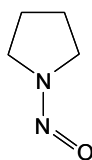
1.3.1. Exogene Nitrosaminbelastung

Neben dem Rauchen, dem Tabakschnupfen und –kauen stellen die Bereiche Ernährung und Beruf zwei weitere bedeutende Hauptquellen für die exogene Nitrosaminbelastung des Menschen dar. Während sich viele den Gefahren des Tabakgenusses freiwillig aussetzen, ist man der Exposition durch Nitrosamine mit der Nahrung, am Arbeitsplatz und in der Umwelt oft unbewusst und unfreiwillig ausgesetzt.

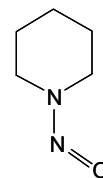
Flüchtige Nitrosamine in Nahrungsmitteln



N-Nitrosodimethylamin
(NDMA)

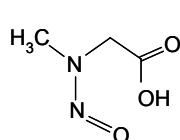


N-Nitrosopyrrolidin
(NPYR)

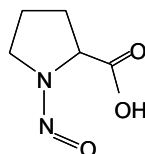


N-Nitrosopiperidin
(NPIP)

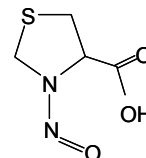
Nichtflüchtige Nitrosamine in Nahrungsmitteln



N-Nitrososarcosin
(NSAR)



N-Nitrosoprolin
(NPRO)



N-Nitrosothiazolin-carbonsäure
(NTCA)

Abbildung 1-12: Flüchtige und nichtflüchtige Nitrosamine in Nahrungsmitteln

Wie in Abbildung 1-12 dargestellt, findet man in Nahrungsmitteln sowohl flüchtige bzw. volatile Nitrosamine (VNA) als auch nichtflüchtige bzw. nonvolatile Nitrosamine (NVNA) [47].

Unter den flüchtigen Substanzen bildet das *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA) den größten Anteil und besitzt zudem das stärkste kanzerogene Potenzial. Von Bedeutung sind ferner *N*-Nitrosopiperidin und *N*-Nitrosopyrrolidin [48,49]. Flüchtige Nitrosamine können sowohl durch Nitrosierung der zugehörigen Amine, aber auch bei der Zubereitung der Nahrungsmittel, in Form von Kochen und Braten, durch thermische Decarboxylierung nichtflüchtiger Nitrosamine entstehen [50]. Die wichtigsten Vertreter der nichtflüchtigen, teils wenig bis nicht kanzerogenen Nitrosamine sind *N*-Nitrososarcosin (NSAR), *N*-Nitrosoprolin (NPRO) und *N*-Nitrosothiazolidincarbonsäure (NTCA). Sie stellen den größten Anteil unter den Nitrosaminen in Lebensmitteln dar [51]. Mit der Nahrung nehmen die Menschen in Westeuropa durchschnittlich 0,5 µg Nitrosamine pro Person und Tag auf [52]. In geräucherten Nahrungsmitteln, gepökeltem Fleisch, getrocknetem Fisch und einigen Meeresfrüchten können besonders hohe Gehalte nachgewiesen werden. Um eine Verringerung der Nitrosaminbildung zu erreichen, wurden Empfehlungen zur Senkung des Nitrit- und Nitratzusatzes zu gepökelten Fleischwaren und der Zusatz von Hemmstoffen wie Ascorbinsäure ausgesprochen [53]. In den 80er Jahren erregte der Nachweis des stark kanzerogenen NDMA in Bier großes Aufsehen. Der Grund für die Bildung des Nitrosamins in ppm-Mengen lag in der Art der Herstellung. Um für die Trocknung von Malz eine höhere Wärmeausbeute zu erzielen, wurde es den NO-haltigen Abgasen des Ölbrenners direkt ausgesetzt. Durch die Umstellung der Trocknung auf indirekte Wärmeübertragung und die Erniedrigung der Temperatur des Ölbrenners konnten die Nitrosamingehalte im Bier minimiert werden [54].

In den 70er Jahren war es üblich, dass bei der Herstellung von Kosmetika Vorstufen verwendet wurden, die zur Bildung flüchtiger Nitrosamine wie NDMA und *N*-Nitrosomorpholin [55] sowie langkettiger *N*-Nitroso-*N*-methylalkylamine führten [56]. Durch Veränderung der Rezepturen und Beimischung von Antioxidantien und Komplexbildnern für Iminiumionen, gelang es die Nitrosaminbelastung durch Kosmetikprodukte seit Anfang der 90er Jahre stark zu reduzieren [57,58]. Auch Arzneimittel können seit den 80er Jahren als Quelle einer exogenen Nitrosaminbelastung weitgehend ausgeschlossen werden [59,60].

Eine weit erheblichere Expositionsquelle für den Menschen stellt der Arbeitsplatz dar. Die relativ hohe Belastung durch meist leichtflüchtige Nitrosamine konnte in den vergangenen 30 Jahren durch Optimierung der Produktionsvorgänge und Einsatz alternativer Substanzen

maßgeblich gesenkt werden. In diesem Zusammenhang wird hauptsächlich die Metallindustrie, die Lederproduktion und Gummiherstellung in den Vordergrund gestellt. In der Metallverarbeitung wurden die zuvor verwendeten Scheideflüssigkeiten aus gelösten sekundären und tertiären Alkanolaminen mit Nitriten als Korrosionsschutz, die 0,2 bis 30 µg/kg *N*-Nitrosodiethanolamin [61] und bis zu 30 µg/kg *N*-Nitroso-5-methyl-1,3-oxazolidin enthielten [62], durch synthetische Flüssigkeiten weitgehend ohne Nitritzusätze ersetzt werden. Man konnte dadurch eine Senkung des Gehaltes an *N*-Nitrosodiethanolamin auf weit unter die zulässigen Grenzwerte in der Luft erreichen [63]. Messungen in einer deutschen Gummifabrik ergaben Werte von 30 bis 120 ng/m³ *N*-Nitrosodiethanolamin und 29 bis 78 ng/m³ *N*-Nitrosodibenzylamin [64]. Dem Problem der Nitrosaminbildung aus Vulkanisierungshilfen hat man in der Gummiindustrie durch die Einführung so genannter "safer amines" Rechnung getragen [65]. Trotzdem wurden gelegentlich in Gummispielzeug, Luftballons, Fleischnetzen und Kondomen hohe Belastungen mit Kanzerogenen und Nitrosaminen gefunden [66-68]. Generell konnten in Deutschland durch die Einführung von maximal zulässigen Konzentrationen von Gefahrenstoffen am Arbeitsplatz und streng geregelten Kontrollen die Arbeitsbedingungen der Mitarbeiter stark verbessert werden. Es gilt ein gesetzlich festgelegter Grenzwert von 1 µg/m³, in besonderen Ausnahmefällen 2,5 µg/m³.

1.3.2. Endogene Nitrosierung

Nitrosamine werden in allen Bereichen des täglichen Lebens vom Menschen aufgenommen. Die Belastung mit Nitrosaminen erfolgt nicht nur aus zahlreichen exogenen Quellen, sondern auch durch endogene Nitrosierung von Vorstufen [51].

Im Organismus selbst besteht zusätzlich die Möglichkeit der endogenen Nitrosierung von Substanzen. Man geht grundsätzlich davon aus, dass sich im Organismus aus Aminen dieselben Nitrosamine bilden, wie sie *in vitro* durch klassische Nitrosierungsmechanismen dargestellt werden können. Das saure pH-Milieu im Magen bietet gute Bedingungen für eine chemische Nitrosierung bei Anwesenheit von Aminen als nitrosierbare Vorstufen und Nitrit oder Stickoxide. Bei einem nüchternen Menschen liegt die durchschnittliche Nitritkonzentration im Magensaft bei pH-Werten unter 5 im Bereich von 0,1 bis 2,6 µM und erreicht bei pH-Werten größer 5 Konzentrationen von 26 bis 54 µM [69]. Bei einem gesunden Organismus wird Nitrit im Magen durch aktive Sekretion von Ascorbinsäure über Redoxreaktionen abgebaut [70,71]. Der größte Anteil des Nitrits im Magen wird in Form von Nitrat mit der Nahrung aufgenommen. Es wird vom Gastrointestinaltrakt resorbiert und zu 25% in den Speichel

abgegeben [72-74]. Dort reduzieren Bakterien der Mundhöhle etwa 20% des Speichelnitrats zu Nitrit, welches mit dem Speichel abgeschluckt wird. Verschiedene Bakterienstämme wie zum Beispiel *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella* und *Pseudomonas* können ebenfalls die Nitrosierung von sekundären Aminen katalysieren [75-78]. Hohe pH-Werte im Magen bieten ideale Wachstumsbedingungen für Darmbakterien wie *Escherichia coli* und *Proteus*, welche in der Lage sind, große Mengen von Nitrat zu Nitrit zu reduzieren und somit enzymatisch die Synthese von Nitrosaminen katalysieren [52].

Diese bakterienvermittelten Nitrosierungsreaktionen können auch bei Blasen- und Harnwegsinfektionen und bei mangelhafter Mundhygiene im oberen Verdauungstrakt eine bedeutsame Nitrosaminexposition zur Folge haben [79]. Auch Entzündungsprozesse fördern die endogene Bildung von Nitrosaminen. Als Reaktion auf die Immunstimulation durch Makrophagen und Neutrophile, bilden Entzündungszellen in Organen mit chronischen Infektionen oder Entzündungen Stickoxide. NO entsteht bei der Sauerstoff- und NADPH-abhängigen Oxidation des endständigen Guanidino-Stickstoffes des L-Arginins zu Citrullin durch das Enzym NO-Synthase und dient dem Organismus als Vasodilatator in Arteriolen und als Neurotransmitter. Da es jedoch im Überschuss produziert wird, reagiert der größte Teil mit dem im Blut gelösten Sauerstoff zu den potenten Nitrosierungsagenzien N_2O_3 und N_2O_4 [80-82].

1.3.3. Entstehung der tabakspezifischen Nitrosamine

Bisher konnten sieben tabakspezifische Nitrosamine (TSNA) im Tabak bzw. Tabakrauch identifiziert werden. Dazu zählen *N*-Nitrosoornicotin (NNN), 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK), 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), *N'*-Nitrosoanatabin (NAT), *N'*-Nitrosoanabasin (NAB), 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol, (*iso*-NNAL) und 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure (*iso*-NNAC) (Abb. 1-13). In den noch grünen, jungen Blättern der Tabakpflanze können TSNA nur in Spuren nachgewiesen werden. Die Bildung von TSNA hängt stark von Anbau, Tabaksorte und Reifung ab. Der größte Teil entsteht während der Trocknung und Fermentierung des Tabaks sowie bei der Alterung der Pflanze [83,84].

Die Nitrosamine NNN, NAB und NAT entstehen durch Nitrosierung der Tabakalkaloide Nicotinin, Anabasin und Anatabin, welche zur Gruppe der sekundären Amine zählen. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass auch die Nitrosierung des tertiärenamins Nicotin Anteil an der Bildung von NNN hat [85]. *Mirvish et al.* [86] geben das Nicotin im Tabak als Hauptquelle des NNN an. Die Nitrosierung von Nicotin-N-oxid zu NNN erfolgt in

kleinerem Ausmaß [87]. Trotz der jahrzehntelangen Forschung an TSNA wurde das Myosmin als NNN-Quelle nicht erkannt. Erst mit dem Nachweis, dass Myosmin ebenso wie das Nornicotin leicht zu NNN nitrosiert werden kann [44], erweiterte sich das Spektrum der Nitrosierungsvorstufen, nicht nur auf tabakspezifische Alkaloide, sondern mit Myosmin auf ein Alkaloid, welches in vielen Nahrungsmitteln gefunden wurde.

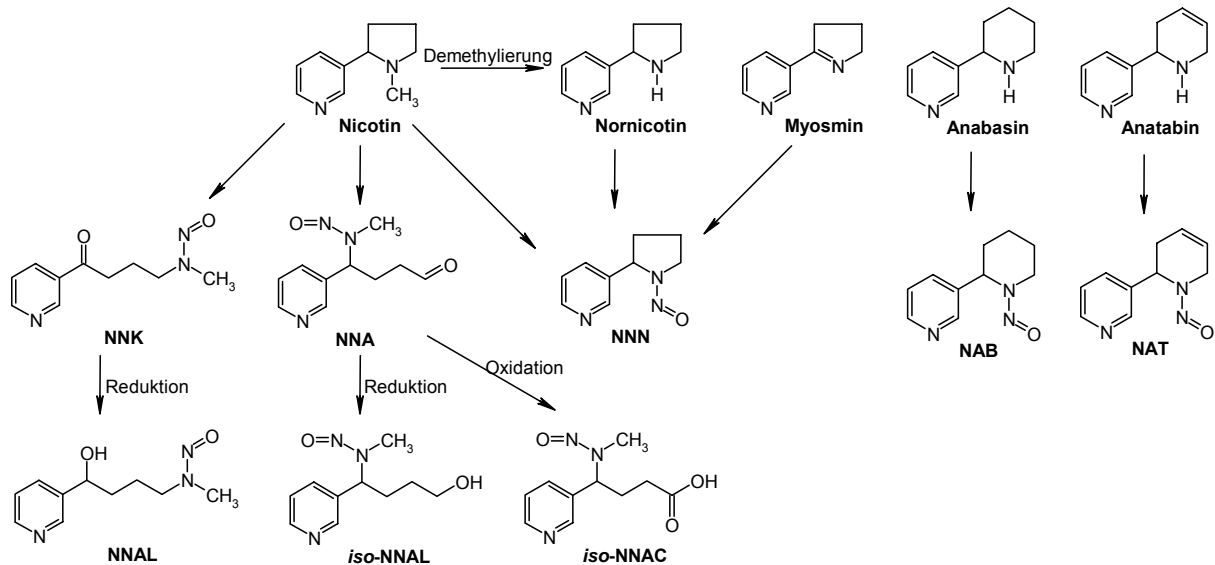


Abbildung 1-13: Bildung der TSNA (in Abwandlung nach Hoffmann et al. [88])

Den Hauptentstehungsweg von NNK bildet vermutlich der mikrobielle Abbau von Nicotin-N-oxid zu Pseudooxynicotin, welches schnell und irreversibel zu NNK nitrosiert wird [89]. Durch enzymatische Reduktion der Ketogruppe entsteht aus NNK ein weiteres Nitrosamin, das NNAL, welches vereinzelt im Tabak nachgewiesen wurde. Dagegen wurde NNA als bisher einziges tabakspezifisches Nitrosamin nicht im Tabak oder Tabakrauch identifiziert. Aufgrund der hohen Reaktivität der Aldehydgruppe wird eine schnelle Weiterreaktion zu *iso*-NNAC oder *iso*-NNAL vermutet [88].

Der Gehalt an Nitrosaminen ist zum einen von der Alkaloid- und Nitratkonzentration in den Tabakblättern abhängig, zum anderen wird er von den Prozessbedingungen der verschiedenen Herstellungsstufen beeinflusst [7,90,91]. Der Nicotiningehalt in Tabakblätter beträgt in etwa 1 bis 8%, in wenigen Fällen bis zu 15%, der Anteil an Nitrosaminen im Tabak ist um das 3000 bis 300000-fache kleiner.

Tabelle 1-4: Toxische Substanzen im Hauptstromrauch von Filterzigaretten unterschiedlichen Teergehalts und filterlosen Zigaretten (modifiziert nach [92])

Verbindung	Repräsentativer Bereich für den US Markt ^a			FF ohne Filter ^b
	FF	FFLT	ULT	
NNN (ng/Zig.)	93-191	53-142	18-96	200-3000
NNK (ng/Zig.)	99-212	62-115	13-83	80-770
NAT (ng/Zig.)	108-235	73-159	25-110	k. A.
Teer (mg/Zig.)	12,9-17,2	8,1-11,6	0,7-7,2	15-40 (TPM)
Nicotin (mg/Zig.)	0,79-1,39	0,60-0,94	0,11-0,59	1,0-2,3
Benzo[a]pyren (ng/Zig.)	8,0-10,0	5,2-7,5	0,79-5,49	20-40

^a Zigaretten von 29 handelsüblichen Marken wurden 1995 auf dem US-Markt erworben und die Gehalte im Hauptstromrauch nach Abrauchen unter Standardbedingungen (35 ml Zugvolumen in 2 Sekunden, 1 Zug/Minute, bis 3 mm vor Beginn des Filters) bestimmt. Die Einteilung in drei Gruppen erfolgte nach den Teergehalten in FF = full flavor, FFLT = full flavor low tar und ULT = ultra low tar.

^b Angaben für „full flavor“ Zigaretten aus dem IARC Monograph Vol. 38 [15]; TPM = total particulate matter, k. A. = keine Angabe

Besonders hohe Nitrosamingehalte findet man im Schnupftabak, da sich die höheren Temperaturen während der Fermentation günstig auf deren Bildung auswirken [93]. Die Annahme, dass durch Pyrolyse, also das Verbrennen des Tabaks beim Rauchen, TSNA entstehen [94,95] konnte durch *Fischer et al.* [96] größtenteils widerlegt werden. Der überwiegende Teil der TSNA im Hauptstromrauch ist bereits schon im Tabak vorhanden. In Tabelle 1-4 sind die Konzentrationen der wichtigsten TSNA und weitere Giftstoffe im Hauptstromrauch der heute am meisten in den USA verkauften Zigaretten den filterlosen Zigaretten gegenüber gestellt. Im Hauptstromrauch gängiger Zigarettenmarken sind 19-135 ng NNN, 21-110 ng NNK und 18-155 ng NAT und NAB enthalten. Während flüchtige Nitrosamine in der Gasphase des Tabakrauches enthalten sind, werden TSNA hauptsächlich an Rauchpartikel gebunden. Geht man davon aus, dass ein Raucher mit einem Zigarettenkonsum von 20 Zigaretten am Tag durch die Inhalation des Rauches etwa 70% der gebundenen TSNA aufnimmt, so ist er einer Belastung von etwa 3,0 µg/d TSNA und 0,4 µg/d flüchtiger Nitrosamine ausgesetzt [13,14,51]. Die exogene Nitrosaminbelastung des Nichtraucher von circa 0,5 µg/d setzt sich aus Nahrungsmittel (72%), Beruf (25%), Zigarettenrauch (2%) und sonstige, wie zum

Beispiel Kosmetika und Luftverschmutzung (1%) zusammen. Ein Vergleich von exogener Exposition und der Ausscheidung von Nitrosaminen und deren Abbauprodukte beim Menschen, lässt auf eine endogene Bildung von 45 bis 75% der gesamten Nitrosaminbelastung rückschließen [51].

1.3.4. Gefahrenpotenzial der Nitrosamine

Seit der Entdeckung der kanzerogenen Eigenschaften des *N*-Nitrosodimethylamins [97] wurde in zahlreichen Tierversuchen belegt, dass fast alle Nitrosamine kanzerogen sind. 90% der bisher über 300 untersuchten Nitrosamine erzeugen Krebs, wobei sie sich durch große Unterschiede in der Stärke der Kanzerogenität auszeichnen. Bei Nagern induzieren sie überwiegend Tumoren in Leber, Ösophagus, Nasen- und Mundschleimhaut, Niere, Pankreas, Harnblase, Lunge und Schilddrüse.

Die kanzerogene Wirkung der Nitrosamine beruht in erster Linie auf ihrer Fähigkeit DNA-Addukte zu bilden und damit die erste Stufe der Kanzerogenese, die Initiation auszulösen. Um ihr kanzerogenes Potenzial entfalten zu können, bedürfen alle Nitrosamine einer metabolischen Aktivierung, die meist über eine durch Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) vermittelte α -Hydroxylierung erfolgt (Abb. 1-14).

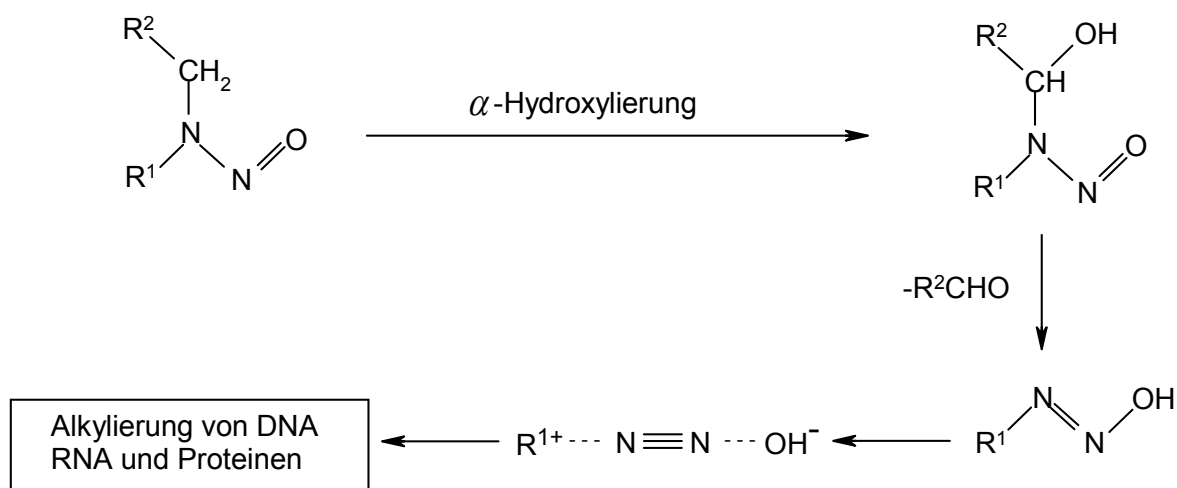


Abbildung 1-14: Mechanismus der Adduktbildung durch Nitrosamine (am Beispiel von NDMA)

Deutliche Unterschiede bezüglich der metabolischen Aktivierung der einzelnen Nitrosamine zeigt die große Gruppe der Cytochrom P450 Isoenzyme. Häufig existiert für ein bestimmtes Nitrosamin ein Isoenzym mit besonders hoher Affinität und einige mit wesentlich geringerer Wirkung. Die gewebespezifische Aktivität der CYP Isoenzyme kann zum Teil die unterschiedliche Organspezifität der Nitrosamine bei der Tumorbildung erklären, die unabhängig vom Ort der Applikation auftreten [80]. Die α -Hydroxylierung führt zu einem instabilen α -Hydroxynitrosamin, das unter Protonenwanderung und Abspaltung eines Aldehyds zum Diazohydroxid reagiert. Dieses ultimale Kanzerogen kann unter Stickstoff-Abspaltung DNA, RNA und Proteine alkylieren oder durch Hydrolyse Alkohol bilden.

Die Wichtigkeit der α -Hydroxylierung für die metabolische Aktivierung und die daraus resultierende kanzerogene Wirkung wird besonders deutlich, wenn man Nitrosamine mit sterisch gehindertem α -C-Atom betrachtet. Während eine Methyl-Substitution in α -C-Position bereits eine verringerte Kanzerogenität bewirkt, ist die sterische Hinderung durch eine tertiäre Butylgruppe wie bei *N*-Nitroso-*N*-methyl-tert-butylamin so stark, dass keine Aktivierung mehr stattfinden kann und das Nitrosamin nicht mehr kanzerogen ist [52]. Die akute Toxizität der Nitrosamine variiert stark und korreliert nicht mit der kanzerogenen Potenz. Mit einem LD₅₀-Wert von 18 ng/kg Körpergewicht ist *N*-Nitroso-*N*-methylbenzylamin für die Ratte das am stärksten toxische Nitrosamin. Im Gegensatz dazu übersteigt die LD₅₀ für das starke Leberkarzinogen *N*-Nitrosodiethylamin einen Wert von 7500 mg/kg KG.

1.4. *Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins NNN*

Im Tierversuch erwies sich das tabakspezifische Nitrosamin NNN neben NNK als stärkstes Kanzerogen. Nach der Aufnahme in den Organismus erfolgt eine schnelle Verteilung und Elimination. Autoradiographische Studien zeigten eine Anreicherung von NNN in Nase, Speicheldrüse und melaninhaltigem Gewebe [98-101]. Der erste Schritt auf dem Weg zum Kanzerogen im Organismus besteht in der metabolischen Aktivierung des NNN. Die maßgebliche Reaktion beruht auf der Bildung des ultimalen Kanzerogens aus dem Präkanzerogen mittels α -Hydroxylierung. Daneben finden jedoch noch diverse andere Reaktionen statt. Einen Überblick liefert Abbildung 1-15, welche Ergebnisse aus verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien zur Aufklärung des NNN-Metabolismus darstellt.

Betrachtet man den Metabolismus von NNN, so existieren im wesentlichen vier Hauptreaktionswege: Die Pyridin-*N*-Oxidation, die α - sowie die β -Hydroxylierung des Pyrrolidin-

rings und die Bildung von Nornicotin [102]. Der größte Teil der NNN-Metaboliten wird mit dem Urin ausgeschieden. Daneben findet sich auch ein kleiner Betrag an unverändertem NNN [103-105]. Bisher liegen allerdings keine Informationen zu NNN und seinen Metaboliten in menschlichem Urin vor [102].

Pyridin-N-Oxidation: Im Urin von Ratten erscheint das *N*-Oxid des NNN zu 7 bis 11% der verabreichten Dosis. Es existieren keine größeren Unterschiede in der Exkretion des *N*-Oxids zwischen Ratte, Hamster und Maus [106]. Die Präsenz des aus NAB resultierenden *N*-Oxids im Rattenurin liegt mit 30% der gegebenen NAB-Dosis deutlich höher [105]. Da die *N*-Oxide Entgiftungsprodukte darstellen, könnte dies eine Erklärung für die geringere Kanzerogenität des NAB gegenüber dem NNN sein.

α- und β-Hydroxylierung: Während die Metaboliten der β-Hydroxylierung, 3-Hydroxy-NNN und 4-Hydroxy-NNN, nur in Spuren im Urin nachgewiesen werden, stellen 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-1-butansäure (Ketosäure) und 4-Hydroxy-4-(3-pyridyl)-1-butansäure (Hydroxysäure), die Endprodukte der α-Hydroxylierung und zugleich die Hauptmetaboliten des NNN dar, wie in diversen Studien unter anderem an Ratten und Syrischen Goldhamstern gezeigt werden konnte [103,107]. Als Zwischenprodukte lassen sich zusätzlich 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB), 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanol (Diol) und 5-(3-Pyridyl)-tetrahydrofuran-2-on (Lacton) im Urin nachweisen, wogegen 5-(3-Pyridyl)-2-hydroxytetrahydrofuran (Lactol) ausschließlich bei *in vitro* Versuchen auftritt.

Norcotinin: Dieser Metabolit wird im Urin von NNN-behandelten Ratten und Minischweinen gefunden [106,108]. Die nahe liegende Bildung über Denitrosierung und anschließende Oxidation von NNN konnte jedoch ausgeschlossen werden und so sind weitere Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus nötig.

Als weitere Metaboliten von NNN werden auch Myosmin und *iso*-Myosmin angegeben. Mechanismus und Ausmaß der Bildung dieser Metaboliten ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Im Urin von Patas-Affen konnten nach intravenöser Applikation von NNN Hydroxysäure und Norcotinin als Hauptmetaboliten nachgewiesen werden. Daneben wurden Ketosäure, Norcotinin-1-*N*-oxid, 3'-Hydroxynorcotinin und dessen *O*-Glucuronid, 3'-(*O*-β-D-glucopyranuronosyl)hydroxynorcotinin sowie nicht metabolisiertes NNN im Urin identifiziert [109].

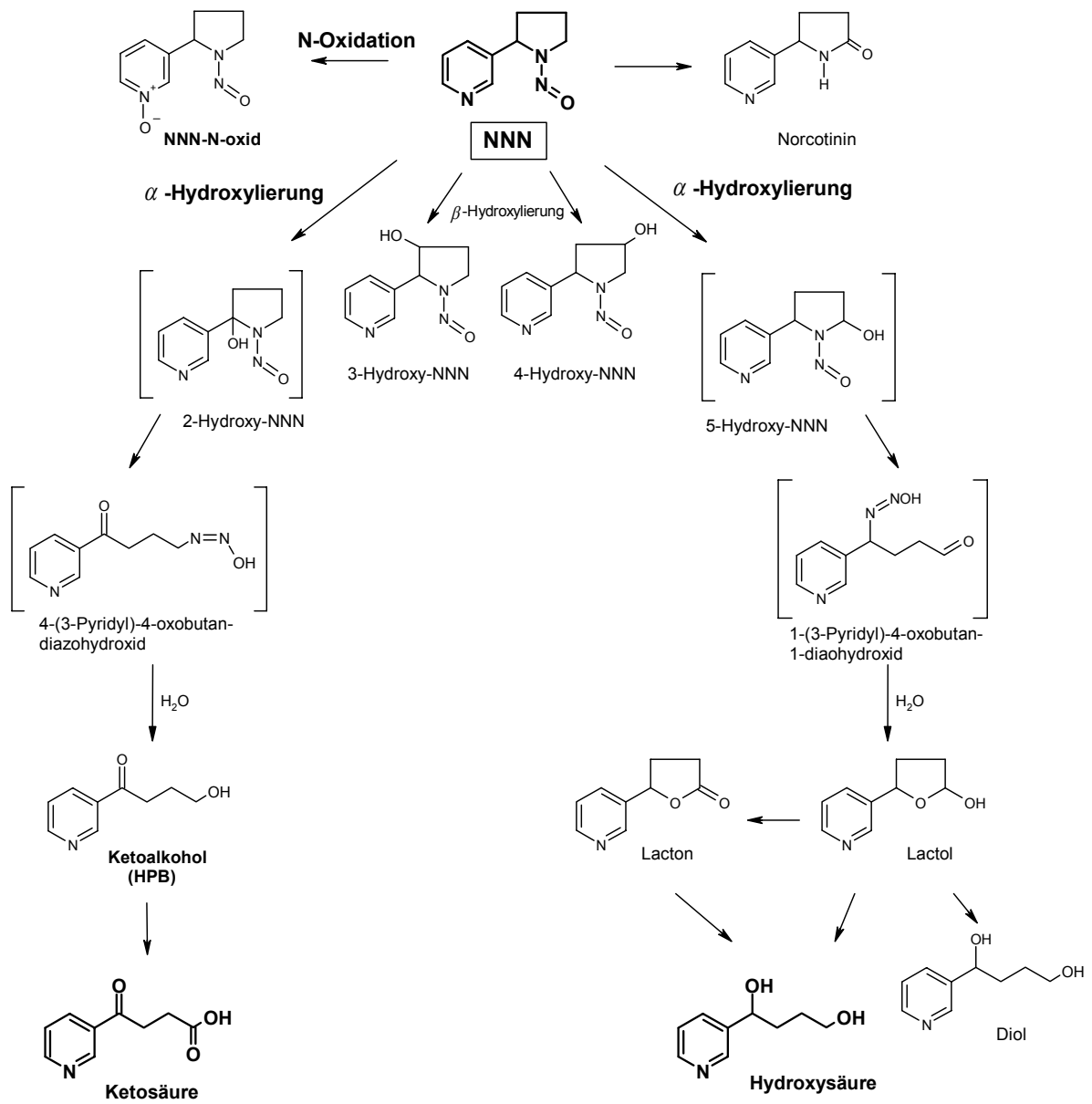


Abbildung 1-15: Die wichtigsten Abbauege im Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins NNN (in Anlehnung an [102])

1.4.1. Enzymatische Systeme zur Metabolisierung

Enzym polymorphismus beschreibt das Auftreten genetisch bedingter, biochemisch unterscheidbarer Varianten von Enzymen. Dabei unterscheiden sich polymorphe Enzyme vor allem hinsichtlich der durch die Michaelis-Menten-Konstante charakterisierten Umsatzgeschwindigkeit, nicht jedoch in Hinblick auf Substratspezifität oder Produkt.

In molekularepidemiologischen Studien konnten mehrere Enzym polymorphismen mit Lungenkrebs in Verbindung gebracht werden. Dies konnte insbesondere für die Isoformen der Phase I Enzyme CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 und CYP2E1 sowie für die Phase II

Enzyme GSTM1, GSTM3, GSTP1 und GSTT1, wie auch NAT1 und NAT2 beobachtet werden [110]. Während für aromatische Amine der Einfluss von CYP1A2, N-Acetyltransferase 1 (NAT1) und 2 (NAT2) und der Glutathiontransferase (GST) auf Hämoglobinaddukte von 3- und 4-Aminobiphenyl gezeigt werden konnte [111], sind vergleichbare Zusammenhänge für NNN weit weniger gesichert. Bisher konnte für CYP2A6 der mögliche Einfluss auf den NNN-Metabolismus in der Nasenschleimhaut der Ratte gezeigt werden [112]. In Bakterien, die humane Isoenzyme der CYP Reihe exprimieren, hatte neben CYP2A6 auch CYP2A2 eine signifikante Aktivität im NNN-Metabolismus [113,114]. Auch *Patten et al.* [115] konnten einen gesicherten Nachweis über die Beteiligung von CYP 2A6 an der 5'-Hydroxylierung von NNN erbringen, während CYP3A4 vorrangig an der 2'-Hydroxylierung beteiligt ist. Ein Einfluss von CYP2E1 zeigte sich ebenfalls für humanes Lebergewebe [116]. Während für CYP2E1 und CYP3A4 in Metabolismusstudien zur α -Hydroxylierung von NNN in Mikrosomen aus humanen Ösophagusproben bestätigt werden konnte, wurde CYP2A6 in diesem Fall ausgeschlossen [117,118].

1.5. Organspezifität der NNN-Tumoren

Bei der Betrachtung der Organspezifität bezüglich der Tumorigenese von TSNA muss zwischen den untersuchten Spezies, den Dosierungen und dem untersuchten Nitrosamin unterschieden werden, da es sonst leicht zu Fehlinterpretationen kommen kann. Tabelle 1-5 stellt Zielorgane von NNN und NNK in Abhängigkeit des untersuchten Rattenstamms und der Applikationsart dar. Eine Übersicht aller Tumorexperimente mit NNN gibt Tabelle 1-6.

Tabelle 1-5: Organotropie von NNN und NNK in Ratten (aus Hecht [102])

Nitrosamin	Rattenstamm	Applikation	Zielorgan
NNN	F-344	oral	Ösophagus, Nase
		subkutan	Nase
		Schlündeln	Ösophagus
	Sprague-Dawley	oral	Nase
NNK	F-344	oral	Lunge, Leber, Nase, Pankreas
		subkutan	Lunge, Leber, Nase
		oral	Lunge, Leber, Nase
		intravasal	Lunge, Leber

Tabelle 1-6: Organspezifische kanzerogene Wirkung von NNN

Stamm (Sex)	Dosis, Intervall, Dauer	Applikation	BZ (Mo)	Tumorzinzidenz in Organen/Geweben (Tiere mit Tumoren/Tiere gesamt)	Lit.
Ratte					
F-344 (m)	1,1 mM; 5x/Wo, 30 Wo	TriWa	11	Ösophagus (12/20) Nasenhöhle (3/20)	[119]
SD (w)	2 mM; 5x/Wo, 44 Wo	TriWa	11,5	Adenokarzinom d. olfaktorischen Epithels der Nasenhöhle (15/15)	[120]
F-344 (m+w)	60 µM/Tier, 3x/Wo, 20 Wo	s.c.	12	Nasenhöhle (maligne) m (10/12), w (7/12)	[121]
F-344 (m+w)	56 µM/Tier, 3x/Wo, 14 Wo	s.c.	21	Nasenhöhle m (15/15), w (14/15)	[122]
F-344 (m+w)	17/50/150 µmol/kg, 3x/Wo, 20 Wo	s.c.	30	Nasenhöhle m (12/14; 11/15; 15/27), w (15/15; 9/15; 12/27) Ösophagus m (0/14; 4/14; 5/15), w (0/15; 3/15; 2/15)	[123]
F-344 (m)	56 µmol/kg, 3x/Wo, 27 Wo 1 mmol/Tier, 27 Wo	s.c. Futter	22,5 22,5	Nasenhöhle (24/30) Nasenhöhle (18/30); Ösophagus (25/30)	[124]
BDVI (m+w)	1,7/5,6/17 µM/Tier, 2x/Wo, 78 Wo	p.o.	30	Nasenhöhle m (5/25, 17/25, 20/25), w (6/25, 18/25, 22/25)	[125]
F-344 (m)	33,3 mmol/kg, 3x/Wo, 4 Wo	p.o.	14	Ösophagus 14/40 Nasenhöhle 7/40	[126]
Maus					
CB (m+w)	11,3 µmol/Tier, 1x/Wo, 41 Wo	i.p.	11	Lunge (8/40)	[127]
Swiss (w)	0,17 µmol/Tier, 3x/Wo, 50 Wo	dermal	50	keine Tumoren	[128]
A/J (w)	5,5 µmol/Tier, 3x/Wo, 7,3 Wo	i.p.	9	Lunge (16/25)	[129]
A/J (w)	5,5 µmol/Tier, 3x/Wo, 7,3 Wo	i.p.	9	Lunge (16/24)	[130]
CFLP (w)	0,007/0,28/1,13 µmol/Tier, 2x/Wo, 104 Wo	dermal	26	keine Hauttumoren	[131]
Sencar (w)	2,8 µmol/Tier, jeden 2. Tag, 20 Tage	dermal	5	Haut (1/27)	[132]
A/J (w)	4,8 µmol/Tier, 3x/Wo, 7 Wo	i.p.	9	Lunge (25/30)	[133]
Swiss (w)	5,6 µmol/Tier, 3x/Wo, 7,3 Wo	auf die Zunge	22	Lunge (10/27) Vormagen (7/27)	[134]
BALB/c (m)	5,6 µmol/Tier, 3x/Wo, 7,3 Wo	auf die Zunge	22	Lunge (11/26) Vormagen (8/26)	[134]
A/J (w)	1,9 µmol/Tier, 3x/Wo, 7 Wo 9,5 µmol/Tier, 3x/Wo, 7 Wo	i.p.	7,5	Lunge (13/30) Lunge (24/30)	[135]
Syrischer Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)					
(m+w)	28 µmol/Tier, 3x/Wo, 25 Wo	s.c.	20	Trachea m (6/10), w (7/9) Nasenhöhle m (1/10), w (0/9)	[85]
(m)	13/27 µmol/Tier, 3x/Wo, 25 Wo	i.p.	18	Trachea (4/21, 9/21) Nasenhöhle (1/21, 5/21)	[136]
(m+w)	12/48 µmol/Tier, 3x/Wo, 6,3 Wo	s.c.	17	Trachea m (3/14, 0/9), w (2/15, 1/9) Lunge w (1/14, 1/9)	[107]
(m)	0,90 mM/Tier, 31 Wo	TriWa	20	Trachea (2/20), Nasenhöhle (4/20)	[137]

Fortsetzung von Tabelle 1-6

(m)	0,028 µmol/Tier, 3x/Wo, 13 Monate	Backen- tasche	13	Backentasche, Hyperplasie (3/10)	[138]
(m+w)	0,056 mmol/Tier, 3xWo, 16 Wo	Backen- tasche	4	Backentasche m+w Hyperplasie (3/4), Dysplasie (1/4)	[139]
(m+w)	0,56 mmol/Tier, 5x/Wo, 24 Wo	Backen- tasche	6	Backentasche m+w Dysplasie (7/7)	[140]
Nerz (<i>Mustela vison</i>)					
(m+w)	12 mmol/Tier, 2x/Wo, 38 Wo	s.c.	42	Nase m (6/7) w (13/13) Gehirn m (1/7) w (13/13)	[141]
(m+w)	213 µmol/Tier, 2x/Wo, 28 Wo	s.c.	36	Nase m (2/2) w (3/3) Gehirn m (1/2) w (2/3)	[142]

p.o., per os mit Schlundsonde; TriWa, per os über das Trinkwasser; s.c., subcutane Injektion; i.p., intra-peritoneal; Wo, Wochen; BZ, Beobachtungszeitraum in Monaten; SD, Sprague-Dawley; CB, Chester Beatty;

NNN und NNK wirken systemisch, also unabhängig von der Applikationsart [102,143]. Man kann hinsichtlich der Tumorbildung für NNN und NNK eine klare Organspezifität feststellen. Während die Lunge als Zielorgan bei der Krebsinduktion durch NNK in allen Spezies fungiert, ist dies für NNN nur bei Mäusen der Fall [102]. Dagegen werden die nach NNN-Gabe bei Ratten hauptsächlich beobachteten Ösophagustumoren von NNK nicht ausgelöst [119,137]. Die relative Häufigkeit der durch NNN induzierten Ösophagus- und Nasenraumtumoren jedoch steht in Abhängigkeit von der Applikationsart des Nitrosamins. So wurden in Studien mit F344-Ratten, welche NNN über das Trinkwasser erhielten, in etwa zu gleichen Teilen Ösophagus- und Nasenraumtumoren diagnostiziert [124]. Die subkutane Injektion von NNN bei Ratten verursachte zu einem überwiegenden Teil Nasenraumtumoren, daneben in geringerem Maß Tumoren im Ösophagus [121,123]. Wird Ratten dagegen NNN über eine Schlundsonde verabreicht, entwickeln sich hauptsächlich Tumoren im Nasenraum, ähnlich wie bei der subkutanen Applikation [125]. Sowohl die Nasenschleimhaut, als auch der Ösophagus sind in der Lage, NNN metabolisch zu aktivieren, DNA-Addukte konnten in beiden Gewebearten festgestellt werden. Autoradiographische Studien belegen, dass nach intravenöser Applikation NNN in beiden Geweben gebunden vorliegt, wobei die Konzentration in der Nasenschleimhaut gegenüber dem Ösophagusgewebe deutlich höher liegt [98,99]. Möglicherweise führt der direkte Kontakt mit dem Kanzerogen über das Trinkwasser dazu, dass der Ösophagus als Zielorgan besser erreicht wird, als durch die subkutane oder intra-gastrale Applikation. Während sich NNN beim Hamster als relativ schwach wirksames Kanzerogen zeigte, erzeugte es bei Nerzen mit hoher Inzidenz Tumoren in der Nase und dem basalen Vorderhirn.

1.6. **Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese**

Als chemische Kanzerogenese bezeichnet man die Entstehung benigner (gutartiger) und maligner (bösartiger) Tumoren unter Einwirkung von Chemikalien. Spricht man von Kanzerogenen, sind per Definition Stoffe gemeint, die in einem geeigneten Tierversuch:

- die Inzidenz spontaner Tumoren erhöhen
- die Latenzzeit bis zum Auftreten solcher Tumore verkürzen
- Tumoren in anderen Geweben erzeugen
- die Zahl der Tumoren pro Tier erhöhen

Gutartige Tumoren wachsen verdrängend und bleiben meist auf ihren Ursprungsort begrenzt, wohingegen bösartige Tumoren infiltrierend in die Nachbarschaft dringen, dort umgebendes Gewebe zerstören und auch Metastasen (Absiedelungen) bilden können.

Das Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese (Abb. 1-16) beschreibt die heute vertretene Theorie zur Entwicklung von Tumoren durch chemische Krebsrisikofaktoren. Die Mehrheit der Kanzerogene, so genannte Präkanzerogene, bedarf einer metabolischen Aktivierung im Organismus, um ihr tumorerzeugendes Potenzial entfalten zu können. Das entstandene ultimale Kanzerogen ist somit in der Lage, kovalent an DNA, RNA, Proteine und andere Zellbestandteile zu binden, was zu einer bleibenden Veränderung an der DNA führt, auch wenn das Kanzerogen nur kurzzeitig wirksam war (Initiation). Entgeht die Veränderung der zelleigenen Reparatur, überträgt sie sich auf die Tochterzelle und der DNA-Schaden wird weitervererbt. Die Auswirkung des Kanzerogens auf die Effizienz der malignen Transformation kann durch Promotoren unterstützt oder verstärkt werden. Promotoren wirken proliferationssteigernd und erhöhen so die Wahrscheinlichkeit für das Ablesen des geschädigten DNA-Teils. Im Unterschied zu den Kanzerogenen müssen die Promotoren meistens eine Wirkungsschwelle überschreiten. Hier reicht eine einmalige Exposition in der Regel nicht aus. Die transformierte Zelle (Tumorzelle) stellt den Ausgangspunkt der nach einer unterschiedlich langen Latenzzeit einsetzenden klonalen Expansion dar. Die in der Folge auftretenden mikroskopisch kleinen Tumorherde durchlaufen dann das Stadium der Progression und schließlich der Invasion und Metastasierung.

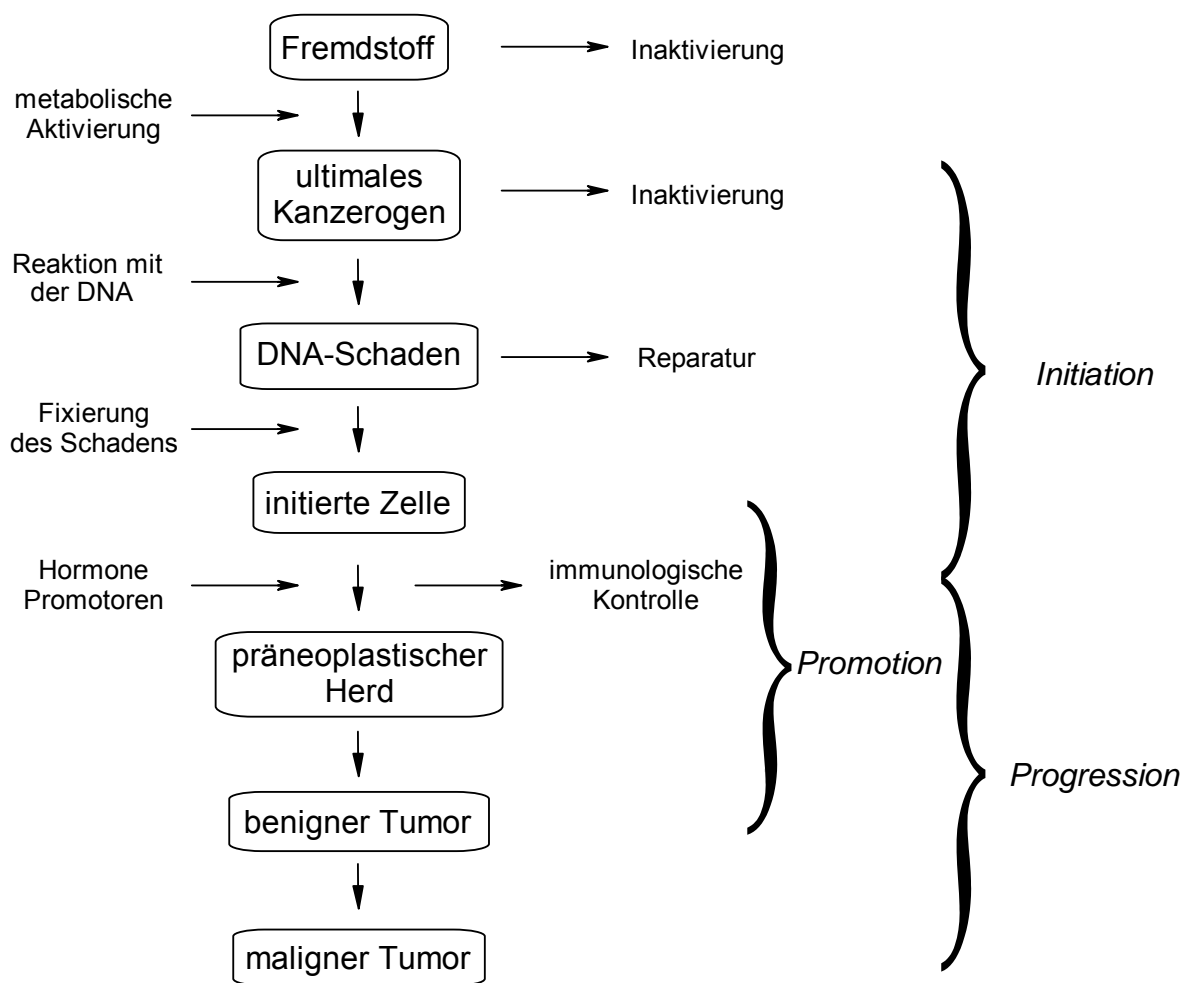


Abbildung 1-16: Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese

Man muss sich jedoch klar machen, dass dieses Schema eine starke Vereinfachung darstellt und die biologische Vielfalt des Tumorgeschehens viele andere Möglichkeiten offen lässt. So führen starke Kanzerogene wie z.B. NDMA, NNK, bestimmte PAK und aromatische Amine auch ohne Promotoren direkt zu Tumoren. Dabei kann auch eine einzige Dosis ausreichen. Andererseits sind die Möglichkeiten der Initiation so vielfältig und ihre Ursachen oft noch unbekannt, dass unter Bedingungen einer stark promovierenden Behandlung bzw. bei chronischen Entzündungen Tumoren entstehen, ohne dass eine bewusste Initiation stattgefunden hat. So ist z.B. das stark promovierende TCDD, das so genannte Sevesogift, das stärkste Kanzerogen im Tierversuch, obwohl es nachweislich keine genotoxische Wirkung besitzt. In diesem Fall bedient man sich des Begriffs der "epigenetischen Kanzerogenese". Im übrigen zeigt das Vorhandensein von DNA- und Hb-Addukten bei unbehandelten Ratten, dass hier Belastungen

hinsichtlich einer Initiation auch bei unbehandelten Tieren vorliegen, die das beim Raucher bestimmte Ausmaß bei weitem überschreiten. Dies wurde im eigenen Arbeitskreis für 4-ABP-Addukte [144] und für HPB absplattende Addukte gezeigt [46].

1.7. Chemoprävention der NNN-Tumoren

Nach *Smith et al.* [145] gibt es zwei grundsätzliche Strategien der Chemoprävention von Tumoren, die Blockierung und die Suppression (Abb. 1-17). Diese Klassifizierung orientiert sich am Mehrstufenmodell der Kanzerogenese. Während blockierende Substanzen die Initiation verhindern, verzögern suppressierende Substanzen die Promotion und die Progression von Tumoren. Unter Chemoprävention wird die vorbeugende Gabe von chemischen Substanzen in Form von definierten Pharmaka oder als Bestandteile von Naturstoffen verstanden, um die Entstehung von Krebs zu verhindern oder zu verzögern.

Seit den ersten wegweisenden Untersuchungen von *Wattenberg* [146] sind abertausende Versuche zur Chemoprävention durchgeführt worden. Bei den TSNA standen hier zwei Strategien im Vordergrund. Einmal sollte die Aktivierung dieser Verbindungen verhindert und damit Möglichkeiten aufgezeigt werden, wie man evtl. beim Raucher die Tumorentwicklung durch TSNA minimieren kann. Zum anderen dienen die TSNA als experimentelles Werkzeug mit dem reproduzierbar bestimmte Tumoren, z.B. Lungentumoren durch NNK und Ösophagustumoren durch NNN, erzeugt werden können. An diesen Tumormodellen können therapeutische oder präventive Strategien zur Tumorsupprimierung untersucht und entwickelt werden. Aufbauend auf der Erforschung der am Nitrosaminstoffwechsel beteiligten Enzyme und Enzymsysteme wurden in den vergangenen Jahren therapeutische Ansätze entwickelt, um durch gezielte Hemmung derjenigen P450 Isoenzyme, die für die α -Hydroxylierung und somit für die Entstehung der kanzerogenen Metabolisierungsprodukte verantwortlich sind, die Initiation teilweise oder ganz zu blockieren. Ergebnisse aus einer Vielzahl an Studien über die erfolgreiche Hemmung des NNK Metabolismus sollten zur Ausweitung auf weitere tabak-spezifische Nitrosamine, wie dem NNN hinführen. Bisher gibt es nur wenig Arbeiten über die Chemoprävention des NNN-Metabolismus, weshalb im Folgenden hauptsächlich auf Ergebnisse bezüglich des NNK eingegangen wird.

Die Untersuchung von Stoffen mit chemopräventiver Wirkung befassen sich sowohl mit speziell entwickelten chemischen Verbindungen, als auch mit natürlichen Substanzen und Pflanzeninhaltsstoffe. Den Isothiocyanaten, welche unter anderem in Kohlgemüse und Brunnenkresse vorkommen, konnte in zahlreichen Studien ein großes chemopräventives

Potenzial nachgewiesen werden [147,148]. Abbildung 1-18 veranschaulicht die Entstehung von Isothiocyanaten aus dem Abbau von Glucosinolaten. Das Enzym Myrosinase ist in der Pflanze selbst enthalten und wird beim Zubereiten bzw. beim Kauen freigesetzt.

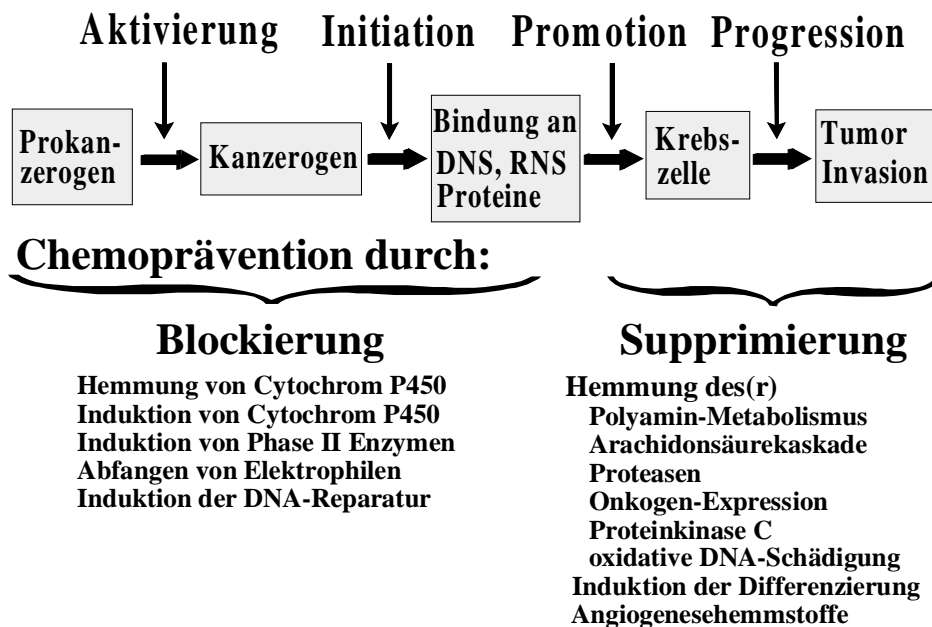
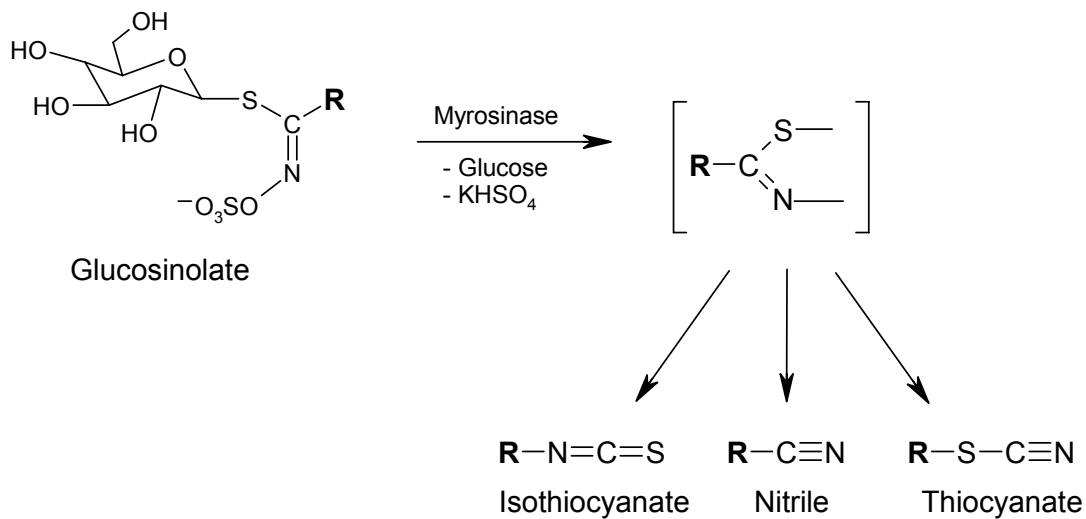


Abbildung 1-17: Möglichkeiten der Chemoprävention, dargestellt am Mehrstufenmodell der Kanzerogenese

Die Behandlung mit natürlich vorkommenden Isothiocyanaten hat nicht nur positive Effekte auf das Tumorgeschehen gezeigt. Erste Untersuchungen mit Phenethylisothiocyanat (PEITC), das aus Gluconasturtiin entsteht (Abb. 1-18), zeigten an NNK-behandelten Ratten zwar eine eindeutige Hemmwirkung auf den Lungenkrebs, dagegen war die Inzidenz von Pankreastumoren erhöht. Der Effekt war jedoch wegen der geringen Tierzahl nicht statistisch abzusichern [149]. Angesichts des extrem seltenen Auftretens spontaner Pankreastumoren bei diesem Rattenstamm gibt dieses Ergebnis doch Anlass zur Besorgnis. Unter gleichen Bedingungen zeigte Sinigrin, welches Allylisothiocyanat freisetzt (Abb. 1-18), keine Hemmwirkung auf NNK-induzierte Lungentumoren, erhöhte aber die Inzidenz von Pankreastumoren signifikant [150]. Diesen Effekten wurde aber nicht weiter nachgegangen und in der Folge wurden überwiegend Tumorexperimente mit der A/J-Maus durchgeführt, die bereits ohne Behandlung ein relativ hohes Lungenkrebsrisiko besitzt, deren Eignung als Modell für den Lungenkrebs des Menschen aber nicht unumstritten ist. So stehen der eindeutigen Hemmwirkung durch PEITC gegenüber TSNA negative Ergebnisse im A/J Maus-Modell gegenüber, in dem durch Belastung mit Tabakrauch vermehrt Lungentumoren ausgelöst werden [151,152]. *Witschi et*

al. [23] konnten auch zeigen, dass eine deutliche Reduktion von TSNA durch Filterung des Tabakrauchs keinerlei Einfluss auf die kanzerogene Wirkung hatte. Die Bedeutung von TSNA und anderer ebenfalls reduzierter Rauchinhaltsstoffe wie Benzo[a]pyren wird von diesen Versuchen stark in Frage gestellt. In diesem Zusammenhang muss aber nochmals einschränkend darauf hingewiesen werden, dass dieses A/J Maus-Modell nicht unbedingt die Verhältnisse beim Raucher korrekt widerspiegelt. Weitere negative Eigenschaften von PEITC zeigten sich im Tumormodell der Blasenkanzerogenese in Ratten. Nach Initiation mit *N*-Nitrosobutyl-(4-hydroxybutyl)amin wirkte PEITC als starker Promotor. PEITC hatte aber auch ohne Nitrosaminbehandlung ein gewisses eigenständiges kanzerogenes Potenzial [153].



Rest:

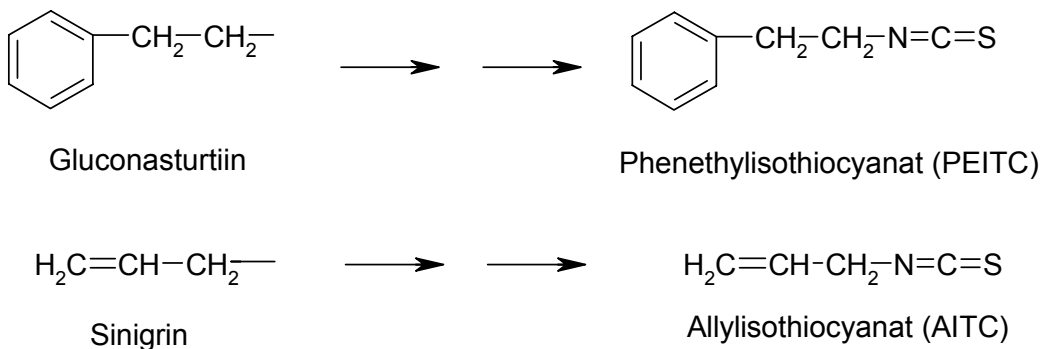


Abbildung 1-18: Bildung von Isothiocyanaten aus ihren Vorstufen

PEITC hemmt nachweislich die α -Hydroxylierung der durch NNK induzierten metabolischen Aktivierung, über kompetitive und nicht kompetitive Mechanismen [154]. Zur Optimierung der Chemoprävention durch Isothiocyanate wurde eine Vielzahl synthetischer Derivate getestet. Dabei erwies sich, dass die Effektivität der Hemmung von Lungentumoren durch NNK

mit Isothiocyanaten von deren Lipophilie und der Reaktivität gegenüber Glutathion abhängt. Mit steigender Lipophilie erhöht sich die Inhibitionswirkung und fällt wiederum mit steigender Reaktivität zu Glutathion ab [155]. Die für die hemmende Wirkung funktionelle Gruppe ist die Isothiocyanat-Gruppe [156]. Untersuchungen haben ergeben, dass die Isothiocyanate hauptsächlich die Cytochrom P450 Monooxygenasen hemmen [154,157,158]. Die Tatsache, dass sich die Inhibition nicht auf einzelne P450 Enzyme wie CYP2B1, CYP2E1 oder der CYP1A-Familien übertragen ließ, führte zur Schlussfolgerung, dass noch weitere, bisher unbekannte P450 Cytochrome am NNK-Metabolismus beteiligt sind, die von PEITC gehemmt werden [154,159]. In den Versuchen zur Tumorprävention ging die Hemmwirkung auf Lungentumoren mit einem Rückgang von DNA-Addukten basierend auf den methylierenden (O⁶-Methylguanin) und pyridyloxobutylierenden (HPB-freisetzend) Eigenschaften von NNK einher [149,160-163]. Auch neueste Studien bestätigen die Verringerung von HPB-Addukt-raten in der Lunge von NNK-behandelten A/J-Mäusen und Fischer F344 Ratten nach der Gabe von PEITC [164,165]. In beiden Versuchen führte die zusätzliche Gabe Benzylisothiocyanat (BITC) zu keinem weiteren Rückgang der Addukte. Beim Menschen konnte ebenfalls ein Hemmeffekt von PEITC auf die NNK-Aktivierung bestätigt werden. In ihren Studien konnten Hecht und Mitarbeiter nachweisen, dass eine erhöhte Zufuhr von PEITC durch Brunnenkresse bei Rauchern zu einer vermehrten Ausscheidung von NNAL und NNAL-Glucuronid über den Urin führt, was mit einer Verringerung der metabolischen Aktivierung durch α -Hydroxylierung einhergeht [166,167]. In einer Studie über den Einfluss von PEITC auf humane P450 Isoenzyme konnte dessen chemopräventiver Effekt nochmals bekräftigt werden [168].

Der Einfluss von Isothiocyanaten auf die α -Hydroxylierung von NNN wurde zwar schon früh beschrieben [169] und in weiteren *in vitro* Studien bestätigt [113,170], es liegen jedoch nur wenig Informationen bezüglich der Tumorprävention vor. Nach der Testung von PEITC und verschiedenen synthetischen Isothiocyanaten als Hemmstoffe des NNN-Metabolismus im Rattenösophagus, wurde mit der *in vitro* wirksamsten Testsubstanz Phenylpropylisothiocyanat auch erfolgreich NNN-induzierte Ösophagustumoren bei den Ratten gehemmt [171].

Neben den erwähnten Pflanzeninhaltsstoffen haben auch Tabakinhaltsstoffe Auswirkungen auf den Metabolismus von Nitrosaminen. Untersuchungen von Hecht *et al.* [167] ergaben, dass die gemeinsame Verabreichung von Schnupftabak-Extrakt mit einer Kombination aus NNN und NNK bei Ratten eine Verminderung der kanzerogenen Wirkung auf Lunge und Mundhöhle bewirkt. Nicotin, das Hauptalkaloid im Tabakrauch und Cotinin, sein Haupt-

metabolit, hemmen ebenfalls nachweislich die metabolische Aktivierung von Nitrosaminen. So konnte sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen *in vivo* durch Nicotin und Cotinin ein Rückgang der Aktivierung von NNK und somit die Bildung von DNA-bindender Metaboliten erreicht werden [172-176]. Die Untersuchung der NNK-Metaboliten im Urin von Hamstern bestätigten ebenfalls diesen Effekt [177]. Während die Auswirkungen von Nicotin und Cotinin auf den Metabolismus von NNK sowohl *in vivo* als auch *in vitro* [178-180] in zahlreichen Studien untersucht wurde, liegen bezüglich des NNN-Metabolismus auch hier nur wenige Informationen vor. 1990 veröffentlichten *Murphy et al.* [181] ihre Studien über den Nachweis einer starken Hemmung des NNN-Metabolismus durch Nicotin in kultivierten Mundschleimhautzellen von Ratten. Metabolismusstudien mit NNN in Lungen- und Leberschnitten von Hamstern bestätigten das chemopräventive Potenzial von Nicotin und Cotinin [182].

1.8. Gewebeschnitte zur Charakterisierung des Fremdstoffwechsels

Bei der Entwicklung von Methoden zur Untersuchung des Fremdstoffmetabolismus *in vitro*, mit der sich die Forschung schon seit vielen Jahren beschäftigt, stößt man noch immer auf erhebliche Probleme. Grund dafür ist die Komplexität der Vorgänge im Organismus die beim Stoffwechsel ablaufen. Hierbei müssen nicht nur die Kooperationen verschiedener Enzymsysteme innerhalb der Zellen berücksichtigt werden, sondern vielmehr auch Verteilungsphänomene, wie die Blut-Hirn-Schranke oder die Placentarschranke, der enterohepatische Kreislauf, first-pass Metabolismus, Ausscheidung von Alkaloiden in den Magen und einiges mehr. Diese Vielzahl an Prozessen im Organismus stellen an die Entwicklung von *in vitro* Methoden große Anforderungen. Die Möglichkeiten mit *in vitro* Methoden den Versuch am Tier gänzlich zu ersetzen sind daher noch immer beschränkt.

Das Hauptziel bei der Methodenfindung ist es, brauchbare Versuchsmodelle mit starker Aussagekraft zu finden, die letztendlich Rückschlüsse auf den Metabolismus des Menschen zulassen. Sie sollten reproduzierbar und in der Praxis leicht anwendbar sein. Wichtiger erscheint jedoch die Forderung, dass ein *in vitro* Modell, in Verbindung mit *in vivo* Modellen, vor allen Dingen Möglichkeiten einer verlässlichen Übertragbarkeit auf die klinische Praxis bieten muss [183]. In den vergangenen Jahren wurden eine Vielzahl an Versuchsmodellen entwickelt die sich mehr oder weniger etabliert haben (Abb. 1-19).

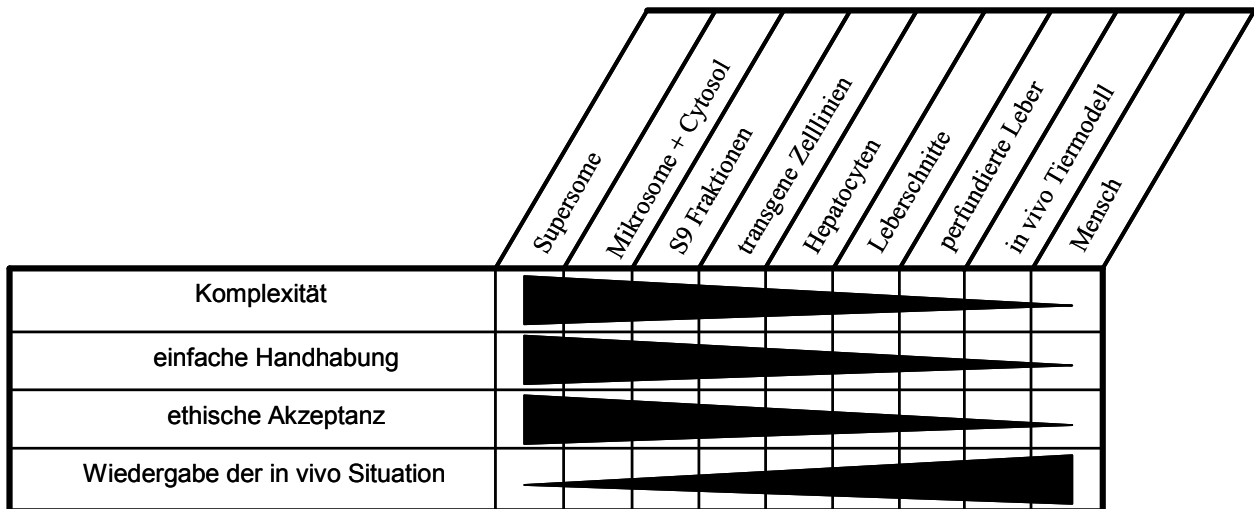


Abbildung 1-19: Für die Pharmakologie entwickelte *in vitro* und *in vivo* Modelle [183]

Mit der Isolierung der für den Fremdstoffmetabolismus verantwortlichen Enzyme, welche selbst auf der Ebene der humanen Isoenzyme kein Problem mehr darstellt, wurden erfolgreiche molekularbiologische Methoden entwickelt, welche Untersuchungen der Vorgänge des Stoffwechsels im Detail erlauben. Um jedoch der Komplexität dieser Vorgänge im Organismus gerecht zu werden, ist man dazu übergegangen die isolierten Enzyme wieder einzeln oder in Kombinationen in Zellen zu exprimieren. Isolierte Zellen oder Zellfraktionen verhalten sich jedoch nicht wie Zellen, die sich im Verbund mit anderen Zellen befinden, wie dies in Organen der Fall ist. Dazu kommt, dass die verschiedenen Organe nicht nur mit einem Zelltyp ausgestattet sind. In der Lunge zum Beispiel werden 40 verschiedene Zelltypen unterschieden [184].

Da weder die Verabreichung von Kanzerogenen, meist zusätzlich in radioaktiv markierter Form, noch Organperfusionen beim Menschen möglich sind, stellt die Untersuchung des Fremdstoffwechsels in Gewebeschnitten die bestmögliche Alternative dar, um die Übertragbarkeit von Tierexperimenten auf den Menschen zu überprüfen. In Gewebeschnitten bleibt die Zellvielfalt der Organe und die Interaktion zwischen den Zellen lange genug erhalten, um Untersuchungen dieser Art durchzuführen. Tabelle 1-7 gibt eine Übersicht über Vor- und Nachteile von Gewebeschnitten.

Die Methode der Gewebeschnitte hatte ihre Anfänge mit Otto Warburg in den 20er Jahren und wurde viele Jahrzehnte für das Studium des Fremdstoffmetabolismus herangezogen. Doch durch Faktoren wie eine schlechte Reproduzierbarkeit, die Dicke der von Hand ge-

schnittenen Organproben und der schnelle Zelltod durch mangelhafte Sauerstoffversorgung, konnte man den Ansprüchen der Untersuchungen nicht gerecht werden. So wurde diese Methodik Anfang der 70er Jahre durch die erfolgreiche und viel versprechende Isolation von Zellen wie z.B. Hepatocyten oder Nierentubuli abgelöst. Erst mit der Einführung von Präzisionsschneidegeräten, wie dem Krumdieck Tissue Slicer, womit man eine hohe Reproduzierbarkeit und eine Minimierung der Schäden am Probenmaterial erreichen konnte, erfuhr die Methode der Gewebeschnitte eine Renaissance [185].

Tabelle 1-7: Vergleich von Vor- und Nachteilen von Präzisionsleberschnitten in der Arzneimittelforschung [183]

VORTEILE	NACHTEILE
- Einsatz von schädlichen Proteasen nicht nötig	- ungenügendes Durchdringen des Mediums in die Schnitte
- intakte interzelluläre Kommunikation/ Interaktion	- beschädigte Zellen an den Schnittflächen
- physiologische räumliche Anordnung	- begrenzter Vitalitätszeitraum
- Möglichkeit morphologischer Untersuchungen	- andauernde Entwicklung und Optimierung der Technik
	- Zellanreicherung nicht möglich
	- keine CYP Induzierung möglich
	- Kryopräservierung bedarf weiterer Optimierung
	- teure Ausstattung nötig

Die Arbeit mit Gewebeschnitten hat aus pharmakologischer bzw. toxikologischer Sicht gegenüber anderen *in vitro* Methoden wie z.B. Zellkulturen oder Mikrosomen einige Vorteile. Die wichtigsten in diesem Zusammenhang sind, dass der Einsatz von Enzymen, wie sie für die Zellisolierung gebraucht werden, nicht erforderlich ist und die Zellstrukturen weitgehend

intakt bleiben, womit die Untersuchung der Biotransformation nicht nur auf Hepatocyten beschränkt bleibt. Zudem kann der Forderung nach einer Reduzierung von Tierversuchen gefolgt werden, da von mehreren Organen gleichzeitig eine Vielzahl von Schnitten angefertigt werden können. Bei Lungenschnitten ist ein weiterer Vorteil, dass die minimale Manipulation die Enzyme schont, die bei der Präparation von Mikrosomen im Gegensatz zur Leber oft bereits geschädigt werden. Der Nachteil der Lungenschnitte ist die nicht reproduzierbare Zusammensetzung aus den verschiedenen Anteilen des Lungengewebes.

Ein Vergleich der Umsatzkinetik verschiedener Substrate zwischen isolierten Leberzellen und Gewebeschnitten der Leber zeigte, dass mit Schnitten generell geringere Umsätze erreicht werden, als mit Zellen. Die Umsatzraten eines Substrates werden durch den interzellulären Transport beeinflusst. Während es bei Gewebeschnitten zwangsläufig ein Konzentrationsgefälle des Substrates zwischen inneren und äußeren Zellen gibt und sich ein Gleichgewicht mit dem Medium nur in den äußeren Zellschichten einstellt, haben Substrate bei Mikrosomen einen ungehinderten Zugang zu den metabolisierenden Enzymen. Metabolismusstudien mit Mikrosomen führen zwar zu höheren und zum Teil aussagekräftigeren Umsatzraten, können jedoch nicht uneingeschränkt auf die *in vivo* Situation im Organismus rückschließen lassen, da sie die funktionellen Unterschiede der physiologischen Situation außer Betracht lassen [186,187]. Durch die bestehenden Nachteile müssen jedoch auch bei der Interpretation der Ergebnisse aus Gewebeversuchen Einschränkungen gemacht werden. Für den in der vorliegenden Arbeit untersuchten direkten Vergleich des Metabolismus von NNN bei Mensch und Nagern erschien die Methodik der Gewebeschnitte von Lunge und Leber gut geeignet. Sie hat sich bereits für die Untersuchung des NNK-Stoffwechsels im Arbeitskreis bewährt [188].

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den konzentrationsabhängigen Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins *N*'-Nitrosornicotin (NNN) in Gewebeschnitten von Leber und Lunge von Nagern und dem Menschen zu untersuchen. Des Weiteren soll der Einfluss vom Pflanzeninhaltsstoff Phenethylisothiocyanat (PEITC), dem Hauptalkaloid Nicotin und dessen Hauptmetabolit Cotinin auf den Metabolismus des NNN untersucht werden.

NNN entsteht, neben weiteren tabakspezifischen Nitrosaminen, während des Trocknungs- und Fermentierungsprozesses von Tabakblättern durch die Nitrosierung der Tabakalkaloide Nicotin und Nornicotin [88]. NNN ist eines der wichtigsten Kanzerogene im Tabak und Tabakrauch und erzeugt bei Ratten Tumore im Ösophagus und im Nasenraum, bei Mäusen Tumore in der Lunge und bei Hamstern stellt es ein Kanzerogen für den Kehlkopf und die Nasenschleimhaut dar. Für den Menschen fehlt bisher der direkte Beweis für die Kanzerogenität von NNN. Auch die Fragen zur NNN-induzierten Tumorigenese, den spezies-spezifischen Unterschieden sowie die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Tierexperimenten auf den durch den Konsum von Tabak verursachten Lungenkrebs beim Menschen konnten trotz jahrelanger Forschung noch nicht ausreichend beantwortet werden. Eine weitere NNN-Quelle ist das Alkaloid Myosmin, das ebenfalls leicht zu NNN nitrosiert werden kann [44]. Seit der Entdeckung nicht zu vernachlässigender Myosmingehalte in verschiedenen Grundnahrungsmitteln [40,189] weitet sich die bisher rein auf den Tabak bezogene Belastung des Menschen durch das Nitrosamin NNN auch auf die ernährungsphysiologische Ebene aus.

Der Metabolismus von NNN beinhaltet im wesentlichen vier Reaktionswege. Die Pyridin-N-Oxidation, die Hydroxylierung des Pyrrolidinrings mit der α -Hydroxylierung an der 2'- und 5'-Position und der β -Hydroxylierung an der 3'- und 4'-Position, sowie die Bildung von Nornicotin [102]. Zahlreiche Studien an Nagern ergeben, dass das NNN schnell im Organismus verteilt wird und der größte Teil in Form von Metaboliten mit dem Urin ausgeschieden wird. Für den Menschen liegen bisher keine Informationen zu NNN und seinen Metaboliten im Urin vor.

Der Einfluss von Lebensmittel- und Tabakinhaltsstoffen auf den Metabolismus von Nitrosaminen wird schon seit vielen Jahren verfolgt. In diesem Zusammenhang konnte durch zahlreiche Studien den Isothiocyanaten, insbesondere dem PEITC, das in einer Reihe von Gemüsesorten wie Kohlgemüse oder Brunnenkresse vorkommt, ein chemopräventives Potenzial nachgewiesen werden. Der Stoffwechsel von Nitrosaminen wird aber auch durch das Hauptalkaloid Nicotin und dessen Hauptmetabolit Cotinin gehemmt. Während diesbezüglich

der Metabolismus des NNK, dem zweitwichtigsten Nitrosamin neben dem NNN, schon eingehend untersucht wurde, gibt es zum Einfluss des NNN-Stoffwechsels durch diese Chemopräventoren/Inhibitoren nur wenig Informationen, die sich weitgehend auf Untersuchungen an Hamstern im eigenen Arbeitskreis beschränken.

Mit Metabolismusstudien an frischen Gewebeschnitten können der konzentrationsabhängige Abbau von NNN und die Spezies-spezifischen Unterschiede gut simuliert werden. Einerseits können Versuche bei sehr niedrigen Konzentrationen von NNN klären, ob der Stoffwechsel bei für den Raucher relevanten Stoffmengen mit den bisher untersuchten hohen Konzentrationen korreliert, andererseits hat man durch identische Versuchsbedingungen und Konzentrationen die Möglichkeit die Übertragbarkeit von Tier auf Mensch zu klären. Da man in erster Linie die Unterschiede des Metabolismus zwischen Menschen und Nagetieren untersuchen und die Relevanz der bisherigen Arbeiten aus dem Tierversuch für den Menschen klären möchte, kann man die in vielen Fällen schwierige Extrapolation dieser *in vitro* Methode auf die Verhältnisse *in vivo* außer Acht lassen.

Die Verwendung der Organe Leber und Lunge erklärt sich daraus, dass die Leber ein Organ mit der höchsten Metabolisierungskapazität für Kanzerogene darstellt und die Lunge bei Rauchern das mit am häufigsten von Krebs betroffene Organ ist. Der Einsatz von Maus, Ratte und Mensch unter identischen Versuchsbedingungen soll die Möglichkeit der Übertragbarkeit von Tiermodelle auf den Menschen überprüfen und den NNN-Metabolismus beim Menschen klären.

2. Material und Methoden

2.1. *Material*

2.1.1. HPLC-System

- on-line Degasser Modell ERC-3315, Gynkotek, München
- automatischer Probengeber Modell 231, Abimed, Düsseldorf
- Gradientenpumpe Modell 480, Gynkotek, München
- UV-Detektor Modell 160, Gynkotek, München
- Radioaktivitätsdetektor RAMONA 2000 mit einer 700 µl-Durchflußzelle, Raytest, Straubenhardt
- Auswertungssoftware WINNIE 32 Ver. 2.1, Raytest, Straubenhardt
- HPLC-Vorsäule LiChroCart® guard column gefüllt mit LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 4 × 4 mm, Merck, Darmstadt
- HPLC-Hauptsäule gefüllt mit LiChrospher® 60 RP-18 selectB, 5 µm, 250 × 4 mm, Merck, Darmstadt

2.1.2. Laborgeräte

- Analysenwaage ME22, Mettler, Gießen
- Digital pH-Meter, InoLAB pH Level 1, pH-Elektrode Ser Tix 41, WTW, Weilheim
- Gewebeschneider und Zubehör (TSE, Bad Homburg):
 - Krumdieck Tissue Slicer Modell MD1100-A2
 - Tissue Coring Tool 5 mm (MP0143) und 8 mm (MP0144)
 - Motorized Tissue Coring Press Modell MD2300
 - Tissue Slice Thickness Gauge Modell MD2700
- Inkubator 1000, Heidolph, Kelheim (modifiziert für den Einsatz von Gewebeschnitten in Mikrotiterplatten)
- Magnetrührer beheizbar, Ikamag RCT, Ika-Werke, Staufen
- Spektralphotometer UV-265 FW, Shimadzu, Düsseldorf
- Szintillationszähler Tri Carb 2500 TR, Packard, Frankfurt
- Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
- Ultraschallbad Sonorex RK 106, Bandelin, Berlin
- Varipetten: 1 ml, 200 µl, 100 µl, 50 µl, 10 µl, Eppendorf, Hamburg
- Vortex-Rüttler Typ VF2, Janke & Kunkel, Staufen
- Zentrifugen:
 - Minifuge GL, Bachofer, Reutlingen
 - Minizentrifuge Modell 16 R, Hettich, Tuttlingen
 - Sorvall Zentrifuge RC5C, 65000 RCF

2.1.3. Chirurgische Instrumente

- Arterienklemmen, groß und klein
- chirurgische Scheren klein und groß
- anatomische Pinzetten, klein OC 20
- anatomische Pinzette, gebogen 45 Grad, OC 22
- chirurgische Pinzette, klein BD 552

(sämtlich von Aesculap, Tuttlingen)

2.1.4. Chemikalien

- Acetonitril, HPLC Grad, Merck, Darmstadt
- Agarose, Fluka, Deisenhofen
- Albumin bovine, Sigma, Deisenhofen
- Ampuwa[®], Wasser für Injektionszwecke, Fresenius AG, Bad Homburg
- Aqua Phenol, Appligene-Oncor, Heidelberg
- Chloroform p.A., Merck, Darmstadt
- Cotinine, Sigma, Deisenhofen
- Deionisiertes Wasser, gereinigt durch Reagent Water System, Millipore, Königstein
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat p.A., Merck, Darmstadt
- Ethanol, p.A., Merck, Darmstadt
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Merck, Darmstadt
- Isoamylalkohol p.A., Merck, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
- Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat p.A., Merck, Darmstadt
- Kupfersulfat-Pentahydrat p.A., Merck, Darmstadt
- Natriumacetat, Merck, Darmstadt
- Natriumbicarbonat p.A., Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid p.A., Merck, Darmstadt
- Natriumdiethyltetraminacetat (EDTA), Merck, Darmstadt
- Natriumhydrogencarbonat p.A., Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxid p.A., Merck, Darmstadt
- Nicotinhydrogentartratsalz, Sigma, Deisenhofen
- *N'*-Nitrosonornicotin (NNN), TRC, Toronto, Kanada
- Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1), Sigma, Deisenhofen
- β -Phenethylisothiocyanat, Sigma, Deisenhofen
- Proteinase K, Sigma, Deisenhofen

- RNase A, Sigma, Deisenhofen
- RNase T1, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
- Salzsäure konz. p.A., Merck Darmstadt
- Natrium Dodecyl Sulfat, SDS, Sigma, Deisenhofen
- Szintillationscocktail für HPLC: Quickszint Flow 302, Zinsser Analytic, Frankfurt
- Szintillationscocktail für Szintillationszähler: Ultima Gold XR, Packard, Frankfurt
- Test-Kit: Lactat Dehydrogenase LD 401, Randox, Krefeld
- Tris, Merck, Darmstadt
- Williamsmedium E, Trockenmischung, Sigma, Deisenhofen

2.1.5. Radiochemikalien

- [5-³H]-Myosmin, spez. Aktivität 24 Ci/mmol, Hartmann Analytik, Braunschweig
- [5-³H]-NNK, spez. Aktivität 30 Ci/mmol, Hartmann Analytik, Braunschweig
- [5-³H]-NNN, spez. Aktivität 27 Ci/mmol, Hartmann Analytik, Braunschweig

2.1.6. Puffer und Lösungen

- Chloroform-Isoamylalkohol: Das organische Lösungsmittel wird unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 94:6 (V/V) frisch hergestellt.
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz: Das Reagenz wird 1:1 mit Millipore-Wasser vermischt.
- 5 M Natriumchloridlösung: 292,2 g Natriumchlorid werden in 1000 ml Millipore-Wasser gelöst.
- 0,9%ige Natriumchloridlösung: 9 g Natriumchlorid werden in 1000 ml Millipore-Wasser gelöst.
- Puffer für die HPLC: 0,2 M KH₂PO₄-Lsg. vorlegen und mit 0,2 M Na₂HPO₄-Lsg. auf pH 7,4 einstellen.
- Proteinase K: Das Originalfläschchen (100 mg) wird mit 2 ml H₂O (Ampuwa) aufgefüllt. Somit ergibt sich eine Endkonzentration von 50 mg/ml. Portionen zu je 200 µl werden bei -20 °C gelagert.
- RNase A: Das Originalfläschchen (50 mg) wird mit 5 ml 0,1 M Natriumacetatlösung pH 5,0 aufgefüllt, so dass sich eine Endkonzentration von 10 µl/ml ergibt. Portionen zu je 400 µl werden bei -20 °C gelagert.
- RNase T1: Das Originalfläschchen (1000 U) wird mit 500 µl H₂O (Ampuwa) aufgefüllt. Hieraus ergibt sich eine Endkonzentration von 10 U/µl. Portionen zu je 80 µl werden bei -20 °C gelagert.
- 1% SDS/1 mM EDTA: 1 g SDS und 37,22 mg EDTA werden in 100 ml Millipore-Wasser gelöst.

- 1 M Tris/HCl pH 7,4: 12,12 Tris werden in ca. 80 ml Millipore-Wasser gelöst, mit HCl erfolgt die Einstellung auf pH 7,4. Anschließend wird mit Millipore-Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- Williamsmedium E: Der Inhalt des Originalfläschchen (10,8 g) werden in 800 ml Millipore-Wasser gelöst, 2,2 g Natriumbicarbonat zugegeben und mit HCl auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wird mit Millipore-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt

2.1.7. Materialien

- Einmalskalpelle, -kanülen, -spritzen, Braun, Melsungen
- Eppendorf Cups 1,5 und 2 ml, Eppendorf, Hamburg
- Eppendorf Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl, Eppendorf, Hamburg
- Erlenmeyer-Kolben 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml aus Duran Glas, VWR, Darmstadt
- Glashomogenisator nach Potter-Elvehjem, Brand, Wertheim
- Glasplatten, 20 × 20 cm, VWR, Darmstadt
- Handschuhe ungepudert, Hartmann, Heidenheim
- Kimwipe Papiertücher, Kimberly-Clark, Zefa, München
- Maxivials, Packard, Frankfurt
- Parafilm „M“, American Can Company, Dixie/Marathon, Greenwich, CN, USA
- Polypropylen Microvials 300 µl für die HPLC, Alltech, Unterhaching
- Polypropylen Zentrifugenröhrchen, 8 ml, Sarstedt, Nümbrecht
- Polystyrol 24 Well Multischalen, Nunc, Wiesbaden
- Schraubgläser 1,5 ml für die HPLC, Chromatographie Müller, Fridolfing
- Ultrafree[®] Gefäße 0,22 µm, Millipore, Molsheim, Frankreich

2.1.8. Radioaktive Stammlösung und Einstellung der spezifischen Aktivität

Für die Untersuchungen des Metabolismus in den unteren Konzentrationsbereichen, also bis 0,016 µmol/l wurde ausschließlich Tritium-markiertes NNN verwendet. Ab einer Konzentration von 0,05 µmol/l wurde zusätzlich nicht markiertes NNN zugemischt (Tab 2-1a). Die Anwendung eines Gemisches aus markierten und nicht markierten Nitrosaminen dient der Einsparung, des wegen seiner hohen spezifischen Aktivität sehr teuren ³H-NNN. Auf die Ergebnisse der Studie hat diese Mischung keinen Einfluss, da durch die statistische Gleichverteilung sowohl radioaktives als auch nichtradioaktives Nitrosamin in gleichem Maße reagieren und die Detektion des radioaktiven Anteiles des Reaktionsgemisches die Verhältnisse im Gesamten wiedergeben.

Tabelle 2-1a: Aufschlüsselung der NNN-Ansätze mit ³H NNN (27 Ci/mmol; 1,0 mCi/ml)

NNN	³ H-NNN (1:158)	NNN 100 nM	NNN 10 µM	Williamsmedium
0,001 µM	5 µl	-	-	1195 µl
0,004 µM	20 µl	-	-	1180 µl
0,016 µM	80 µl	-	-	1120 µl
0,05 µM	100 µl	360 µl	-	740 µl
0,2 µM	100 µl	-	21,6 µl	1078,4 µl
0,5 µM	100 µl	-	57,6 µl	1042,4 µl
0,8 µM	100 µl	-	93,6 µl	1006,4 µl
1,2 µM	100 µl	-	141,6 µl	958,4 µl

Die Inkubation der Gewebeschnitte mit ³H-Myosmin erfolgte nach dem gleichen Schema wie die Inkubation mit ³H-NNN. Die einzigen Veränderungen wurden bei den drei höchsten Konzentrationen vorgenommen. Unter Berücksichtigung des neuen Molekulargewichtes und der veränderten spezifischen Aktivität von Myosmin bzw. ³H-Myosmin musste die Verdünnung neu berechnet werden (Tab. 2-1b).

Tabelle 2-1b: Aufschlüsselung der Myosmin-Ansätze mit ³H-Myosmin (24 Ci/mmol; 1,0 mCi/ml)

Myosmin	³ H-Myosmin (1:174)	Myosmin 100 nM	Myosmin 10 µM	Myosmin 100 µM	Williamsmedium
0,001 µM	5 µl	-	-	-	1195 µl
0,004 µM	20 µl	-	-	-	1180 µl
0,016 µM	80 µl	-	-	-	1120 µl
0,05 µM	100 µl	360 µl	-	-	740 µl
0,2 µM	100 µl	-	21,6 µl	-	1078,4 µl
0,8 µM	100 µl	-	-	9,3 µl	1090,7 µl
1,6 µM	100 µl	-	-	19 µl	1081 µl
5 µM	100 µl	-	-	59,8 µl	1040,2 µl

Den Ansätzen zur Untersuchung der Einflüsse verschiedener Hemmstoffe auf den NNN-Metabolismus wurden zusätzlich zu den verschiedenen NNN-Konzentrationen die einzelnen Hemmstoffe in konstanter Konzentration zugegeben. Das Pipettierschema zu dieser Versuchsreihe ist in Tabelle 2-2 zusammengefasst.

Tabelle 2-2: Aufschlüsselung der Hemmstoffansätze mit 0,2 µM PEITC, 5 µM Nicotin und 50 µM Cotinin

NNN	PEITC 10 µM	WM	Nicotin 100 µM	WM	Cotinin 1 mM	WM
0,001 µM	24 µl	1171 µl	60 µl	1135 µl	60 µl	1135 µl
0,004 µM	24 µl	1156 µl	60 µl	1120 µl	60 µl	1120 µl
0,016 µM	24 µl	1092 µl	60 µl	1060 µl	60 µl	1060 µl
0,05 µM	24 µl	716 µl	60 µl	680 µl	60 µl	680 µl
0,2 µM	24 µl	1054,4 µl	60 µl	1018,4 µl	60 µl	1018,4 µl
0,5 µM	24 µl	1018,4 µl	60 µl	982,4 µl	60 µl	982,4 µl
0,8 µM	24 µl	982,4 µl	60 µl	946,4 µl	60 µl	946,4 µl
1,2 µM	24 µl	934,4 µl	60 µl	898,4 µl	60 µl	898,4 µl

2.2. Methoden

2.2.1. Verwendete Gewebe

Als Versuchstiere dienten weibliche A/J-Mäuse mit einem mittleren Körpergewicht von ca. 18-20 g und männliche F344-Ratten mit einem Körpergewicht von 180-210 g (Charles River Wiga, Sulzfeld). Die Tiere wurden maximal zu sechst in Stahlkäfigen bei 25 °C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit in einem künstlichen Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 Stunden gehalten. Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Akklimatisierung von mindestens einer Woche. Während dieser Zeit erhielten die Tiere Wasser und Futter ad libitum (ssniff R, ssniff Spezialdiäten, Soest).

Menschliche Gewebeproben wurden von umliegenden Kliniken erhalten. Humanes Lungengewebe wurde im Rahmen von Tumoroperationen aus der Asklepios Fachklinik in Gauting bezogen. Humanes Lebergewebe erhielten wir aus dem Klinikum Bogenhausen in München.

2.2.2. Gewinnung und Aufbereitung der Gewebeproben

Direkt nach der Tötung durch Dekapitation wurde den Versuchstieren Leber und Lunge entnommen. Die Organe wurden im Anschluss sofort in Eis gekühlte, Carbogen-gesättigte 0,9%ige physiologische Kochsalzlösung gegeben.

Die menschlichen Gewebeproben wurden direkt nach dem operativen Eingriff aus dem entnommenen Tumorgewebe gewonnen. Um eine Beeinflussung des Metabolismus durch degenerierte Tumorzellen zu verhindern, wurden dabei ausschließlich die optisch vom Tumor ungeschädigten Randbereiche des operativ entfernten Gewebes verwendet. Die Proben wurden für den Transport in eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung aufbewahrt und auf schnellstem Wege zur Weiterverarbeitung ins Labor gebracht. Der Zeitraum zwischen Gewebeentnahme und Versuchsdurchführung betrug zwischen 60 und 90 min.

2.2.3. Herstellung der Gewebeschnitte

Für die Gewinnung der Gewebeschnitte wurde bei den Versuchstieren und beim Menschen die gleiche Methodik angewendet. Lediglich bei der Verarbeitung der Lungenproben ergaben sich Unterschiede zwischen Mensch und Tier.

2.2.3.1. Leber

Aus den entnommenen Lebern wurden zunächst mit Hilfe eines Hohlbohrers gleichmäßige Gewebezylinder ausgestanzt. Bei Rattenlebern wurde ein Bohrer mit 0,8 mm Durchmesser verwendet, bei Maus- und Humanleber betrug der Durchmesser 0,5 mm. Diese Gewebezylinder wurden dann in einen Stahlzylinder gleichen Durchmessers eingeführt und in die dafür vorgesehene Halterung des Krumdieck Tissue Slicers eingespannt. Die Schneidevorrichtung des Gewebeslicers ist während des Schneidevorganges in einem Bad aus auf 5-10 °C gekühlter 0,9%ige physiologischer NaCl-Lösung eingetaucht, womit gewährleistet werden konnte, dass die gewonnenen Schnitte während des gesamten Prozesses von Flüssigkeit umgeben sind. Auf diese Weise konnten aus dem Organ gleichmäßige Schnitte mit einer durchschnittlichen Dicke von ca. $250 \pm 50 \mu\text{m}$ gewonnen werden.

2.2.3.2. Lunge

Da die Lunge eine etwas schwammige Konsistenz besitzt und im Prinzip einen zusammengefallenen Hohlkörper darstellt, konnte bei diesem Organ zunächst nicht auf die gleiche Weise verfahren werden. Um brauchbare Gewebezylinder aus einer Lunge ausstanzen zu können, mussten diese zuerst mit einer 1,5%igen Agarose-Kochsalzlösung komplett befüllt werden. Dies geschah mit Hilfe einer 20 ml Einwegspritze, bestückt mit einer Pipettenspitze.

Die Agaroselösung wurde in einem Wasserbad auf 37 °C Körpertemperatur abgekühlt, in die Einwegspritze aufgesaugt und über die Trachea langsam in die Lunge eingespritzt. Das Lungenvolumen betrug bei der Maus ca. 10 ml, bei der Ratte ca. 20 ml. Sofort wurde die Trachea mit einer Arterienklemme abgeklemmt und die befüllte Lunge in eisgekühlte NaCl-Lösung gegeben. Nach 30 min war die Agarose komplett ausgehärtet und es konnten nun die zur Herstellung der Schnitte benötigten Gewebezylinder ausgestanzt werden.

Um die ca. 3-5 cm³ kleinen Humanlungenproben mit Agarose zu füllen, musste man die Schnittflächen zunächst so gut es ging mit Gewebekleber abdichten. Zusätzlich wurden weitleumigere Bronchiolen mit kleinen „Pipettenstopfen“ verschlossen. Danach wurde die Agaroselösung in das Probengewebe gefüllt und gleichzeitig in eisgekühlte Kochsalzlösung gehalten. Die humanen Lungenproben konnten zwar nicht vollständig mit Agarose befüllt werden, aber kleine Bereiche konnten für die weitere Verarbeitung zu Lungenschnitten verwendet werden.

Die fertigen Schnitte, die sich in einem Auffanggefäß des Gewebeschniders sammelten, wurden über ein Abflussventil in ein Becherglas gespült.

2.2.4. Inkubation der Gewebeschnitte

Die gewonnenen Gewebeschnitte wurden vor dem eigentlichen Versuchsbeginn in einem auf 37 °C aufgeheizten, mit Carbogen begasten Inkubator für ca. 30-45 min vorinkubiert. Dazu wurde aus einer Trockenmischung das so genannte Williamsmedium mit sterilem, deionisiertem Wasser hergestellt. Dieses Williamsmedium diente als Nährmedium für die Inkubationsversuche. Ein Teil des Nährmediums wurde in zwei Bechergläser gefüllt, in die Leber- und Lungenschnitte zunächst überführt wurden.

Während der Vorinkubation wurden die jeweiligen Volumina an Nährmedium, entsprechend der Tabellen 2-1a und b sowie 2-2, in Mikrotiter-Platten vorgelegt und ebenfalls für 15 min in den Inkubator gestellt, um eine Sättigung und die Versuchstemperatur zu erreichen. Nach Beendigung der Vorinkubation wurde aus den Bechergläsern pro Ansatz ein Gewebeschnitt überführt. Um die gewünschte Konzentration des Nitrosamins zu erreichen, wurde die jeweilig definierte Menge an markiertem und nicht markiertem NNN dazu pipettiert. Den Ansätzen, die zur Untersuchung der Möglichkeiten der Hemmung dienten, wurde zusätzlich zu den verschiedenen Nitrosamin-Konzentrationen die jeweiligen Volumina der verschiedenen Hemmstoffe zugesetzt. Die untersuchten Konzentrationsbereiche erstreckten sich von 0,001 µmol/l bis 1,2 µmol/l bei NNN und 0,001 µmol/l bis 5 µmol/l bei Myosmin. Die

maximal eingesetzte Radioaktivitätsmenge pro Ansatz betrug $1,5 \times 10^6$ dpm. Während der gesamten Versuchsdauer wurde das System mit Carbogen begast und auf 37 °C Körpertemperatur gehalten. Nach 6 Stunden wurde die Inkubation abgebrochen. Die Inkubationslösung wurde aus jedem Probengefäß entnommen, jeweils in ein Eppendorf-Cup pipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.2.5. Proteinbestimmung der Gewebeschnitte

Der Proteingehalt der Gewebeschnitte wurde stichprobenartig nach *Lowry et al.* [190] bestimmt. Dazu wurden an jedem Versuchstag während der Herstellung der Gewebeschnitte mehrere Schnitte für diesen Zweck beiseite genommen. Zur Proteinbestimmung wurden folgende Lösungen hergestellt:

Lösung A: 2% Natriumcarbonat
 0,4% Natriumhydroxid
 0,16% Kaliumnatriumtartrat
 1% SDS

Lösung B: 4% Kupfersulfat

Lösung C: 100 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B

Lösung D: 1 Teil Folin-Ciocalteus-Reagens mit einem Teil Wasser

Die Schnitte wurden zunächst mit einem Kimwipe Papiertuch abgetupft um sie von überschüssiger NaCl-Lösung zu befreien. Im Anschluss daran wurde jeder Schnitt gewogen und in 1 ml Millipore Wasser gepottert. Aus den Leberhomogenaten wurden je 20 µl, aus den Lungenhomogenaten je 50 µl für die Analyse entnommen. Jede Probe wurde nun mit Wasser auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Nach gründlichem Mischen am Vortexrüttler wurden zu jeder Probe 600 µl der Lösung C hinzu pipettiert, nochmals vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 60 µl der Lösung D hinzugefügt und weitere 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinlösungen wurden nun am Photometer bei 660 nm gegen eine identisch hergestellte Referenzlösung gemessen. Der Proteingehalt in µg/ml wurde mit Hilfe einer Albumin-Standardreihe wie folgt berechnet:

$$\Delta E_{660} (\text{Probe}) \times 1000 \mu\text{l}$$

$$\text{Steigung der Eichgeraden} \times \text{Probenvolumen in } \mu\text{l}$$

2.2.6. Bestimmung des LDH-Gehaltes

Die Bestimmung des LDH-Austrittes aus den Gewebeschnitten in das Nährmedium wurde anhand eines Test-Kits der Firma Randox bestimmt. Dazu wurde während der Inkubation zu den Zeitpunkten 0, 30 min, 1,5 h, 2,5 h, 3,5 h und 6 h jeweils stichprobenartig ein Aliquot aus der Nährlösung entnommen und nach Anweisung des Herstellers der LDH-Aktivität bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch bestimmt und berechnet.

2.2.7. HPLC-Messung der Proben

Die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenen Proben wurden aufgetaut und 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. 450 μl des Überstandes wurden in den Filtereinsatz eines Millipore Ultrafree[®] Gefäßes mit einer Porenweite von 0,22 μm pipettiert und wiederum 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, wobei die Flüssigkeit durch einen Methylcellulose-Filter gepresst und von weiteren Verunreinigungen befreit wurde. Die Probenlösung wurde nun komplett in ein Qualivial gegeben und in den automatischen Probengeber des Analysegerätes gestellt. 400 μl der Reaktionslösung wurden nach vollständiger Aufgabe mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und on-line Radioaktivitätsdetektor analysiert. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte mit einem Gemisch aus 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) und Acetonitril an einer RP-18-Säule mit einer Flussrate von 0,7 ml/min. Das Verhältnis der beiden Elutionsmittel wurde durch ein Gradientenprogramm verändert und nahm folgenden Verlauf (Abb. 2-1). Nach 3 Minuten Elution mit 100% Phosphatpuffer stieg der Anteil an Acetonitril linear über 27 Minuten auf 22% an und nach weiteren 2 Minuten auf 60%. Dieses Mischungsverhältnis wurde 2 Minuten gehalten und in 2 Minuten wieder auf die Anfangsbedingung von 100% Phosphatpuffer gebracht.

Der Nachweis der radioaktiv markierten Metaboliten des NNN erfolgte on-line im Radioaktivitätsdetektor durch Zumischung von 3 ml Quickszint und wurde mit Hilfe eines Computerprogramms gespeichert und ausgewertet. Der Anteil der jeweiligen Metaboliten am Gesamtumsatz entsprach dem prozentualen Anteil der einzelnen Peaks an der Gesamtfläche über der Basislinie. Um die einzelnen Metaboliten zuordnen zu können, wurde unter den gleichen Gradientenbedingungen, jedoch mit UV-Detektion bei 230 nm und 245 nm, verschiedene Gemische von nicht markierten Standards co-chromatografiert.

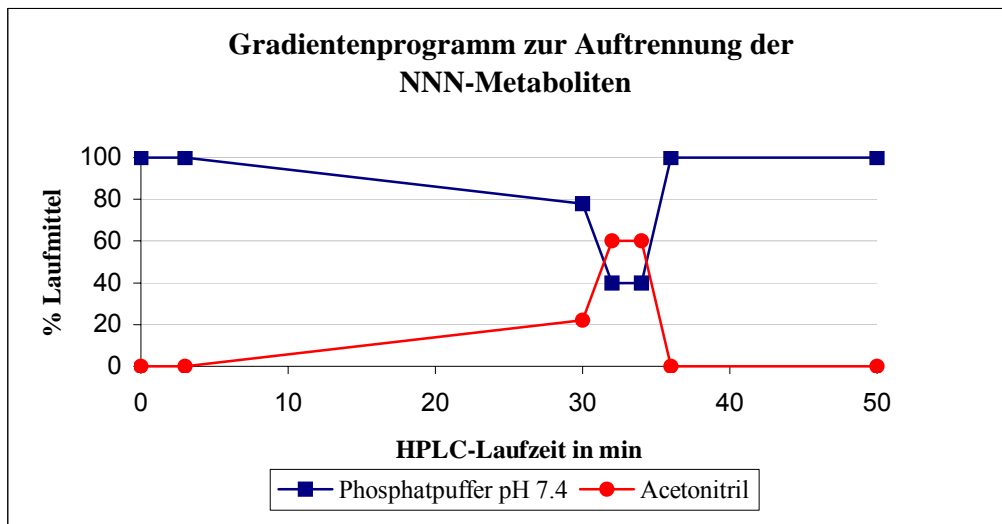


Abbildung 2-1: Gradientenprogramm der NNN Analytik

2.2.8. DNA-Bindungsstudie

2.2.8.1. Inkubation

Um das genotoxische Potenzial von NNN zu untersuchen, wurde die kovalent an DNA gebundene Radioaktivität gemessen. Dazu wurden jeweils Rattenleber- und Rattenlungenschnitte 6 h mit einer erhöhten Menge von ^3H -NNN (15×10^6 dpm, 280 nmol je Ansatz) inkubiert. Um eine bessere DNA-Ausbeute zu bekommen, wurden pro Ansatz drei Schnitte zusammen inkubiert. Als Referenz wurde je ein Ansatz ohne Zugabe von Radioaktivität mit inkubiert. Nach Ablauf der 6 Stunden wurde die Inkubation abgebrochen, die Schnitte vom Nährmedium getrennt und bei -20 °C gelagert.

2.2.8.2. Fällung der DNA

Nach dem Auftauen wurden die Schnitte mit einem Kimwipe von überschüssigem Nährmedium befreit und an der Analysenwaage gewogen. Das durchschnittliche Gewicht von drei Leberschnitten betrug $76,7 \pm 12,3$ mg, das von drei Lungenschnitten $29,4 \pm 4,6$ mg. Im Anschluss wurden die Schnitte mit einem Potter in jeweils 1 ml 1% SDS/1 mM EDTA gepottert und in je einem Eppendorf-Cup mit 2 ml Fassungsvermögen überführt. Der Potter wurde nach jedem Vorgang mit einem weiteren Milliliter 1% SDS/1 mM EDTA gespült, welcher ebenfalls in das Cup gegeben wurde. Aus jedem Ansatz wurden nun jeweils 10 μl für die Radioaktivitätsmessung abpipettiert. Über die Zugabe von 30 μl 1 M Tris/HCl wurde die Einstellung des physiologischen pH-Wertes von 7,4 erreicht. Nach kurzer Durchmischung erfolgte die Zugabe von 30 μl RNase A und 5 μl RNase T1, um störende RNA zu entfernen. Nach erneutem Durchmischen aller Ansätze mit dem Vortex Rüttler erfolgte die Inkubation der

Proben über 45 min bei 37 °C. Während dieser Zeit wurden im Szintillationszähler die einzelnen Radioaktivitätsmengen der Ansätze gemessen, der Durchschnitt bestimmt und die gleiche Menge an Radioaktivität den Referenzansätzen zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden den Proben jeweils 15 µl Proteinase K zupipettiert und wiederum für 45 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Um die DNA-Lösungen aufzureinigen, wurden sie dreimal mit organischem Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität ausgeschüttelt. Zunächst wurde mit 3 ml Aquaphenol, dann mit 3 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 Vol) und zuletzt mit 3 ml eines frisch hergestellten Chloroform/Isoamylalkoholgemisches (96:4 Vol) 2 min manuell geschüttelt und zur optimalen Phasentrennung zentrifugiert (Minifuge GL, 5000 rpm, 20 °C, 10 min). Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 300 µl 5 M NaCl und 3 ml eisgekühltem Ethanol gefällt. Über Nacht wurden die Proben bei –20 °C gelagert.

Am darauf folgenden Tag wurde die gefällte DNA in Eppendorfcups (1,5 ml) überführt, abzentrifugiert (Minizentrifuge 16 R, 12000 rpm, 4 °C, 4 min) und der Überstand jeweils verworfen. Die gewonnene DNA wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, mit Kimwipe Papiertüchern getrocknet, und in jeweils 150 µl H₂O (Ampuwa) gelöst.

2.2.8.3. Konzentrationsbestimmung und Szintillationsmessung

Die DNA-Konzentration wurde mittels UV-Spektroskopie bei 260 nm und 230 nm bestimmt unter der Annahme einer optischen Dichte von 20 für eine Lösung von 1 mg DNA/ml. Das Verhältnis von oD₂₆₀/oD₂₃₀ sollte ≥ 2 sein. Für die Messung am Photometer wurde 1 ml H₂O mit 50 µl der DNA-Lösung vermischt.

Berechnung der DNA-Konzentration:

$$\text{DNA (mg/ml)} = \frac{(\text{oD}_{260}/20) (1000 + \text{Aliquotvolumen})}{\text{Aliquotvolumen}}$$

Zur Bestimmung der kovalent gebundenen Radioaktivitätsmenge wurden 100 µl der wässrigen DNA-Lösung zu 10 ml Szintillator Ultima Gold XR gegeben und 2 min im Szintillationszähler gezählt. Die Differenz aus Proben- und Referenzwert bezogen auf die Gesamtmenge DNA und die eingesetzte Gesamtradioaktivität ergab den kovalent gebundenen Anteil des ³H-NNNs.

Berechnung der gebundenen Radioaktivitätsmenge:

$$\text{gebundene Radioaktivität (\%)} = \frac{(\text{dpm Probe} - \text{dpm Referenz}) \times 5 \times 100}{2 \times \text{Gesamtradioaktivität}}$$

2.2.9. Auswertung der Versuche und Statistik

Aus den prozentualen Anteilen von NNN und seinen Metaboliten zur Gesamtfläche über der Basislinie wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (Microsoft, Seattle, USA) über das durchschnittliche Gewicht und der bestimmten mittleren Proteingehalte der Gewebeschnitte der Umsatz zu den jeweiligen Metaboliten in fmol/min/mg Protein berechnet. Die Metaboliten, die über die einzelnen Abbauwege, wie N-Oxidation (NNN-N-Oxid), α -Hydroxylierung (Hydroxy- und Ketosäure, Diol und Ketoalkohol) oder Denitrosierung (Norcotinin), entstehen, werden aufsummiert und damit die relative Giftung (α -Hydroxylierung) bzw. Entgiftung (N-Oxidation, Denitrosierung) in den Organen ermittelt. Aus den Einzelwerten pro Gewebe und Spezies wurden Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit dem zweiseitigen Student's t-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Spezies, Organen und Hemmstoffen untersucht (WinSTAT für EXCEL, Greulich Software, Staufen).

Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism[®] (Vs.2.01, GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) wurde aus den Umsätzen für jeden Metaboliten die Kinetik nach der Michaelis-Menten Gleichung

$$V = \frac{dM}{dt} = \frac{V_{max} \times [S]}{k_m + [S]}$$

errechnet, wobei V das Integral der pro Zeiteinheit t umgesetzten Substanzmenge M darstellt. Die Umsatzgeschwindigkeit wird in fmol/min/mg Protein bei einer Substratkonzentration $[S]$ in μM ausgedrückt. Aus der Gleichung ergeben sich die Konstanten V_{max} (maximale Umsatzgeschwindigkeit in fmol/min/mg Protein) und k_m (Substratkonzentration in μM , bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halb so groß ist wie die maximale). Zusätzlich zu den Kinetiken wurde die intrinsische Clearance, Cl_{intr} nach der Formel

$$Cl_{intr} = \frac{V_{max}}{k_m}$$

berechnet, wobei die Werte von V_{max} in fmol/min/mg Protein und der k_m -Wert in $\mu\text{mol/l}$ verwendet wurden.

3. Ergebnisse

3.1. DNA-Bindungsstudie

Die Bestimmung der kovalent an die DNA gebundenen Radioaktivität diente zur Untersuchung des genotoxischen Potenzials von NNN. Da die durch Isolierung aus einem Schnitt gewonnene DNA-Menge zu gering war, wurden zu diesem Zweck drei Schnitte zusammen inkubiert. Die photometrisch ermittelten DNA-Mengen betragen in den Lungenschnitten im Mittel 0,1 mg/ml und in den Leberschnitten etwa 0,7 mg/ml. Die zusätzliche Untersuchung des Nitrosamins NNK, welches nachweislich ein starkes Lungenkanzerogen darstellt, diente zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse. Nach 6 Stunden Inkubation der Schnitte mit ^3H -NNN und ^3H -NNK zeigte sich, wie erwartet, mit 0,023% die höchste kovalente Bindung des NNK an die DNA der Rattenlunge. Die Bindung von NNN an die Lungen-DNA lag um das 20-fache darunter. Die Bindung der Radioaktivität an die Leber-DNA der Ratte lag jedoch für das NNN mit 0,005% um über das 10-fache über der Bindung durch NNK mit 0,0004%. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Kovalent gebundene Radioaktivität von ^3H -NNN und ^3H -NNK an Leber- und Lungen-DNA der Ratte nach 6-stündiger Inkubation (nach Abzug der Leerwerte) (MW \pm SE; N = 6)

Nitrosamin	Organ	Radioaktivität (dpm)	an DNA gebundene Radioaktivität (%)
NNN	Lunge	9,67 \pm 4,65	0,00095
	Leber	60,22 \pm 10,32	0,00482
NNK	Lunge	287,04 \pm 36,83	0,02296
	Leber	4,57 \pm 2,01	0,00037

3.2. HPLC-Analytik

Um die im Versuch ermittelten Metaboliten des NNN-Stoffwechsels zu identifizieren, wurde anhand von nicht radioaktiv markierten Referenzmetaboliten durch UV-Detektion ein Musterchromatogramm erstellt. Aus den Referenzchromatogrammen konnten die Retentionszeiten der einzelnen Metaboliten und des NNN ermittelt werden. Die Retentionszeiten der wichtigsten Metaboliten, sowie für NNN sind in der nachfolgenden Tabelle 3-2 aufgeführt.

Tabelle 3-2: Retentionszeiten der Hauptmetaboliten von NNN

Metabolit	Retentionszeit	Nummer
Hydroxysäure	8 min 10 s	(3)
Ketosäure	14 min 54 s	(5)
Diol	21 min 54 s	(7)
Norcotin	24 min 54 s	(11)
Ketoalkohol	27 min 40 s	(13)
NNN	33 min 20 s	-
Myosmin	38 min 40 s	(18)

Zusätzlich zu den identifizierten Metaboliten traten bei allen untersuchten Spezies regelmäßig Peaks bei 4 min (1) und 29 min 40 s (15) auf, die auch nach Inkubation ohne Gewebezusatz nachgewiesen werden konnten (Abb. 3-2 bis 3-4). Da mit der verwendeten Methode keine Strukturaufklärung möglich war und weitere Referenzmetaboliten nicht zur Verfügung standen, wurden diese und weitere unbekannte Metaboliten nicht in die Untersuchung miteinbezogen.

Die Abweichungen der Peaks von den Retentionszeiten betragen in der Regel nicht mehr als eine Minute. Die Ursache der Retentionsschwankungen war hauptsächlich die Installation einer frischen Säule. Da sich die Abweichungen meist auf das gesamte Chromatogramm auswirkten und somit alle Metabolitenpeaks leicht verschoben waren, konnte die Auswertung trotzdem problemlos erfolgen. Anfang und Ende der Peaks wurden manuell festgelegt und die Flächenanteile der jeweiligen Metaboliten nach Abzug der Basislinie mit Hilfe des Integrationsprogramms des Radioaktivitätsdetektors errechnet.

3.3. Charakterisierung der Gewebeschnitte

3.3.1. Vitalität der Gewebeschnitte

Die Vitalität der verwendeten Gewebeschnitte wurde stichprobenartig anhand der Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) in das Medium überprüft. Die LDH ist in intakten Zellen im Cytoplasma lokalisiert. Ihr Austritt aus den Zellen wird durch intakte Zell-

membranen verhindert. Eine Membranschädigung der Zelle führt zu einer verstärkten Freisetzung cytoplasmatischer Bestandteile und somit zu einer Anreicherung des relativ stabilen Enzyms LDH im umgebenden Nährmedium.

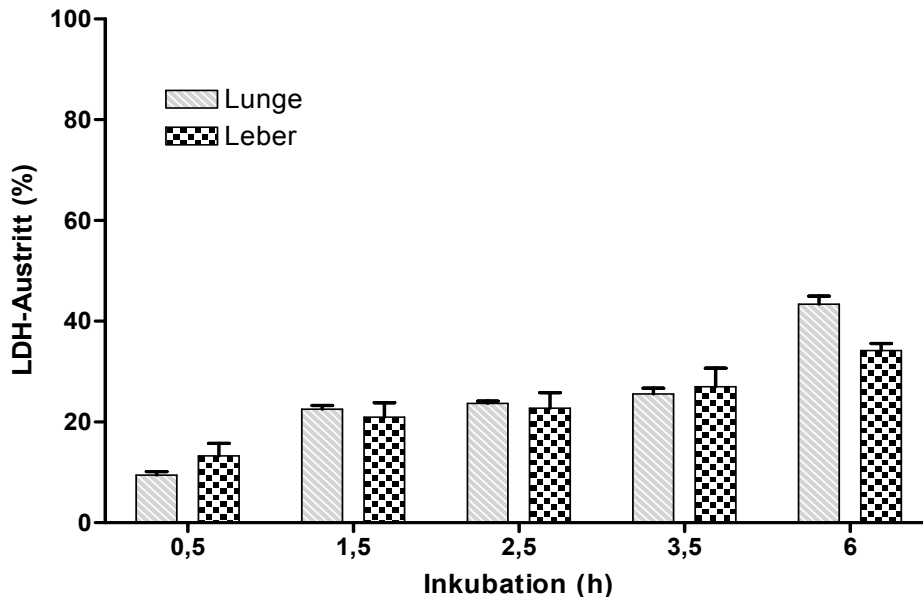


Abbildung 3-1: Zeitabhängigkeit des LDH-Austritts aus Leber- und Lungenschnitten der Ratte ins Nährmedium. Es wird der Anteil der LDH-Aktivität im Medium in Prozent der Gesamtaktivität in den Schnitten angegeben. (MW±SE; N = 4)

Der Verlauf des prozentualen LDH-Austritts aus der Zelle in das Nährmedium über einen Zeitraum von 6 h war sowohl in Leber- als auch Lungenschnitten in etwa gleich (Abb. 3-1). Nach einer Vorinkubationszeit von 30 min wurde im Medium der Leberschnitte ca. 13%, im Medium der Lungenschnitte etwa 10% freigesetztes LDH nachgewiesen. Weitere Messungen zwischen 1,5 und 3,5 h ergaben, dass sich die LDH-Freisetzung sowohl in der Leber (21%, 23% und 27%) als auch in der Lunge (23%, 24% und 26%) auf ein relativ stabiles Niveau einpendelte. Nach 6 h Inkubation wurden bei der Leber 34% und bei der Lunge 43% freigesetztes LDH im Medium nachgewiesen.

3.3.2. Proteingehalte der Gewebeschnitte

Aufgrund der großen Anzahl der Gewebeschnitte wurde ihr Proteingehalt zu jeder Spezies nur stichprobenartig nach *Lowry et al.* [190] bestimmt. Dabei ergaben sich für Lungenschnitte von Maus und Ratte mittlere Proteingehalte von 1,3% bzw. 1,8% des Feuchtgewichtes und für Leberschnitte im Mittel jeweils 6% des Feuchtgewichtes der Schnitte. Die Werte der Humanproben lagen mit 10% in der Lunge und 20% in der Leber deutlich höher.

3.4. *Metabolismus von NNN in Gewebeschnitten*

Der NNN-Metabolismus wurde bei allen Spezies in den Organen Lunge und Leber untersucht. Während bei den Versuchstieren Maus und Ratte und bei der Humanleber der Metabolismus über den gesamten Konzentrationsbereich untersucht wurde, konnte aufgrund der geringen Anzahl an Humanlungenproben, hier nur eine Zeitabhängigkeit bei konstanter Konzentration betrachtet werden.

Je nach Spezies und Organ konnten nicht immer alle bisher schon identifizierten NNN-Metaboliten nachgewiesen werden. Zum einen begründet sich dies durch die hohe Organspezifität des NNN und zum anderen lag man mit dem untersuchten Konzentrationsbereich um den Faktor 1000 niedriger als in den bisher publizierten Arbeiten zum NNN-Metabolismus. Dies trifft insbesondere für den Metaboliten Diol zu. Die Ergebnisse zum Umsatz von Diol sind zwar der Vollständigkeit wegen in den Tabellen mit aufgeführt, werden aber nicht im Einzelnen weiter diskutiert. Die Metaboliten NNN-N-Oxid und Lactol konnten in keiner der untersuchten Spezies und Organen nachgewiesen werden. Da der in allen Untersuchungen auftretende Myosminpeak nicht eindeutig als Metabolit interpretiert werden kann, sind die Ergebnisse hierzu extra unter Punkt 3.3.4 aufgeführt.

Als Metaboliten der 2'-Hydroxylierung von NNN werden im Folgenden die Ketosäure und der Ketoalkohol (HPB) beschrieben, als Metaboliten der 5'-Hydroxylierung die Hydroxysäure und das Diol (Abb. 1-14). Die Ergebnisse zum Metabolismus des NNN sind für alle untersuchten Konzentrationen, Spezies und Organe in tabellarischer Form im Anhang zusammengefasst (Tab. A1-A6).

3.4.1. *NNN-Metabolismus der Maus*

Die sechsstündige Inkubation der Organe Leber und Lunge bei der Spezies Maus hat ergeben, dass die Lunge eine größere Metabolisierungskapazität besitzt als die Leber. Diese lag über den gesamten Konzentrationsbereich bei der Lunge im Durchschnitt bei 11% des eingesetzten Nitrosamins, während die Leber im Mittel etwa 9% des NNN abbaute. Der Unterschied wird umso deutlicher, wenn man bemerkt, dass in die Berechnung der prozentualen Angaben zu Metabolisierungskapazität und Metabolitenanteile die Proteingehalte der verschiedenen Organschnitte nicht mit eingeht.

3.4.1.1. Mäuseleber

Die größten Anteile der identifizierten NNN-Metaboliten fielen bei der Mäuseleber durchschnittlich mit 31% auf die Hydroxysäure und mit 30% auf die Ketosäure. Den drittgrößten Anteil an den entstandenen Metaboliten hatte mit 27% das Norcotinin. Danach folgten der Ketoalkohol mit etwa 10% und das Diol mit ca. 2%. Die Summe der Metaboliten, die der α -Hydroxylierung zuzuordnen sind, betrug etwa 73%. Unterscheidet man diesbezüglich nach 2'- und 5'-Hydroxylierung ergab sich folgende Verteilung. Insgesamt 40% der identifizierten Metaboliten hatten Anteil an der 2'-Hydroxylierung, auf 33% summierten sich die Metaboliten der 5'-Hydroxylierung des NNN (Abb. 3-2a).

3.4.1.2. Mäuselunge

Bei der Mäuselunge fiel der größte Anteil der identifizierten Metaboliten mit 39% auf das α -Hydroxylierungsprodukt Ketosäure. Danach folgten die Hydroxysäure mit 25% und der Ketoalkohol mit 21%, das Norcotinin mit 14% und schließlich das Diol mit ca. 1%. Betrachtet man auch hier die Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung, ergaben sich 86%, die diesem Abbauweg zuzuordnen sind. Der Verteilung auf 2'- und 5'-Hydroxylierung ergaben hier 60% bzw. 26% (Abb. 3-2b).

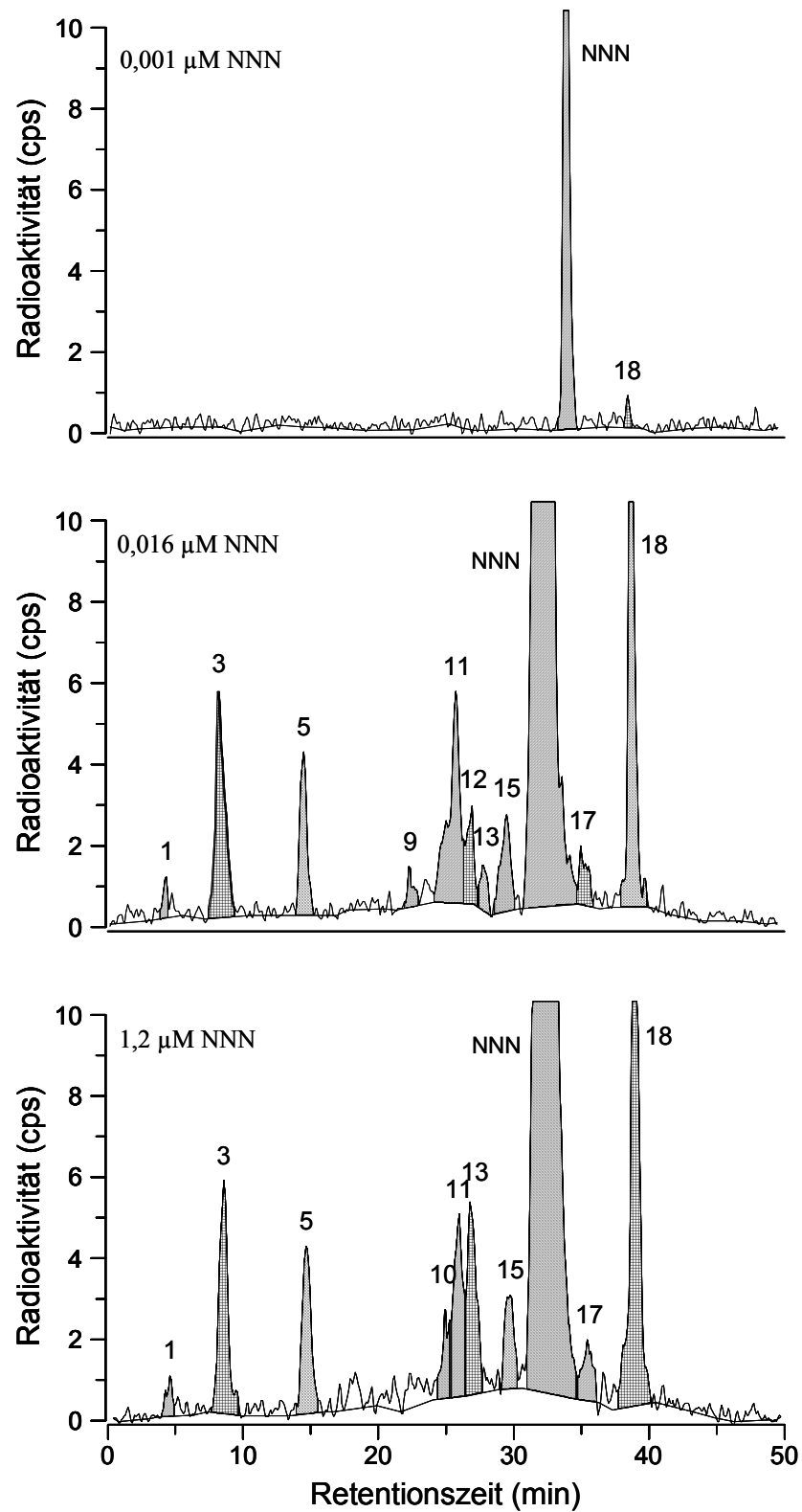


Abbildung 3-2a: HPLC-Radiochromatogramme zum konzentrationsabhängigen Metabolismus von NNN in Leberschnitten von Mäusen nach 6 Stunden Inkubation

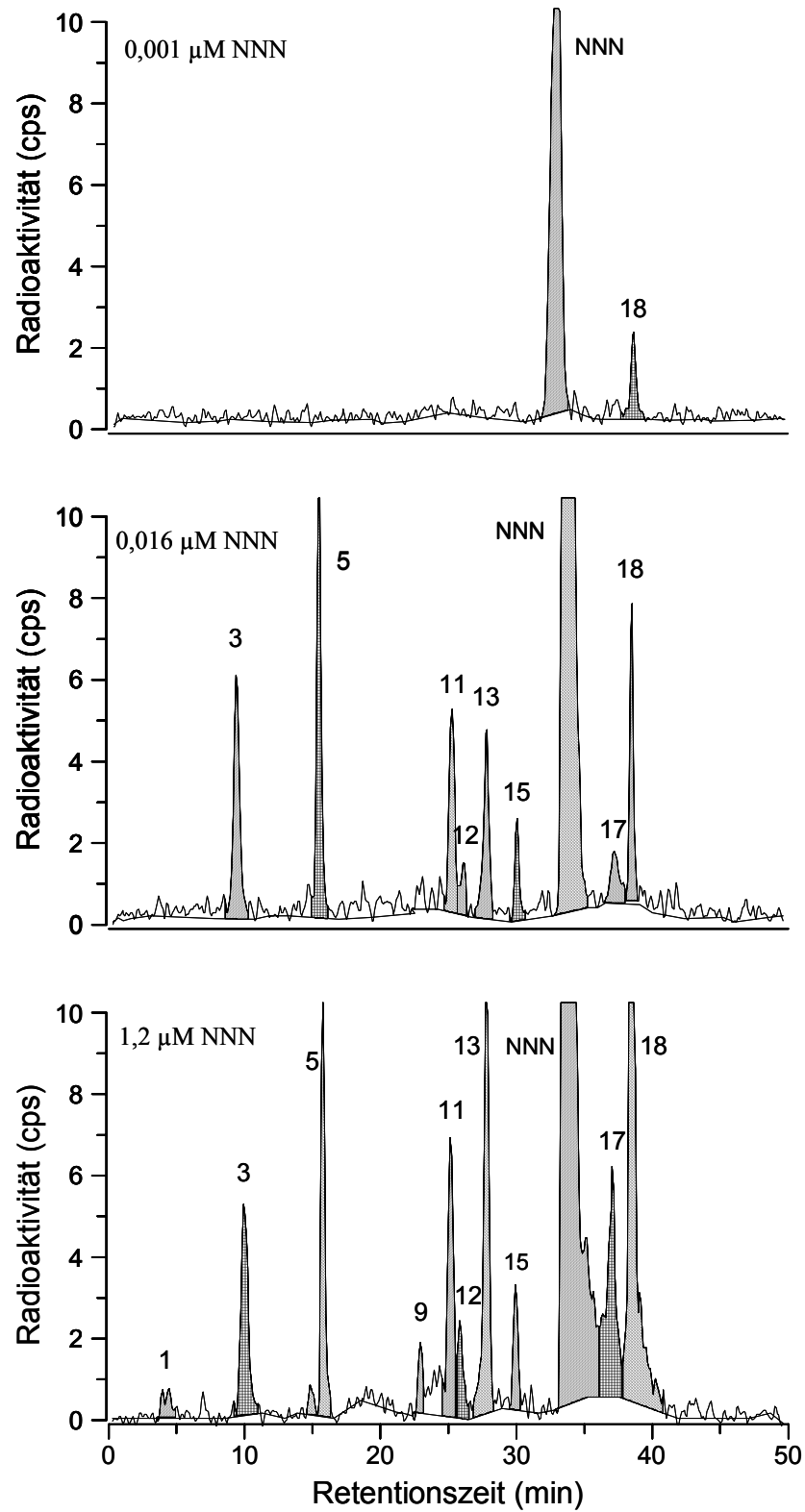


Abbildung 3-2b: HPLC-Radiochromatogramme zum konzentrationsabhängigen Metabolismus von NNN in Lungenschnitten von Mäusen nach 6 Stunden Inkubation

3.4.2. NNN-Metabolismus der Ratte

Bei der Ratte zeigte sich ebenfalls wie bei der Maus, dass die Lunge die höhere Metabolisierungskapazität besitzt als die Leber. Auch hier ist zu bemerken, dass die prozentualen Angaben über die Metabolisierungskapazität der Organe nicht den relativen Umsatz, also bezogen auf die Proteingehalte der Gewebeschnitte wiedergeben. Sie lag bei der Lunge im Durchschnitt bei 10%, bei der Leber im Mittel etwa bei 7% des eingesetzten NNN und waren bei beiden Organen, mit einem leichten Anstieg in den mittleren Konzentrationen, über den gesamten Konzentrationsbereich konstant.

3.4.2.1. Rattenleber

Als Hauptmetabolit nach 6-stündiger Inkubation von Leberschnitten mit NNN erwies sich bei der Ratte mit 37% das Norcotinin. Den zweitgrößten Anteil der ausgewerteten Metaboliten teilten sich mit jeweils 22% die Hydroxy- und die Ketosäure. Danach konnten etwa 11% dem Ketoalkohol zugesprochen werden und schließlich das Diol, mit 8%. Die Unterteilung nach 2'- und 5'-Hydroxylierung ergaben bei der Rattenleber 33% bzw. 30%. Die Summe der α -Hydroxylierung liegt hier somit bei 63% (Abb. 3-3a). Die Inkubation der Rattenleberschnitte mit der niedrigsten NNN-Konzentration (0,001 μ M) ergaben keinen Umsatz.

3.4.2.2. Rattenlunge

Den größten Anteil der identifizierten Metaboliten aus der Inkubation von Lungenschnitten machte bei der Ratte mit 48% die Hydroxysäure aus, gefolgt von der Ketosäure mit 24% und dem Ketoalkohol mit 13%. Im Gegensatz zur Rattenleber wurden bei der Lunge nur 11% des eingesetzten NNN zu Norcotinin verstoffwechselt. Ebenso wie bei der Mäuselunge und -leber und auch der Rattenleber wurde das Diol auch hier nur zu einem geringen Anteil gebildet. Es konnte etwa 3% Diol nachgewiesen werden. Betrachtet man hier ebenfalls die Summe der α -Hydroxylierung, so werden 89% des eingesetzten NNN über diesen Weg abgebaut. Genauer gesagt werden jeweils 38% über die 2'-Hydroxylierung und 51% über die 5'-Hydroxylierung verstoffwechselt (Abb. 3-3b).

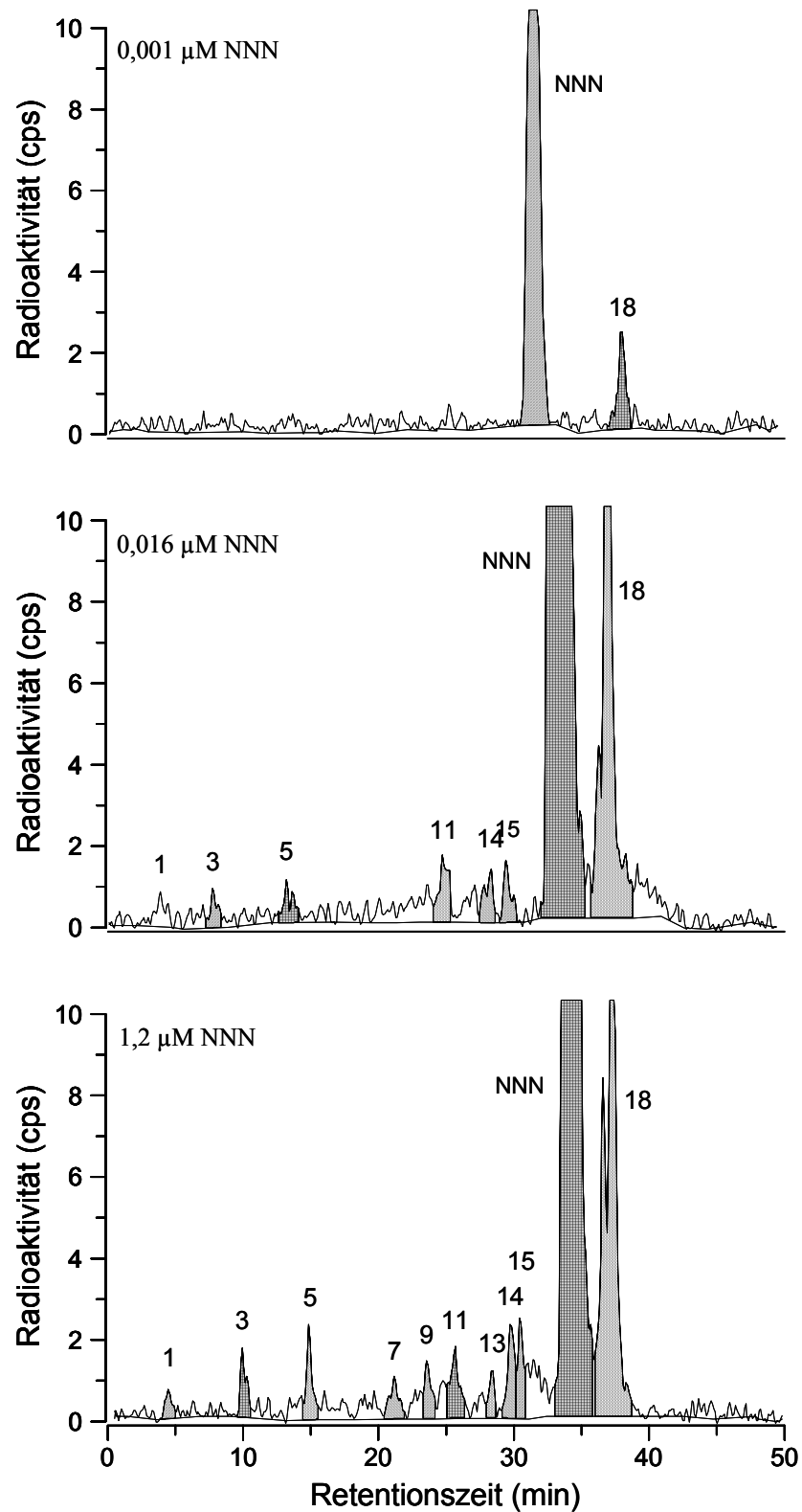


Abbildung 3-3a: HPLC-Radiochromatogramme zum konzentrationsabhängigen Metabolismus von NNN in Leberschnitten von Ratten nach 6 Stunden Inkubation

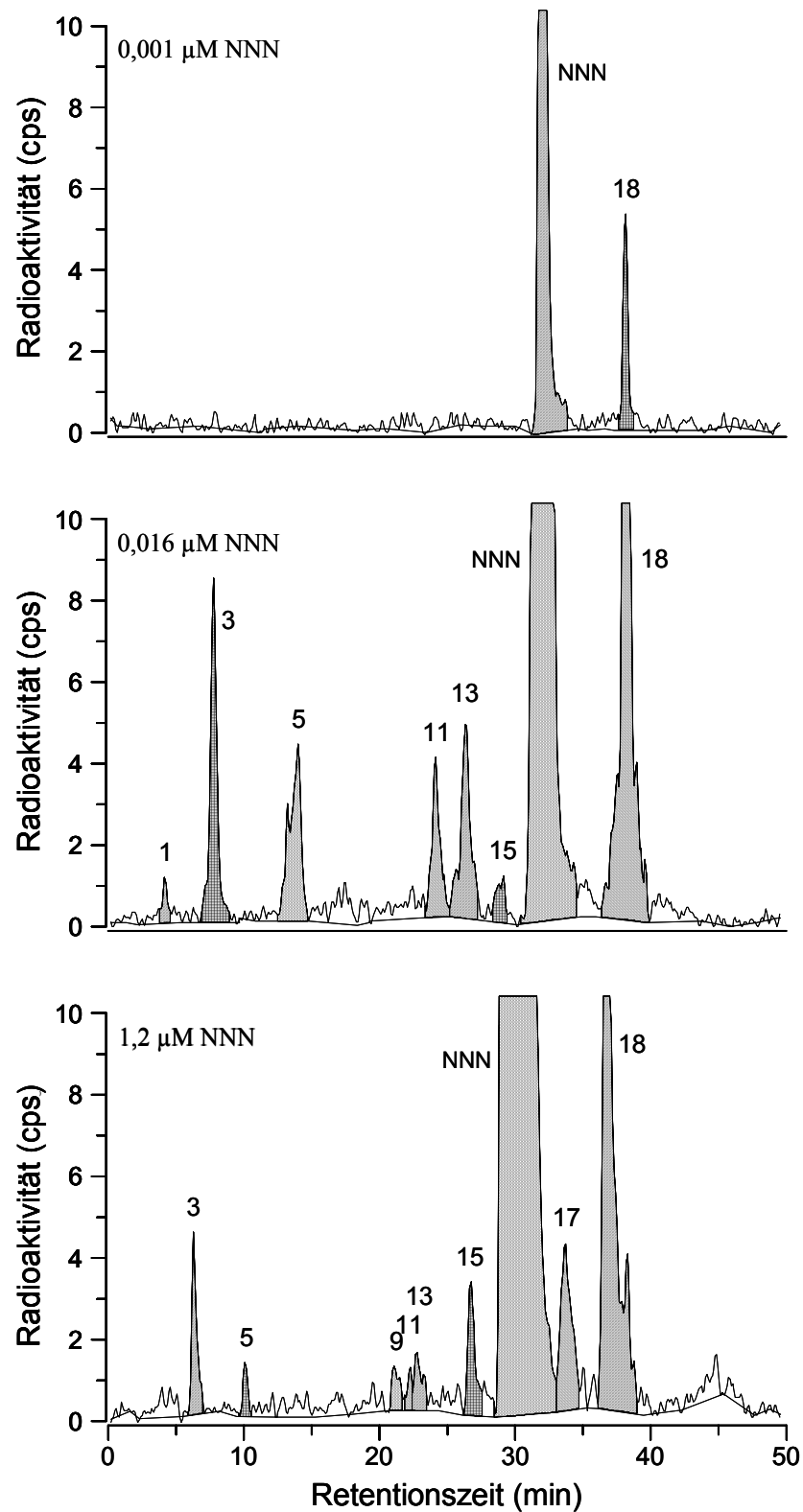


Abbildung 3-3b: HPLC-Radiochromatogramme zum konzentrationsabhängigen Metabolismus von NNN in Lungenschnitten von Ratten nach 6 Stunden Inkubation

3.4.3. NNN-Metabolismus des Menschen

Bei der Untersuchung des NNN-Metabolismus in der Leber des Menschen fiel auf, dass die menschliche Leber gegenüber der Maus- und Rattenleber die höchste Metabolisierungskapazität aufweist. Schnitte aus humanem Lebergewebe verstoffwechselten im Mittel 18% des eingesetzten Nitrosamins.

3.4.3.1. Humanleber

Nach sechsstündiger Inkubation von Humanleberschnitten mit NNN konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Hydroxysäure mit 68% den Hauptmetaboliten darstellt. Den zweitgrößten Anteil stellt das Norcotinin mit 20%, gefolgt von der Ketosäure mit 6%. Diol konnte mit 4% und der Ketoalkohol mit 2% nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den übrigen Untersuchungen, kann bei der Humanleber eine deutliche Gewichtung in der Verteilung der Summen der α -Hydroxylierung, die im Gesamten 80% ausmacht, erkannt werden. 71% des NNN werden bei der Humanleber über die 5'-Hydroxylierung verstoffwechselt und stellt somit gegenüber der 2'-Hydroxylierung, die mit nur 9% beteiligt ist, den Hauptabbauweg dar (Abb. 3-4a).

3.4.3.2. Humanlunge

Aufgrund der geringen Größe der Humanlungenproben konnten nur wenige brauchbare Schnitte gewonnen werden. Da die Inkubation von Humanlungenschnitten in den unteren Konzentrationsbereichen (0,001 μ M bis 0,05 μ M) nach 6 h keinerlei messbare Umsätze ergab, wurde entschieden, bei der Humanlunge nur noch eine Zeitabhängigkeit mit konstanter Konzentration von 0,1 μ M NNN zu untersuchen. Es zeigte sich eine Metabolisierungskapazität von 4,7% nach 6 Stunden Inkubation und 5,3% nach 24 Stunden. Sie liegt damit weit unter den Kapazitäten der Maus und Ratte. Als Hauptmetabolit ergab sich sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden mit 9% bzw. 10% der Ketoalkohol. Der zweitgrößte Anteil fiel auf das Norcotinin, mit 1,6% nach 6 Stunden bzw. 2,5% nach 24 Stunden. Ketosäure wurde von Humanlungenschnitten zu 1,1% nach 6 Stunden und zu 1,5% nach 24 Stunden gebildet. Der Nachweis von Hydroxysäure und Diol konnte nur nach 24 Stunden mit 0,53% bzw. 0,56% erbracht werden. Daraus ergibt sich für die humane Lunge der Hauptabbauweg über die 2'-Hydroxylierung mit 10% nach 6 Stunden und 12% nach 24 Stunden. Metaboliten der 5'-Hydroxylierung konnten erst nach 24 Stunden mit 1% nachgewiesen werden (Abb. 3-4b).

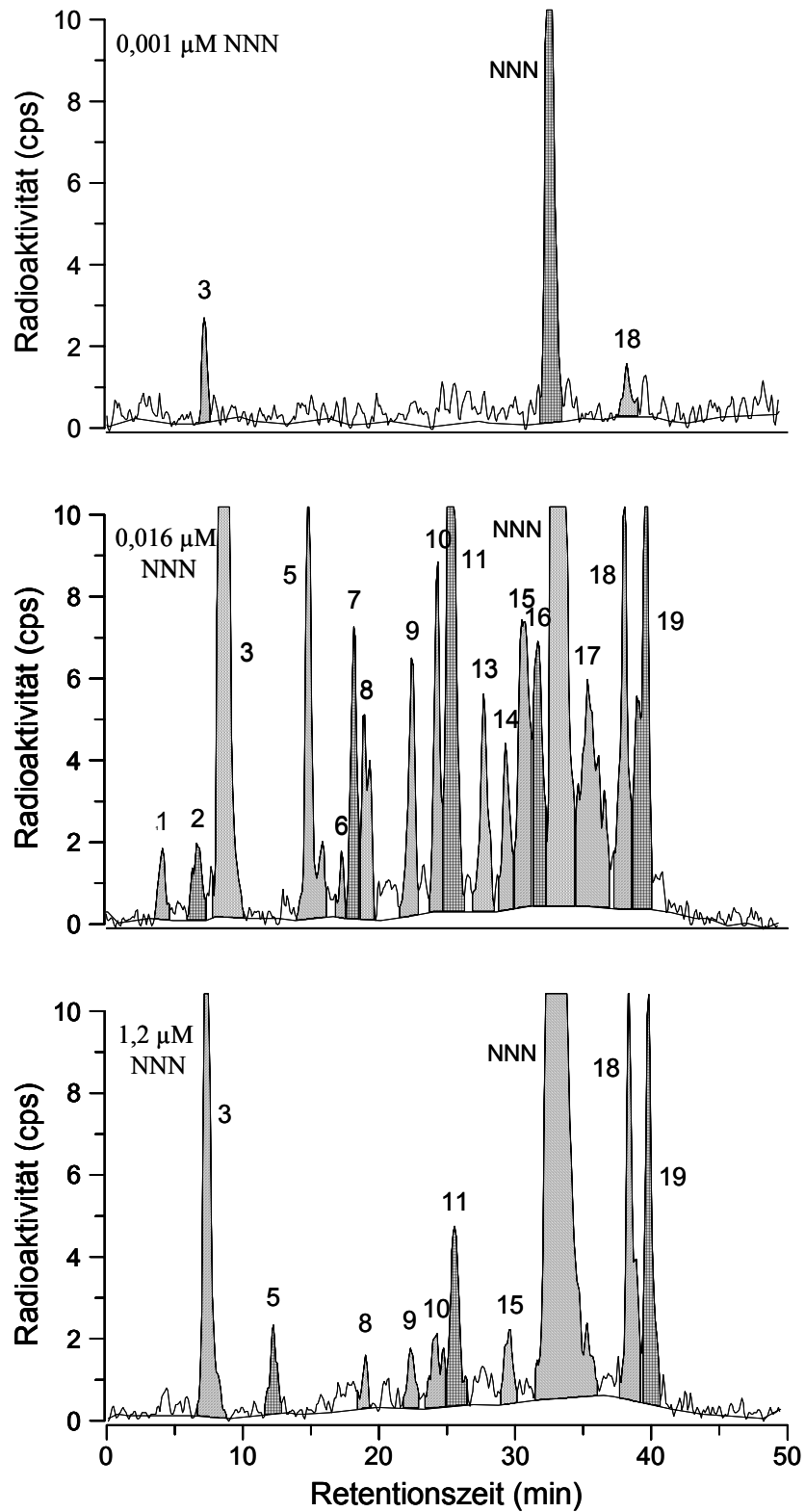


Abbildung 3-4a: HPLC-Radiochromatogramme zum konzentrationsabhängigen Metabolismus von NNN in Leberschnitten von Menschen nach 6 Stunden Inkubation

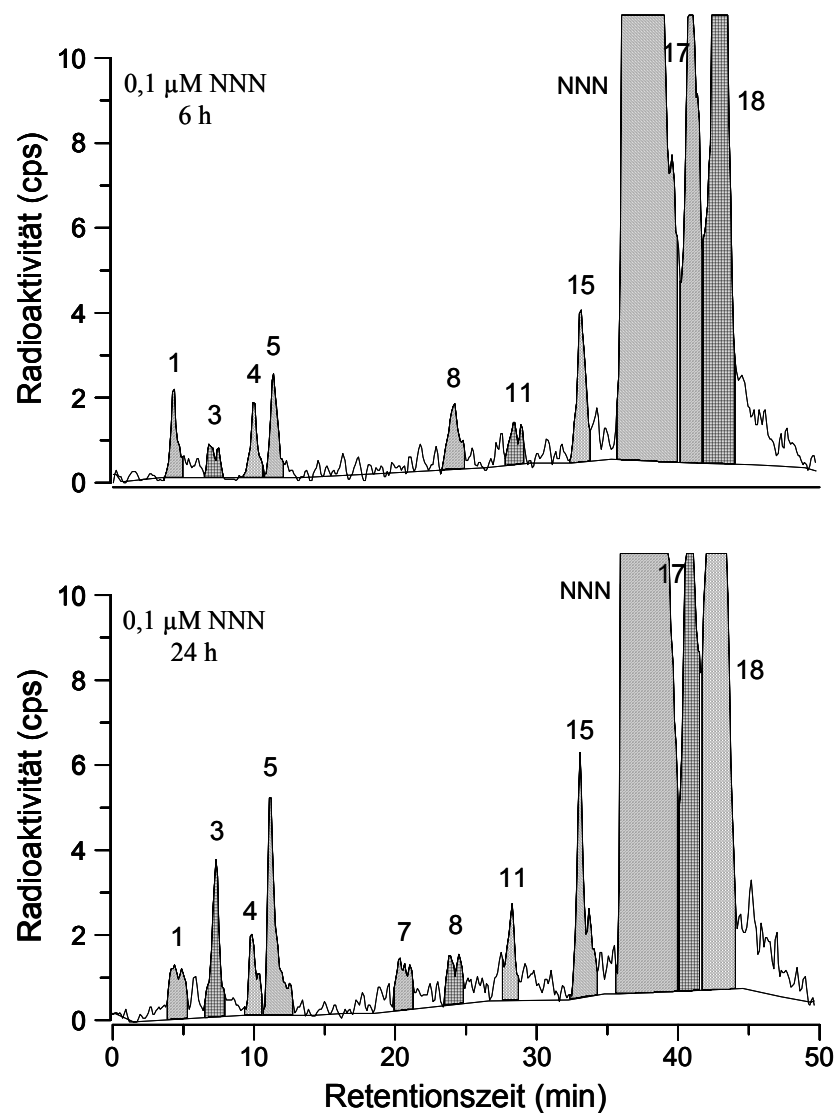


Abbildung 3-4b: Zeitabhängiger Metabolismus von NNN in Lungenschnitten von Menschen bei konstanter Konzentration

3.4.4. Myosmin

Die Auswertung der mit NNN inkubierten Ansätze ohne Lungen- und Leberschnitte, die im folgenden als Leerwerte bezeichnet werden und zu jeder Spezies, jedem Organ und jeder NNN-Konzentration zusätzlich mit inkubiert wurden zeigte, dass etwa 3 bis 5,5% an radioaktiv markiertem Myosmin als „Verunreinigung“ in den Ansätzen nachzuweisen war. Nach Abzug der jeweiligen Leerwerte von den Myosminwerten aus den Ansätzen der inkubierten Gewebeschnitte ergaben sich insbesondere für die Leber zum Teil negative Ergebnisse. Dies

lässt auf eine Verstoffwechslung des Myosmins durch die Gewebeschnitte schließen. Die Mittelwerte und Standardfehler des Myosminumsatzes nach Abzug der Leerwerte sind in nachfolgender Tabelle 3-3 vergleichend zusammengefasst.

Um diesen Verdacht zu erhärten und erste Erkenntnisse über die Stoffwechselprodukte des Myosmins in Gewebeschnitten zu erhalten, wurden Leber- und Lungenschnitte der Ratte 6 Stunden mit 0,001 μM bis 5 μM radioaktiv markiertem Myosmin inkubiert. Die Auswertung dieser Versuchsansätze ergab, dass in der Leber im Mittel 31,6%, in der Lunge 11,5% des Myosmins verstoffwechselt wurde. Die Auswertung der Metaboliten beschränkte sich auf diejenigen, die durch Co-Chromatographie identifiziert werden konnten.

Tabelle 3-3: Myosminumsätze der verschiedenen Spezies nach 6 h Inkubation mit 0,001 μM – 1,2 μM NNN und Abzug der jeweiligen Leerwerte in fmol/min/mg Protein (MW \pm SE, N = 3)

NNN (μM)	Maus		Ratte		Mensch	
	Leber	Lunge	Leber	Lunge	Leber	Lunge (0,1 μM)
0,001	0,92 \pm 0,87	2,39 \pm 1,37	-0,61\pm1,05	1,70 \pm 1,46	1,56 \pm 1,97	
0,004	0,65 \pm 0,17	0,63 \pm 0,54	-2,02\pm1,09	0,57 \pm 1,22	-0,85\pm0,29	(6h)
0,016	0,69 \pm 0,34	0,81 \pm 0,77	-1,59\pm0,82	1,54 \pm 1,39	-1,26\pm1,80	-0,025\pm0,004
0,05	0,56 \pm 0,12	1,51 \pm 0,67	-0,50\pm1,42	2,02 \pm 1,14	-2,30\pm0,03	(24h)
0,2	0,25 \pm 0,66	0,65 \pm 0,60	0,27 \pm 1,02	1,59 \pm 1,29	-1,96\pm0,16	-0,008\pm0,003
0,5	0,55 \pm 0,28	0,79 \pm 0,52	0,44 \pm 1,05	1,58 \pm 1,36	-2,15\pm0,18	
0,8	0,73 \pm 0,47	1,17 \pm 0,70	0,07 \pm 0,83	2,08 \pm 1,30	-1,72\pm0,05	
1,2	0,42 \pm 0,40	1,36 \pm 0,84	0,28 \pm 0,88	1,92 \pm 1,39	-1,89\pm0,07	

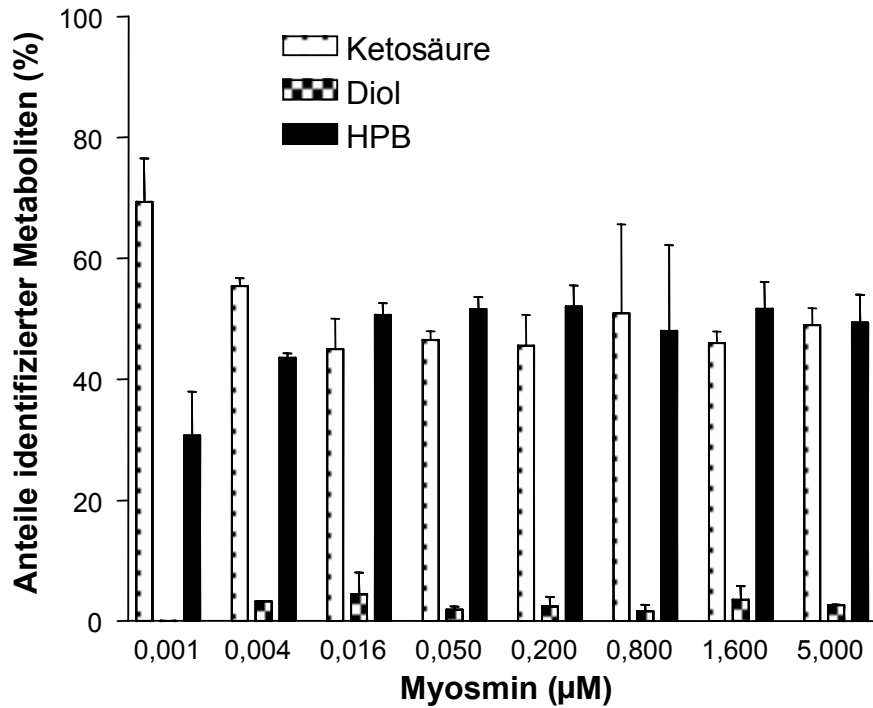


Abbildung 3-5a: Metabolitenanteile nach 6 h Inkubation von Leberschnitten der Ratte mit 0,001 µM – 5 µM Myosmin (MW±SE, N = 3)

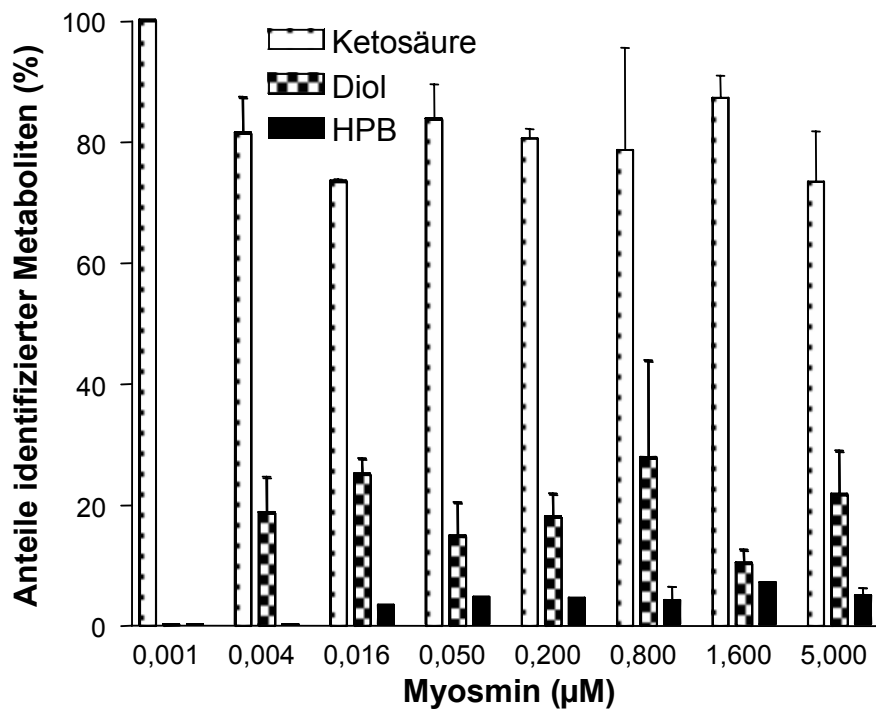


Abbildung 3-5b: Metabolitenanteile nach 6 h Inkubation von Lungenschnitten der Ratte mit 0,001 µM – 5 µM Myosmin (MW±SE; N = 3)

Demnach entstanden in der Leber aus dem verstoffwechselten Myosmin zu etwa gleichen Teilen die Metaboliten Ketosäure (46,7%) und Ketoalkohol (42,9%). Diol entstand nur zu 2,5% (Abb. 3-5a). Die Metabolitenverteilung in der Lunge weist dagegen die Ketosäure mit 55,1% als eindeutigen Hauptmetaboliten aus. Anders als in der Leber wurde in der Lunge mehr Diol (11,9%) als Ketoalkohol (2,8%) gebildet (Abb. 3-5b).

3.5. Kinetik der Metabolisierung von NNN in Gewebeschnitten

Aus den Chromatogrammen wurde anhand der prozentualen Flächenanteile der einzelnen Metaboliten im Verhältnis zur Gesamtfläche über der Basislinie, die der jeweiligen eingesetzten Menge des Nitrosamins entsprach, die Umsätze für jeden Metaboliten in den verschiedenen Konzentrationen auf Basis der durchschnittlichen Proteingehalte der Schnitte berechnet (Tab. A1-A5). Anhand der so berechneten Umsätze wurde bei regelmäßigem Auftreten eines Metaboliten über den untersuchten Konzentrationsbereich eine Reaktionskinetik nach Michaelis-Menten angepasst. Nachdem in einigen Fällen keine einheitliche Kinetik über den gesamten Konzentrationsbereich angepasst werden konnte, wurden diejenigen Konzentrationsbereiche mit der jeweils besten Anpassung (höchste Korrelation, r) für die graphische und tabellarische Darstellung verwendet. Die Untersuchungen an der Humanlunge wurden ausgenommen, da aufgrund des geringen Probenmaterials keine Konzentrationsreihen inkubiert werden konnte, sondern nur eine Zeitabhängigkeit bei konstanter Konzentration untersucht wurde.

3.5.1. Kinetik der Metabolisierung von NNN bei der Maus

Die Anpassung der Kinetiken für die untersuchten Organe der Maus ergaben für die Leber k_m -Werte unter 12 μM und für die Lunge k_m -Werte unter 4 μM (Tab. 3-4, Abb. 3-6a und 3-6b). Ein Vergleich der intrinsischen Clearance der jeweiligen Organe zeigt, dass die Werte bei der Lunge um das 10- bis 20-fache höher liegen als bei der Leber. Für den Metaboliten Norcotin lag die intrinsische Clearance der Lunge lediglich um das 5-fache höher.

In der Leber der Maus wurden Diol und vor allem sein Folgemetabolit Hydroxysäure in höherem Maße gebildet als die 2'-Hydroxylierungsprodukte Ketosäure und Ketoalkohol. Diesbezüglich verhielt es sich bei der Lunge entgegengesetzt. Hier zeigte sich, dass die Verstoffwechslung von NNN in der Lunge hauptsächlich über die 2'-Hydroxylierung verläuft. Die intrinsische Clearance des Abbaus über Ketosäure und Ketoalkohol ist doppelt so hoch

Tabelle 3-4: Michaelis-Menten Kinetiken der NNN-Metaboliten bei Leber- und Lungenschnitten von Maus, Ratte und Mensch nach 6 Stunden Inkubation mit 0,004 μM -1,2 μM (MW \pm SE; N = 6).

Die Cl_{intr} entspricht dem Quotienten aus den Mittelwerten für V_{max} (fmol/min/mg Protein) und k_m (μM).

Metabolit	Maus						Ratte						Mensch		
	Leber			Lunge			Leber			Lunge			Leber		
	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}
Hydroxysäure	138 \pm 91	2,7 \pm 2,4	51	689 \pm 393	1,3 \pm 1,2	534	22 \pm 50	6,9 \pm 18,2	3	54 \pm 10	0,12 \pm 0,09	464	87 \pm 33	2,5 \pm 1,3	4
Ketosäure	316 \pm 789	8,8 \pm 24	36	816 \pm 424	1,1 \pm 1,0	724	21 \pm 20	5,2 \pm 5,8	4	48 \pm 10	0,17 \pm 0,13	288	12 \pm 5 ^a	3,2 \pm 1,7	4
Diol	8,3 \pm 12	1,3 \pm 3,2	6	keine Anpassung möglich			4 \pm 5	1,4 \pm 2,4	3	4 \pm 3	0,17 \pm 0,5	22	3 \pm 2 ^a	1,0 \pm 1,2	3
Norcotinin	167 \pm 134	3,3 \pm 3,4	50	931 \pm 2023	3,3 \pm 9,2	283	32 \pm 35	4,2 \pm 5,6	8	14 \pm 4	0,06 \pm 0,08	247	5,2 \pm 1,7 ^b	0,35 \pm 0,17	15
Ketoalkohol	20 \pm 17 ^a	0,9 \pm 1,3	23	989 \pm 1664 ^a	2,0 \pm 4,4	499	3 \pm 1	0,44 \pm 0,46	6	26 \pm 8	0,08 \pm 0,09	328	0,9 \pm 1,3 ^a	0,2 \pm 2,13	5
2'-OH	580 \pm 1631	11 \pm 35	50	3178 \pm 3875	3,1 \pm 4,9	1028	12 \pm 4	1,2 \pm 0,6	10	60 \pm 11	0,1 \pm 0,1	734	1,6 \pm 0,6 ^a	0,2 \pm 0,3	7
5'-OH	140 \pm 96	2,4 \pm 2,3	57	792 \pm 536	1,4 \pm 1,5	559	18 \pm 20	3,0 \pm 4,2	6	57 \pm 11	0,12 \pm 0,09	489	24 \pm 17	0,8 \pm 1,1	30

^aBerechnet für den Konzentrationsbereich bis 0,8 μM

^bBerechnet für den Konzentrationsbereich bis 0,5 μM

als die der 5'-Hydroxylierung. Das Verhältnis von 2'/5'-Hydroxylierung ergab bei der Mäuselober 0,9, bei der Mäuselunge 1,8. Sowohl bei der Leber als auch bei der Lunge konnte eine Kinetik des Ketoalkohols nur bis zur Konzentration 0,8 μM angepasst werden, wogegen für den Metaboliten Diol bei der Lunge keine Kinetik angepasst werden konnte.

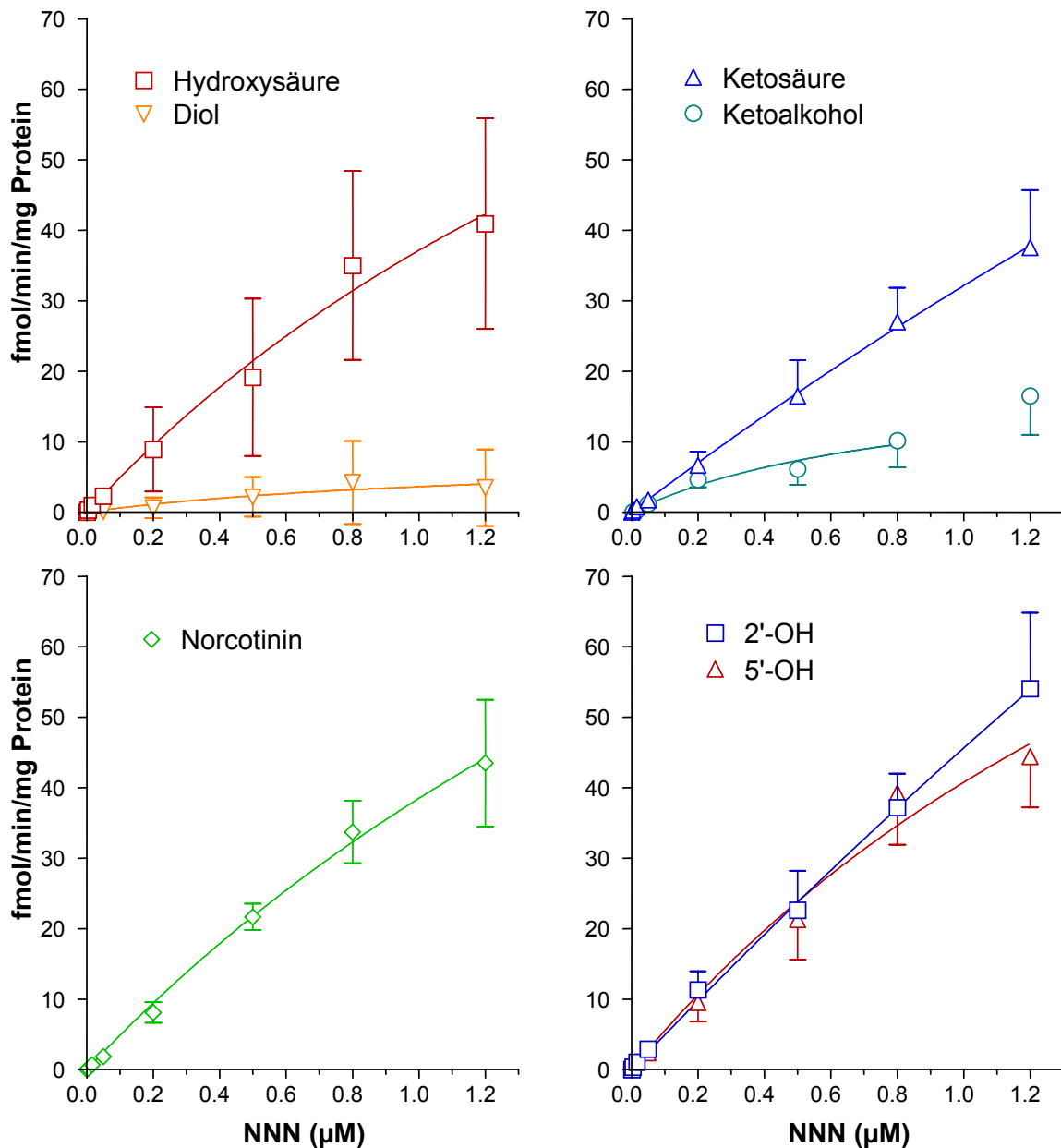


Abbildung 3-6a: Anpassung der Umsatzraten von NNN in Leberschnitten von Mäusen zu einzelnen Metaboliten und der Summe der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $\text{MW} \pm \text{SE}$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4).

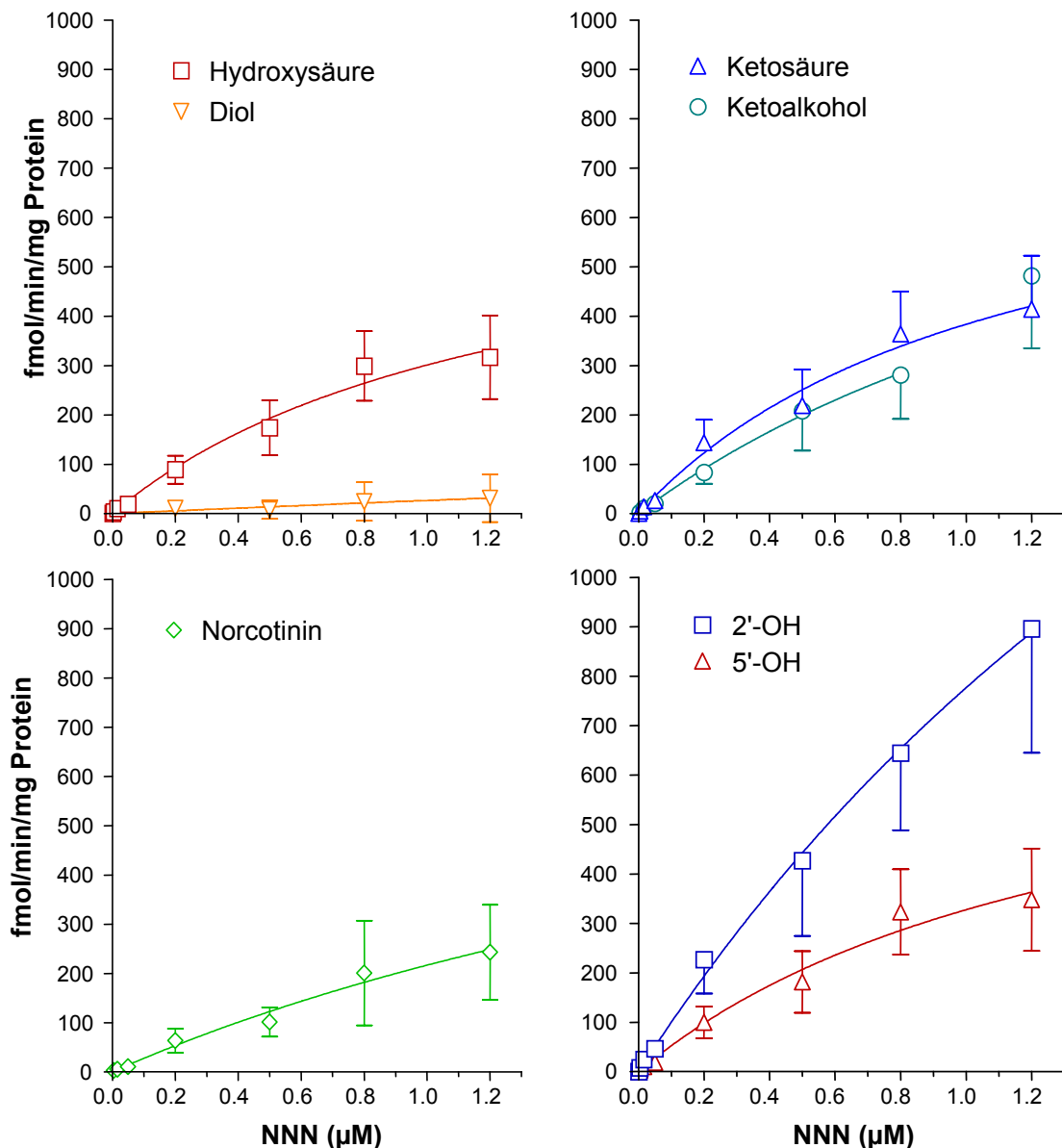


Abbildung 3-6b Anpassung der Umsatzraten von NNN in Lungenschnitten von Mäusen zu einzelnen Metaboliten und der Summe der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $MW \pm SE$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4).

3.5.2. Kinetik der Metabolisierung von NNN bei der Ratte

Im Gegensatz zur Maus zeigt sich bei der Ratte sowohl bei der Leber als auch bei der Lunge ein geringerer NNN-Umsatz. Die Werte der intrinsischen Clearance liegen bei der Rattenleber um das 5 bis 10-fache unter den Werten der Mäuseleber. Bei der Lunge ist der Unterschied zwischen Maus und Ratte weniger ausgeprägt. Für die Rattenleber ergeben sich k_m -Werte bis $7 \mu\text{M}$, für die Rattenlunge wurden k_m -Werte unter $0,2 \mu\text{M}$ berechnet (Tab. 3-4, Abb. 3-7a und 3-7b). Die intrinsische Clearance der Summe aus Ketosäure und Ketoalkohol lag bei der Lunge um das 70-fache höher als bei der Leber. Die der Summen aus Diol und Hydroxysäure

lag um das 80-fache über der intrinsischen Clearance der Leber. Sowohl in der Leber als auch in der Lunge dominierte der Abbau des eingesetzten NNN über die 2'-Hydroxylierung. Das Verhältnis von 2'- zu 5'-Hydroxylierung ergab bei der Rattenlunge eine Rate von 1,5, bei der Leber 1,7. Die intrinsische Clearance des Norcotinins lag bei der Rattenleber unter den Einzelmetaboliten am höchsten. Bei der Rattenlunge spielte der Abbau über das Norcotinin, verglichen mit den übrigen Metaboliten dagegen eine kleinere Rolle. Die Anpassung der Kinetik war bei der Ratte sowohl für die Leber, als auch für die Lunge über den gesamten Konzentrationsbereich möglich.

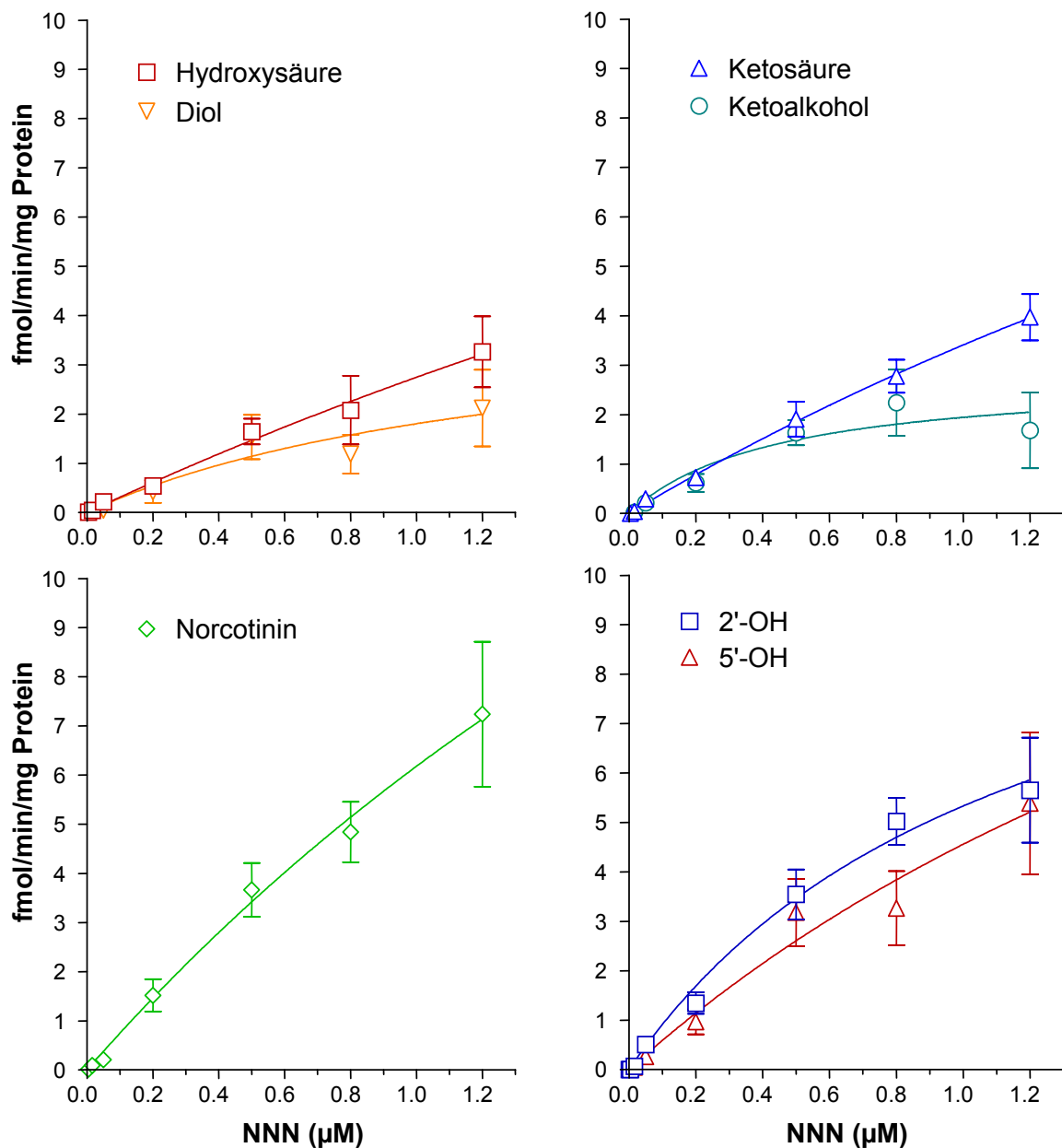


Abbildung 3-7a: Anpassung der Umsatzraten von NNN in Leberschnitten von Ratten zu einzelnen Metaboliten und der Summe der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $MW \pm SE$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4).

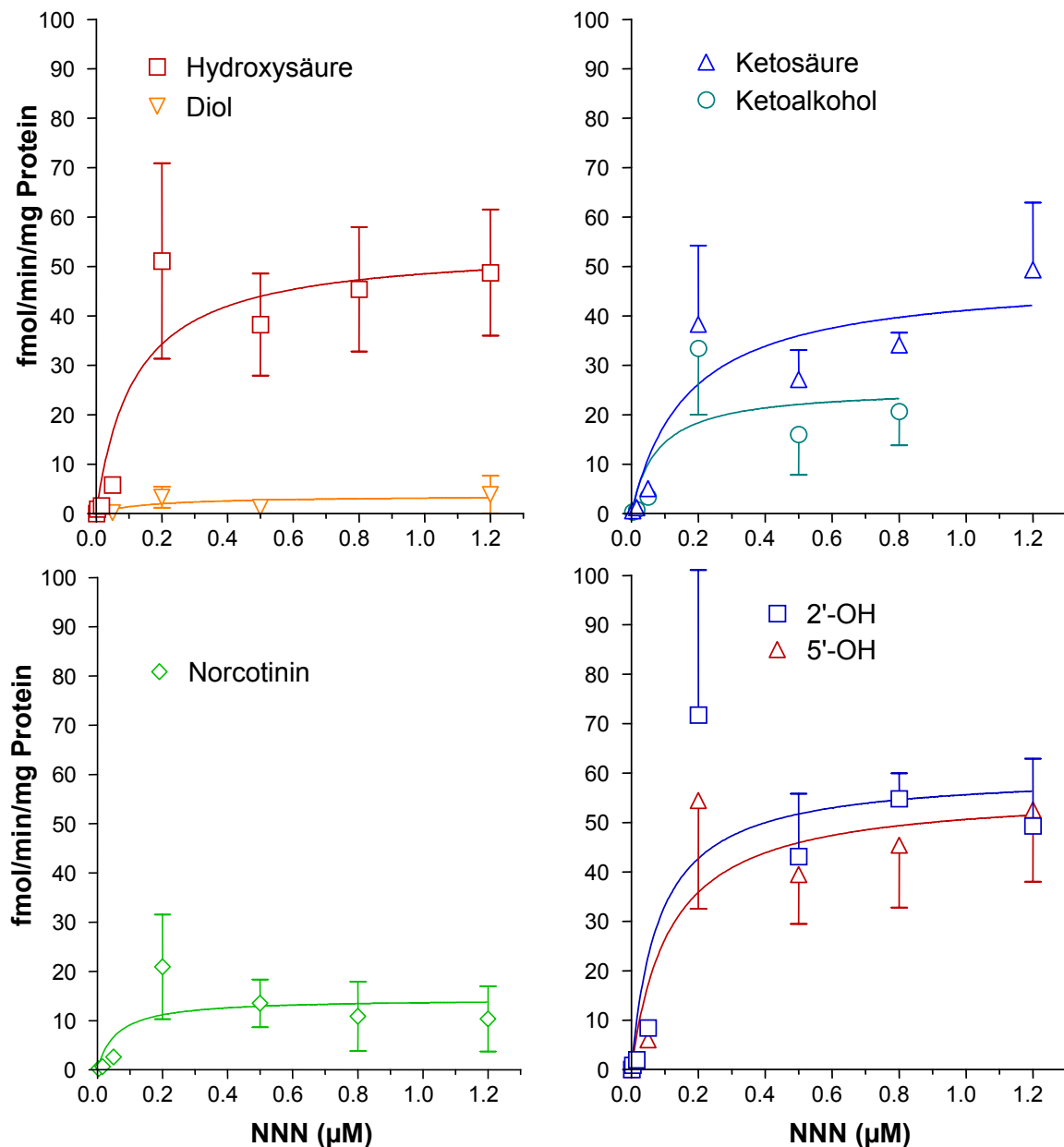


Abbildung 3-7b: Anpassung der Umsatzraten von NNN in Lungenschnitten von Ratten zu einzelnen Metaboliten und der Summe der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $MW \pm SE$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4).

3.5.3. Kinetik der Metabolisierung von NNN beim Menschen

Die Ergebnisse aus der Inkubation der Humanleberschnitte mit NNN zeigen eine deutliche Dominanz der Verstoffwechslung über die 5'-Hydroxylierung. Das Verhältnis von 2'/5'-Hydroxylierung ergab bei der Humanlunge eine Rate von 0,2. Die k_m -Werte für die Hydroxysäure und das Diol lagen bei 2,5 bzw. 1,0 μM , für den Metaboliten Ketosäure bei 3,2 μM . Die übrigen k_m -Werte lagen alle unter 1. Die intrinsische Clearance der Humanleber ergab Werte, die sich denen der Rattenleber annähern. Bis auf das Norcotin und die Summe der

5'-Hydroxylierung ergaben sich diesbezüglich Werte zwischen 3 und 7. Die intrinsische Clearance des Metaboliten Norcotinin und die der 5'-Hydroxylierung lagen mit 15 und 30 weit über der der restlichen Metaboliten (Tabelle 3-4, Abbildung 3-8). Die Anpassung der Kinetik des Norcotinins war nur bis zur Konzentration 0,2 μM möglich. Die Kinetiken der Metaboliten der 2'-Hydroxylierung konnten bis zum Konzentrationsbereich 0,8 μM angepasst werden.

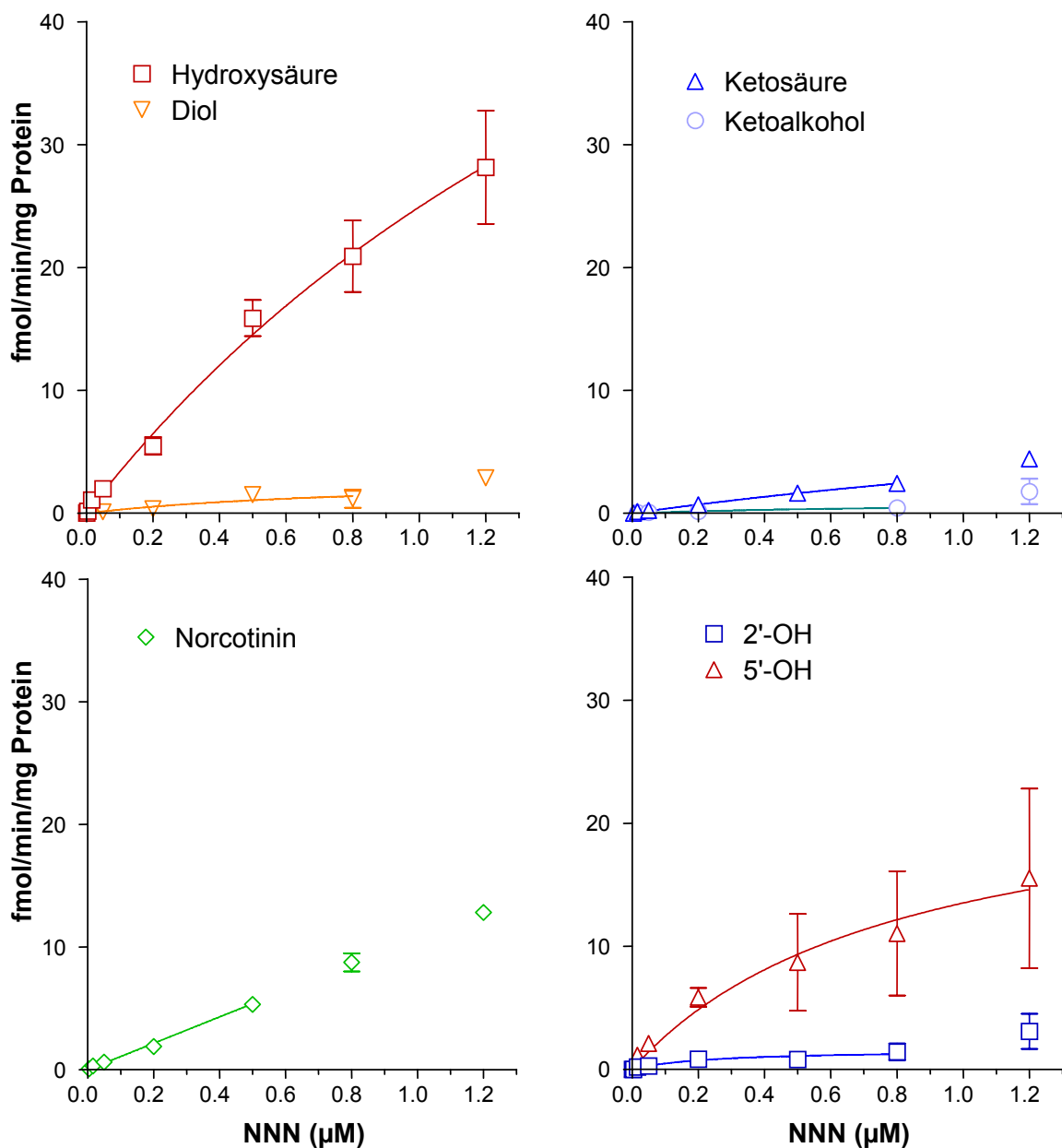


Abbildung 3-8a: Anpassung der Umsatzraten von NNN in humanen Leberschnitten zu einzelnen Metaboliten und der Summe der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $\text{MW} \pm \text{SE}$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4).

3.6. Beeinflussung des NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten

Zur Untersuchung der Hemmung des NNN-Metabolismus wurden die Organschnitte neben den verschiedenen NNN-Konzentrationen zusätzlich mit Nicotin, Cotinin oder PEITC inkubiert. Die Ergebnisse der Versuche sind im Anhang nach Spezies, Organ und Hemmstoff tabellarisch zusammengefasst (Tabellen A7 bis A24). Der Umsatz wird einerseits in Prozent der Kontrolle angegeben und andererseits als spezifische Aktivität in fmol/min/mg Protein, aus der auch die Michaelis-Menten Kinetik abgeleitet wurde. Wegen des geringen bzw. fehlenden Umsatzes von NNN bei 0,001 μM wurden die Hemmversuche für diese Konzentration nicht in die allgemeine Auswertung aufgenommen, sondern nur in Einzelfällen besprochen.

3.6.1. Hemmung durch Nicotin

Um den Einfluss des Alkaloids Nicotin auf den NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten zu untersuchen, wurden alle Versuchsansätze zusätzlich zu den angegebenen NNN-Konzentrationen mit 5 μM Nicotin inkubiert. Das bedeutet einen 4,2- bis 5000-fachen molaren Überschuss von Nicotin gegenüber NNN. Es fanden die gleichen wie unter Kapitel 2.2 beschriebenen Methoden zur Inkubation, Analyse und Auswertung Anwendung. Die Berechnungen zur Kinetik aus den mit 5 μM Nicotin gehemmten Versuchsansätzen sind nach Spezies und Organ in der Tabelle 3-5 zusammengefasst.

3.6.1.1. Maus

3.6.1.1.1. Metabolismus

Wie aus den Tabellen A7 und A8 im Anhang ersichtlich, konnte für die niedrigste NNN-Konzentration (0,001 μM) weder bei der Leber noch bei der Lunge ein Umsatz nachgewiesen werden. Bei einer NNN-Konzentration von 0,004 μM konnten nach Hemmung mit Nicotin nur die Metaboliten Hydroxysäure, Ketosäure und bei der Leber zusätzlich Norcotinin identifiziert werden. In den Abbildungen 3-9a und 3-9b werden die Ergebnisse der mit Nicotin gehemmten Versuchsansätze mit den Ergebnissen aus den Kontrollansätzen ins Verhältnis gesetzt. Dabei wurden die Metaboliten der 2'- und 5'-Hydroxylierung in der Summe dargestellt.

Tabelle 3-5: Michaelis-Menten Kinetiken der NNN-Metaboliten bei Leber- und Lungenschnitten von Maus, Ratte und Mensch nach 6 Stunden Inkubation mit 0,004 μM -1,2 μM und zusätzlich je 5 μM Nikotin (MW \pm SE; N = 6).

Die Cl_{intr} entspricht dem Quotienten aus den Mittelwerten für V_{max} (fmol/min/mg Protein) und k_m (μM).

Metabolit	Maus						Ratte					
	Leber			Lunge			Leber			Lunge		
	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}
Hydroxysäure	28 \pm 6	0,30 \pm 0,20	95	208 \pm 155 ^a	0,67 \pm 0,92	311	6,0 \pm 6,3 ^a	1,5 \pm 2,2	4	37 \pm 20	0,48 \pm 0,62	77
Ketosäure	32 \pm 8	0,51 \pm 0,29	64	220 \pm 196 ^b	0,68 \pm 0,95	324	14 \pm 71	3,7 \pm 19,74	4	4 \pm 3 ^a	0,17 \pm 0,38	23
Diol	0,94 \pm 0,63 ^a	0,11 \pm 0,30	9	zu wenig Umsatz			1,4 \pm 1,0 ^a	0,60 \pm 0,86	2	zu wenig Umsatz		
Norcotin	223 \pm 309	5,4 \pm 8,9	41	167 \pm 121 ^a	0,88 \pm 1,0	190	11 \pm 16 ^b	1,7 \pm 3,0	6	12 \pm 20	0,74 \pm 2,56	16
Ketoalkohol	10 \pm 5	0,44 \pm 0,60	23	155 \pm 113 ^b	0,36 \pm 0,52	430	2,0 \pm 1,0 ^a	0,47 \pm 0,49	4	zu wenig Umsatz		
2' OH	35 \pm 8	0,36 \pm 0,23	99	358 \pm 223 ^b	0,48 \pm 0,53	749	13 \pm 5 ^a	1,8 \pm 0,8	7	13 \pm 20 ^a	0,9 \pm 2,3	15
5' -OH	27 \pm 6	0,26 \pm 0,18	105	208 \pm 142 ^a	0,67 \pm 0,84	312	6,7 \pm 3,2 ^a	1,1 \pm 0,8	6	37 \pm 18	0,47 \pm 0,58	78

^aBerechnet für den Konzentrationsbereich bis 0,8 μM

^bBerechnet für den Konzentrationsbereich bis 0,5 μM

Eine Hemmung des Metabolismus von NNN konnte bei der Mäuseleber nur für die Konzentrationen 0,05 μM und 0,5 μM nicht bestätigt werden. Bei allen übrigen Konzentrationen ist eine deutliche Verringerung der Metabolitenbildung zu erkennen. Über die 2'-Hydroxylierung wurden Umsatzwerte von 46 - 81%, über die 5'-Hydroxylierung 41 - 84% des Kontrollumsatzes erreicht. Die Bildung des Metaboliten Norcotinin reduzierte sich durch die Inkubation mit Nicotin auf 67 - 93% des Kontrollumsatzes (Abb. 3-9a).

Wie in Abbildung 3-9b zu erkennen, hatte das Nicotin auf den Umsatz von NNN in Lungenschnitten der Maus auf alle Stoffwechselwege und über den gesamten Konzentrationsbereich einen stark hemmenden Effekt. Die 2'-Hydroxylierung reduzierte sich auf 4 - 79%, die 5'-Hydroxylierung auf 3 - 93% und die Bildung von Norcotinin auf 20 - 91% des Kontrollumsatzes.

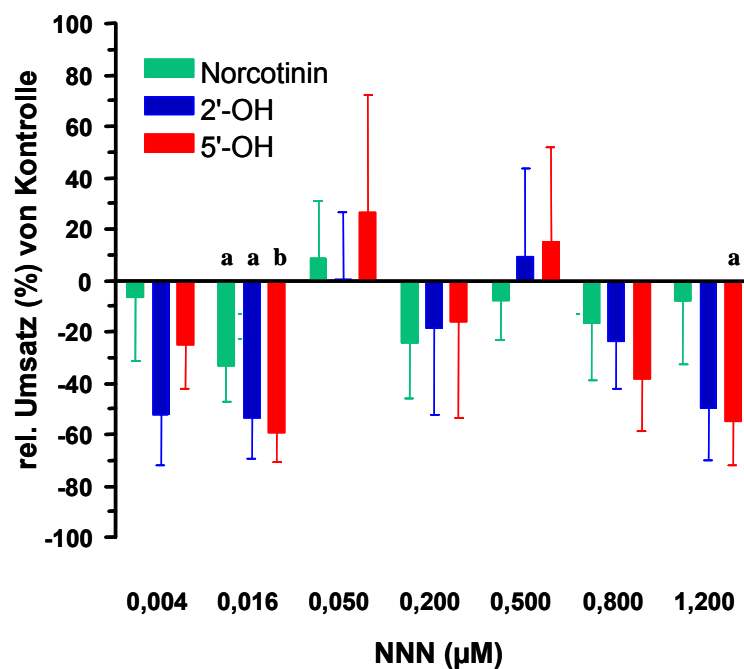


Abbildung 3-9a: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Leberschnitten von Mäusen mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 5 μM Nicotin (MW \pm SE; N = 6). a, b: Signifikant verschieden zur Kontrolle, $p < 0,05$ (a) und $p < 0,01$ (b).

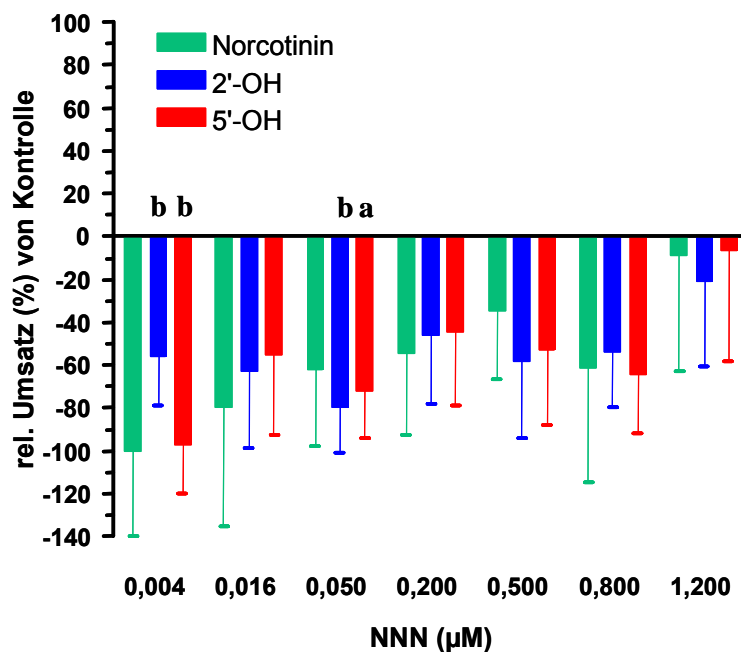


Abbildung 3-9b: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Lungenschnitten von Mäusen mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 5 µM Nicotin (MW±S.E. ; N = 6). a, b: Signifikant verschieden zur Kontrolle, p<0,05 (a) und p<0,01 (b).

3.6.1.1.2. Kinetik

Durch die zusätzliche Inkubation der Versuchsansätze mit 5 µM Nicotin konnte sowohl bei der Mäuseleber als auch der Mäuselunge ein Effekt auf die Anpassung der Kinetiken beobachtet werden. Im Vergleich mit den Ergebnissen aus den Kontrollansätzen fielen sowohl bei Leber als auch bei Lunge die k_m -Werte von 12 µM bzw. 4 µM auf unter 1 µM. Die einzige Ausnahme ergab sich für Norcotinin, dessen k_m -Wert sich bei der Leber annähernd verdoppelte (Abb. 3-10a und b, Tab. 3-4 und 3-5).

Die intrinsische Clearance der Mäuseleber für Hydroxysäure und Ketosäure verdoppelte sich durch die Inkubation mit Nicotin. Wogegen die intrinsische Clearance der übrigen Metaboliten unverändert blieb. Während die intrinsische Clearance der Metaboliten bei der Leber anstieg, zeigte sich bei der Mäuselunge der gegenteilige Effekt. Sowohl bei den Metaboliten der 2'-Hydroxylierung, Ketosäure und Ketoalkohol, als auch bei Hydroxysäure und Norcotinin reduzierte sich die intrinsische Clearance teilweise bis um die Hälfte. Eine Kinetik zum Metaboliten Diol konnte nicht angepasst werden.

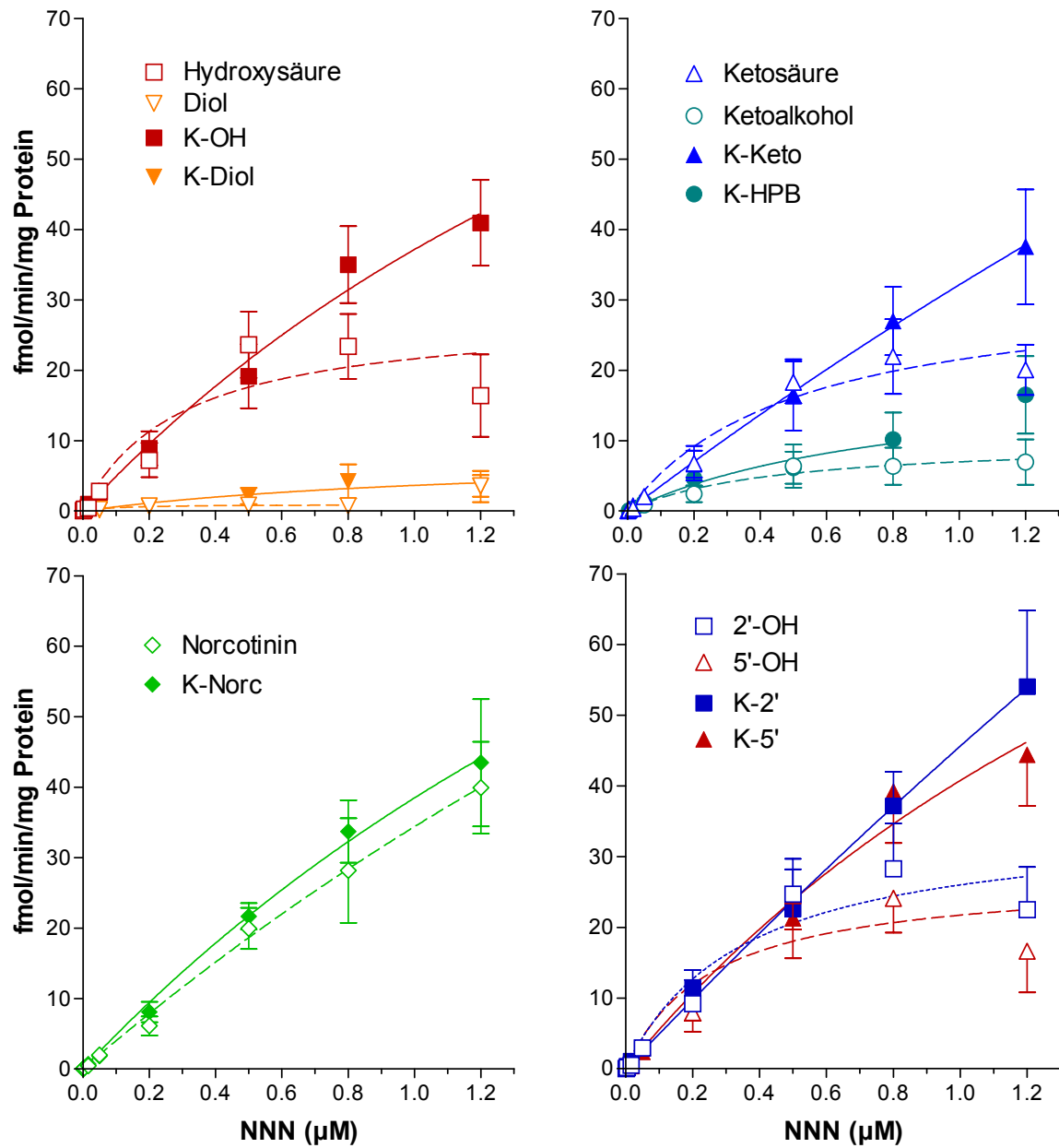


Abbildung 3-10a: Effekt von 5 µM Nicotin auf die Anpassung der Umsatzraten in Leberschnitten von Mäusen von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $MW \pm SE$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4 und 3-5).

Die zusätzliche Inkubation der Rattenleberschnitte mit Nicotin ergaben insgesamt keine signifikante Absenkung der Metabolitenbildung unter die Kontrollwerte. Es ist jedoch zu erkennen, dass die 2'-Hydroxylierung in der Tendenz stärker gehemmt wird als die 5'-Hydroxylierung. So fand hinsichtlich 2'-Hydroxylierung eine Reduzierung der Metabolitenbildung im Konzentrationsbereich 0,05 bis 0,8 μM auf 62 - 92% der Kontrolle statt, während eine Hemmung der 5'-Hydroxylierung nur bei der Konzentration 0,5 μM auf 70% und 0,8 μM auf 87% der Kontrolle erreicht werden konnte. Ein Rückgang der Bildung von Norcotinin ergab sich nur bei 0,2 μM und 0,5 μM auf 78 bzw. 68% der Kontrolle (Abb. 3-11a).

Während sich bei der Rattenleber kein aussagekräftiger Effekt durch Nicotin auf den Metabolismus von NNN feststellen ließ, konnte bei der Rattenlunge über den gesamten Konzentrationsbereich eine signifikante Hemmung des NNN-Metabolismus durch Nicotin beobachtet werden (Abb. 3-11b). Dabei scheint auch bei der Rattenlunge, wie schon in der Leber, eine ausgeprägter Hemmung der 2'-Hydroxylierung zu bestehen. Es ergab sich eine Hemmung des Umsatzes für die 2'-Hydroxylierung um 57 - 98%, für die 5'-Hydroxylierung um 35 - 90% und für das Norcotinin um 32 - 94% des Umsatzes in den Kontrollen.

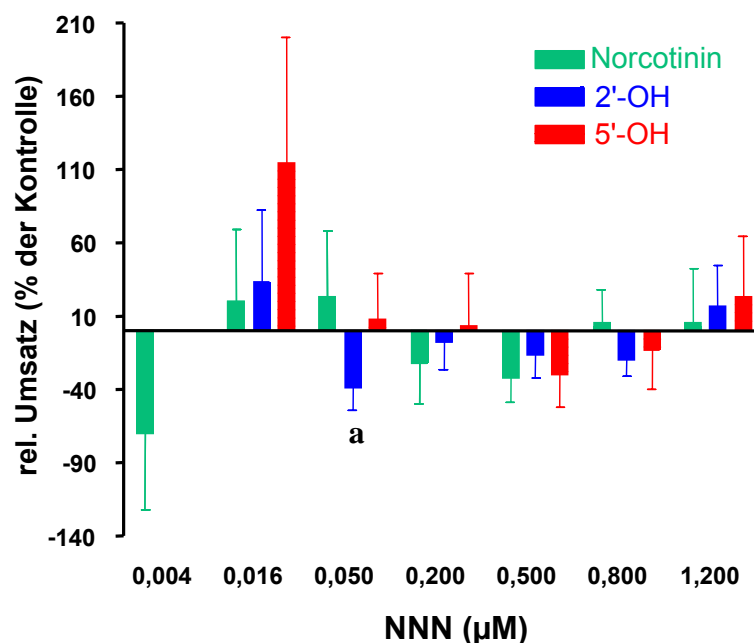


Abbildung 3-11a: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Leberschnitten von Ratten mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 5 μM Nicotin (MW \pm SE; N = 6). a: Signifikant verschieden zur Kontrolle, $p < 0,05$.

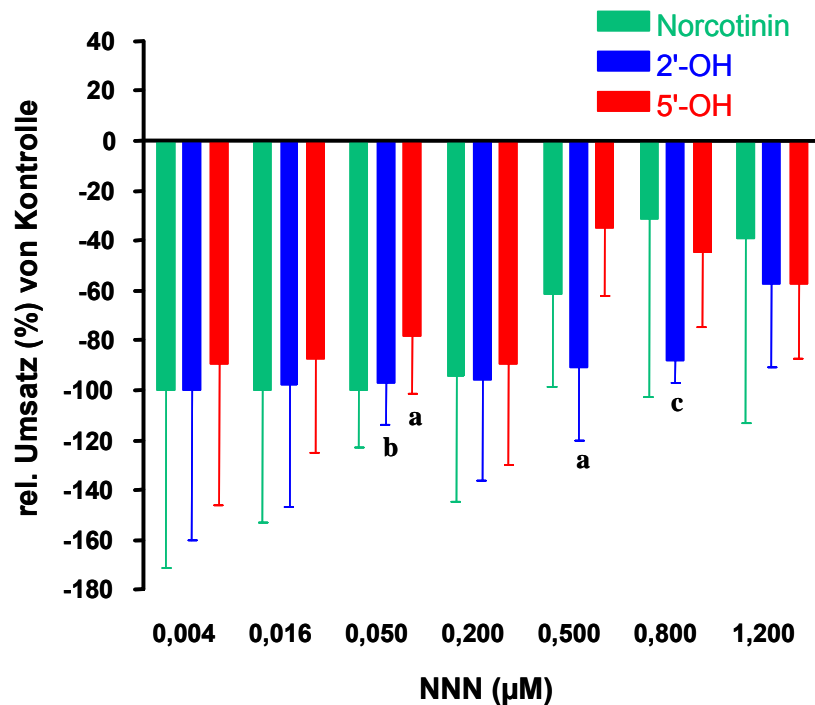


Abbildung 3-11b: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Lungenschnitten von Ratten mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 5 µM Nicotin (MW±SE; N = 6). a, b, c: Signifikant verschieden zur Kontrolle, $p < 0,05$ (a), $p < 0,01$ (b) und $p < 0,001$ (c).

3.6.1.2.2. Kinetik

Nach zusätzlicher Inkubation der Leber- und Lungenschnitte der Ratte mit 5 µM Nicotin konnte ebenso wie bei der Maus ein Einfluss auf die Anpassung der Kinetiken beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrolle stieg bei der Leber der k_m -Wert zur 2'-Hydroxylierung von 1,2 auf 1,8 µM leicht an, im Gegensatz dazu fiel der k_m -Wert zur 5'-Hydroxylierung von 18 µM auf 6,7 µM. Der k_m -Wert zur 2'-Hydroxylierung bei der Lunge stiegen um den Faktor 10, der zur 5'-Hydroxylierung um Faktor 4. Zu den Metaboliten Diol und Ketoalkohol konnte nach Inkubation mit Nicotin keine Kinetik angepasst werden (Abb. 3-12a und b, Tab. 3-4 und 3-5).

Die intrinsische Clearance der Leber blieb bei der Ratte weitgehend unverändert, wogegen sich bei der Rattenlunge, sowohl bei den einzelnen Metaboliten, als auch in den Summen der α -Hydroxylierungen ein starker Rückgang um das 6- bis 15-fache der Kontrollen beobachten ließ. Die intrinsische Clearance zur 2' Hydroxylierung bei der Lunge sank sogar um den Faktor 48.

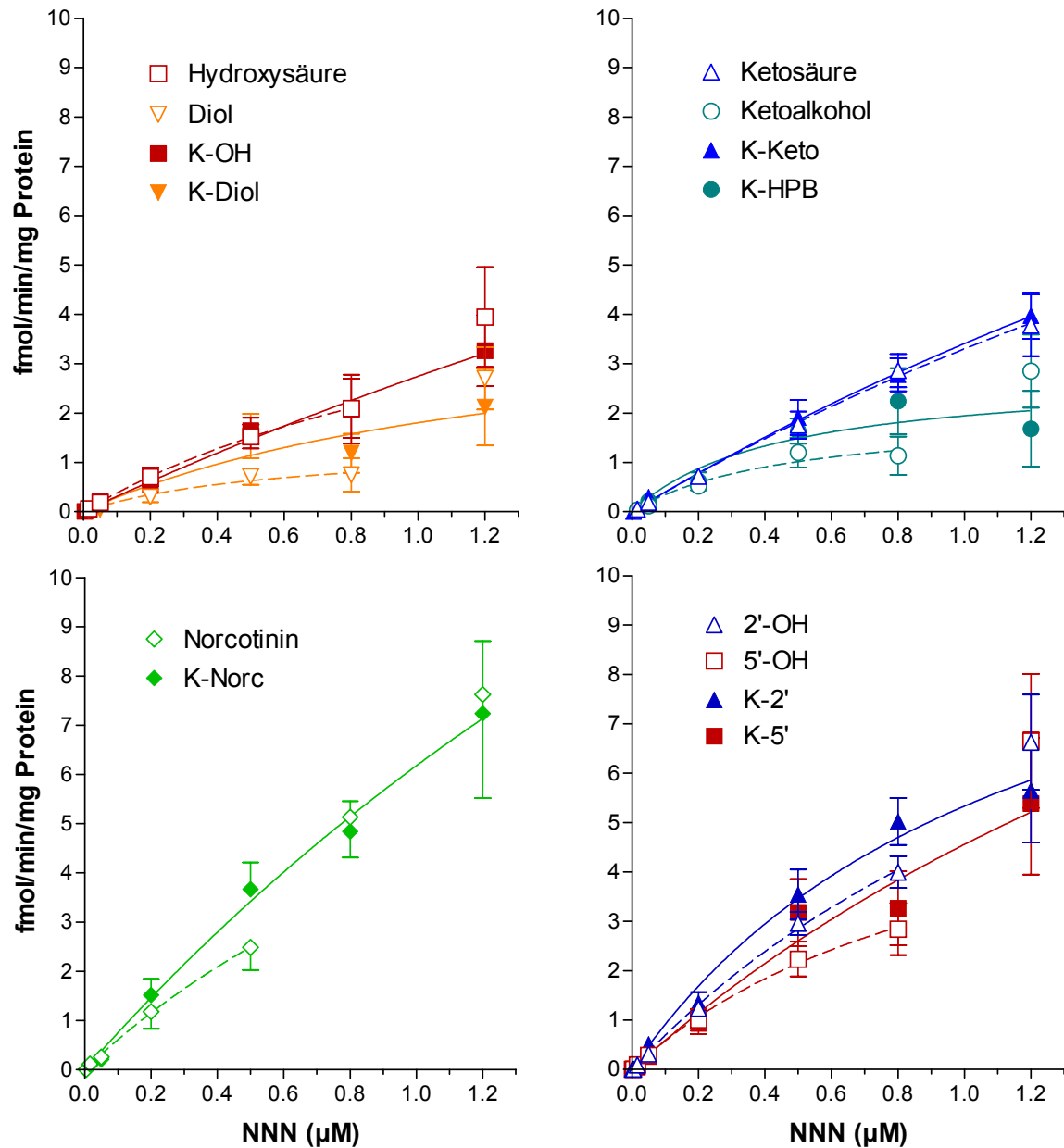


Abbildung 3-12a: Effekt von 5 µM Nicotin auf die Anpassung der Umsatzraten in Leberschnitten von Ratten von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik $MW \pm SE$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4 und 3-5).

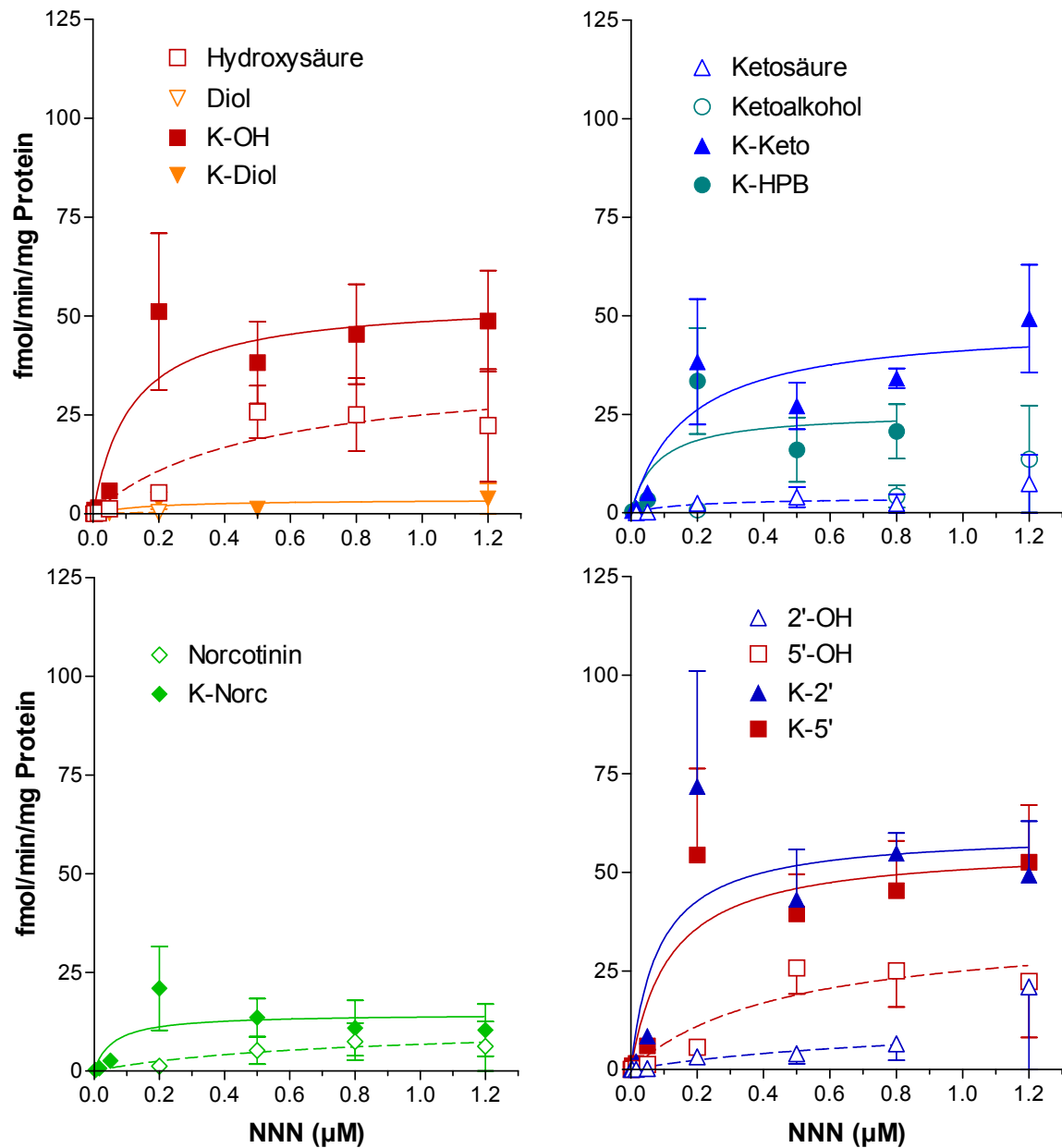


Abbildung 3-12b: Effekt von 5 μM Nicotin auf die Anpassung der Umsatzraten in Lungenschnitten von Ratten von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $\text{MW} \pm \text{SE}$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4 und 3-5).

3.6.1.3. Mensch

3.6.1.3.1. Metabolismus

Auch wenn die Anzahl der Schnitte aus humanem Lebergewebe nur gering war, konnte trotzdem ein Einblick bezüglich des Einflusses von 5 μM Nicotin auf den humanen NNN-Metabolismus gewonnen werden. So ergaben sich, wie aus Abbildung 3-13 ersichtlich, bis auf die Konzentrationen 0,004 μM und 0,8 μM auch bei humanem Lebergewebe deutliche Abnahmen der Metabolitenbildung durch Co-Inkubation mit 5 μM Nicotin. Über die 2'-Hydroxylierung wurden Umsatzwerte von nur 54 – 85% des Kontrollumsatzes erreicht, über die 5'-Hydroxylierung Werte von 52 – 94%. Die Bildung des Metaboliten Norcotinin reduzierte sich durch die Inkubation mit Nicotin auf 67 – 98%. Eine Gewichtung der Hemmung zu Gunsten eines Stoffwechselweges ist nicht auffällig. Zwar kann man in den niedrigeren Konzentrationen (bis 0,05 μM) eine stärkere Hemmung der 5'-Hydroxylierung ausmachen, was jedoch für die höheren Konzentrationen nicht der Fall ist.

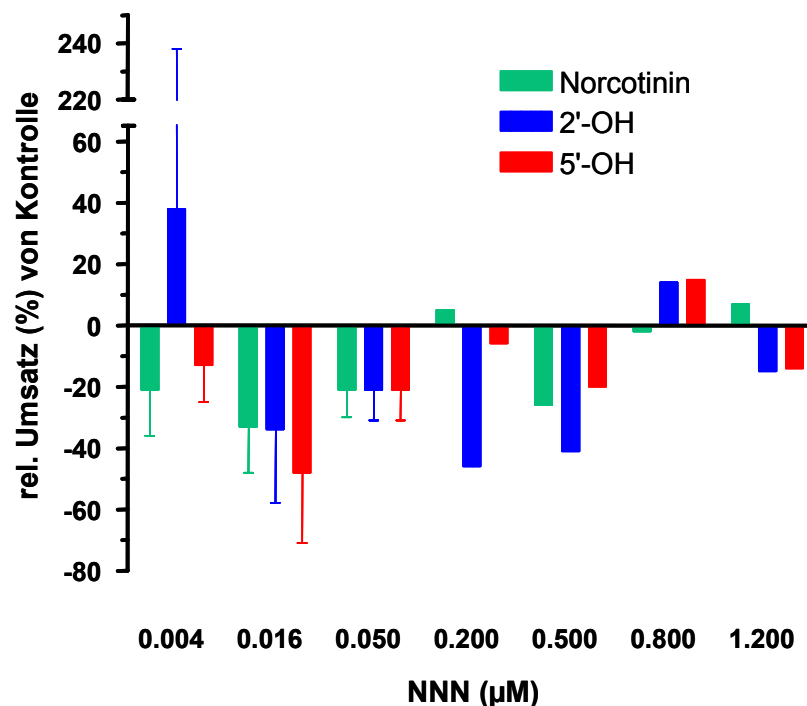


Abbildung 3-13: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Leberschnitten vom Menschen mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 5 μM Nicotin (MW \pm S.E., N = 3: 0,004 bis 0,05 μM ; N = 2: 0,2 und 0,5 μM , N = 1: 0,8 und 1,2 μM).

3.6.2. Hemmung durch Cotinin

Zur Untersuchung der Beeinflussung des NNN-Metabolismus durch Cotinin, dem Hauptmetaboliten des Nicotins, wurden die Ansätze der unterschiedlichen NNN-Konzentrationen mit jeweils 50 μM Cotinin inkubiert. Somit ergibt sich in Abhängigkeit von der NNN-Konzentration ein 42- bis 50000-facher molarer Überschuss an Cotinin. Die Analyse und die Auswertung erfolgte wie schon in Kapitel 3.5. beschrieben. Die Ergebnisse aus den Berechnungen zu den Michaelis-Menten-Kinetiken der mit Cotinin inkubierten Ansätze sind in Tabelle 3-6 dargestellt.

3.6.2.1. Maus

3.6.2.1.1. Metabolismus

In Tabelle A13 und A14 des Anhangs sind die Ergebnisse der mit NNN und Cotinin inkubierten Schnitten von Mäuseleber und -lunge zusammengefasst. Bei einer Konzentration von 0,001 μM NNN konnten sowohl bei der Leber als auch bei der Lunge keine Umsätze nachgewiesen werden. In den Abbildungen 3-14a und 3-14b sind die Ergebnisse aus den Co-Inkubationen mit Cotinin dargestellt.

In der Mäuseleber konnte eine deutliche Hemmung der 5'-Hydroxylierung um 15 - 69% über den gesamten Konzentrationsbereich beobachtet werden. Bezüglich der 2'-Hydroxylierung kann man nur von einer Tendenz der hemmenden Wirkung sprechen, da nicht bei allen Konzentrationen Umsätze unterhalb der Kontrollwerte ermittelt wurden. Die Umsätze der 2'-Hydroxylierung bei NNN-Konzentrationen von 0,016 μM , 0,05 μM und 1,2 μM liegen über den Kontrollwerten. Beim Metaboliten Norcotinin reduzierten sich die Umsätze bei allen Konzentrationen, außer bei 0,016 μM und 1,2 μM , auf 33% bis 89 % des Kontrollumsatzes (Abb. 3-14a).

Durch Inkubation der Lungenschnitte der Maus mit Cotinin konnte, mit Ausnahme der Konzentration 0,2 μM , durchgehend eine Hemmung der Verstoffwechslung des NNN beobachtet werden. Es wurden bezüglich der 2'-Hydroxylierung Umsätze von 39 - 90%, bezüglich 5'-Hydroxylierung 30 - 96% erreicht. Norcotinin erfuhr eine Hemmung über den gesamten Konzentrationsbereich von 6 - 88% (Abb. 3-14b).

Tabelle 3-6: Michaelis-Menten Kinetiken der NNN-Metaboliten bei Leber- und Lungenschnitten von Maus, Ratte und Mensch nach 6 Stunden Inkubation mit 0,004 μM -1,2 μM und zusätzlich je 50 μM Cotinin (MW \pm SE; N = 6).

Die Cl_{intr} entspricht dem Quotienten aus den Mittelwerten für V_{max} (fmol/min/mg Protein) und k_m (μM).

Metabolit	Maus						Ratte					
	Leber			Lunge			Leber			Lunge		
	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}
Hydroxysäure	733 \pm 860 ^a	32 \pm 394	22	319 \pm 133 ^b	0,45 \pm 0,34	709	9 \pm 11	3,7 \pm 5,2	3	14 \pm 5 ^b	0,12 \pm 0,13	116
Ketosäure	54 \pm 43 ^a	1,6 \pm 1,8	33	250 \pm 78 ^b	0,24 \pm 0,18	1063	8 \pm 6 ^a	2,17 \pm 2,10	4	56 \pm 233 ^b	2,6 \pm 12	22
Diol	0,24 \pm 0,53 ^b	0,1 \pm 0,5	2	18 \pm 25 ^b	0,37 \pm 0,38	48	2 \pm 8 ^a	2 \pm 9	1	29 \pm 1527 ^a	4 \pm 249	7
Norcotinin	306 \pm 1116 ^b	9 \pm 36	33	125 \pm 72 ^b	0,31 \pm 0,38	399	6 \pm 2 ^a	0,61 \pm 0,50	10	10 \pm 13 ^b	0,45 \pm 1,03	22
Ketoalkohol	6 \pm 2 ^c	0,10 \pm 0,07	63	345 \pm 205 ^b	0,36 \pm 0,42	965	25 \pm 34	9 \pm 13	3	1,8 \pm 1,4 ^b	0,06 \pm 0,15	31
2'-OH	101 \pm 108 ^a	2,3 \pm 3,2	44	464 \pm 160 ^a	0,22 \pm 0,22	2064	32 \pm 17 ^a	5 \pm 3	6	208 \pm 2162 ^b	9 \pm 100	23
5'-OH	7 \pm 2 ^c	0,12 \pm 0,07	54	248 \pm 84 ^a	0,31 \pm 0,26	802	13 \pm 18	4 \pm 6	4	14 \pm 4 ^b	0,12 \pm 0,10	119

^aBerechnet für den Konzentrationsbereich bis 0,8 μM

^bBerechnet für den Konzentrationsbereich bis 0,5 μM

^cBerechnet für den Konzentrationsbereich bis 0,2 μM

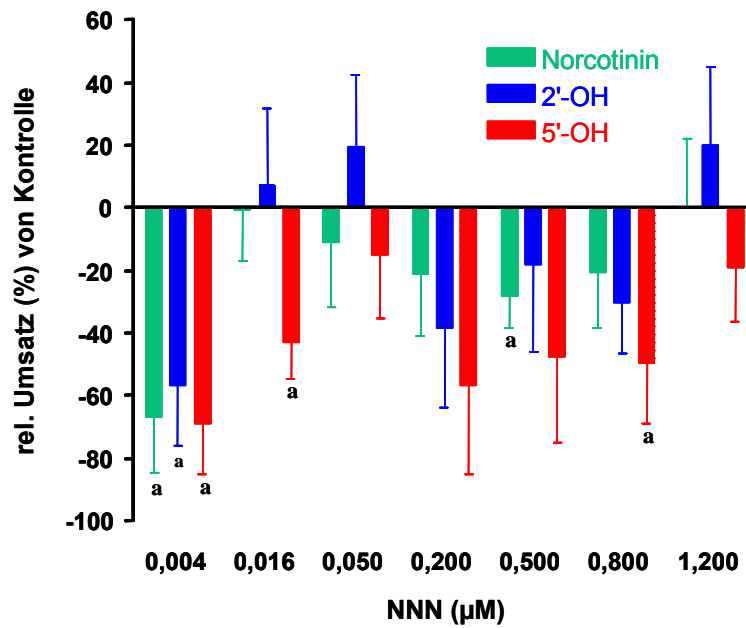


Abbildung 3-14a: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Leberschnitten von Mäusen mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 50 µM Cotinin (MW±SE; N = 6).
a: Signifikant verschieden zur Kontrolle, $p < 0,05$.

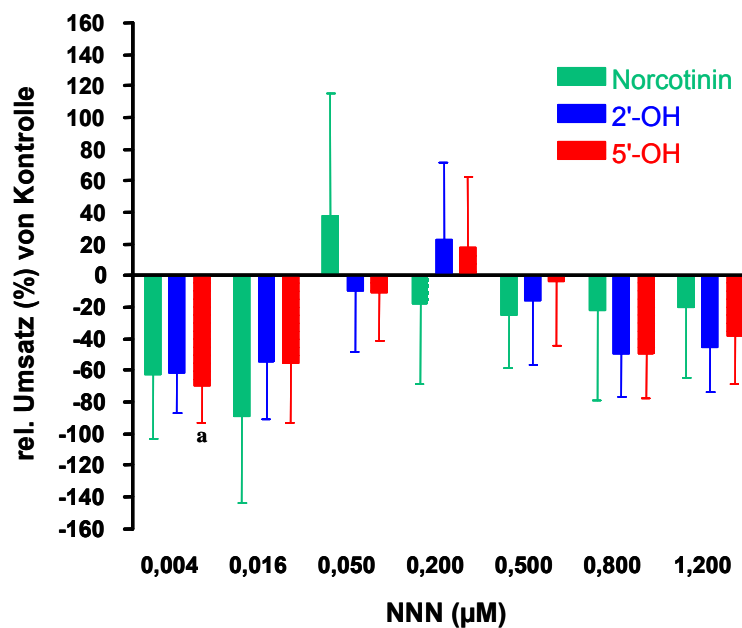


Abbildung 3-14b: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Lungenschnitten von Mäusen mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 50 µM Cotinin. (MW±SE; N = 6).
a: Signifikant verschieden zur Kontrolle, $p < 0,05$.

3.6.2.1.2. Kinetik

Durch die gemeinsame Inkubation der Gewebeschnitte der Maus mit NNN und 50 µM Cotinin zeigten sich sowohl bei der Mäuselieber als auch bei der Mäuselunge Veränderungen in der Kinetik der Umsatzraten von NNN. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Kontrollen

der Leber ergab für den k_m -Wert zu den Metaboliten Hydroxysäure und Norcotinin einen Anstieg von 2,7 μM auf 32 μM und 3,3 μM auf 9 μM . Die übrigen Metaboliten als auch die Summen der α -Hydroxylierungen erfuhren eine Abnahme ihrer k_m -Werte. Im Vergleich dazu ergab die Co-Inkubation der Mäuselunge mit Cotinin bei allen identifizierten Metaboliten einen Rückgang der k_m -Werte auf unter 0,5 μM (Abb. 3-15a und b, Tab. 3-4 und 3-6).

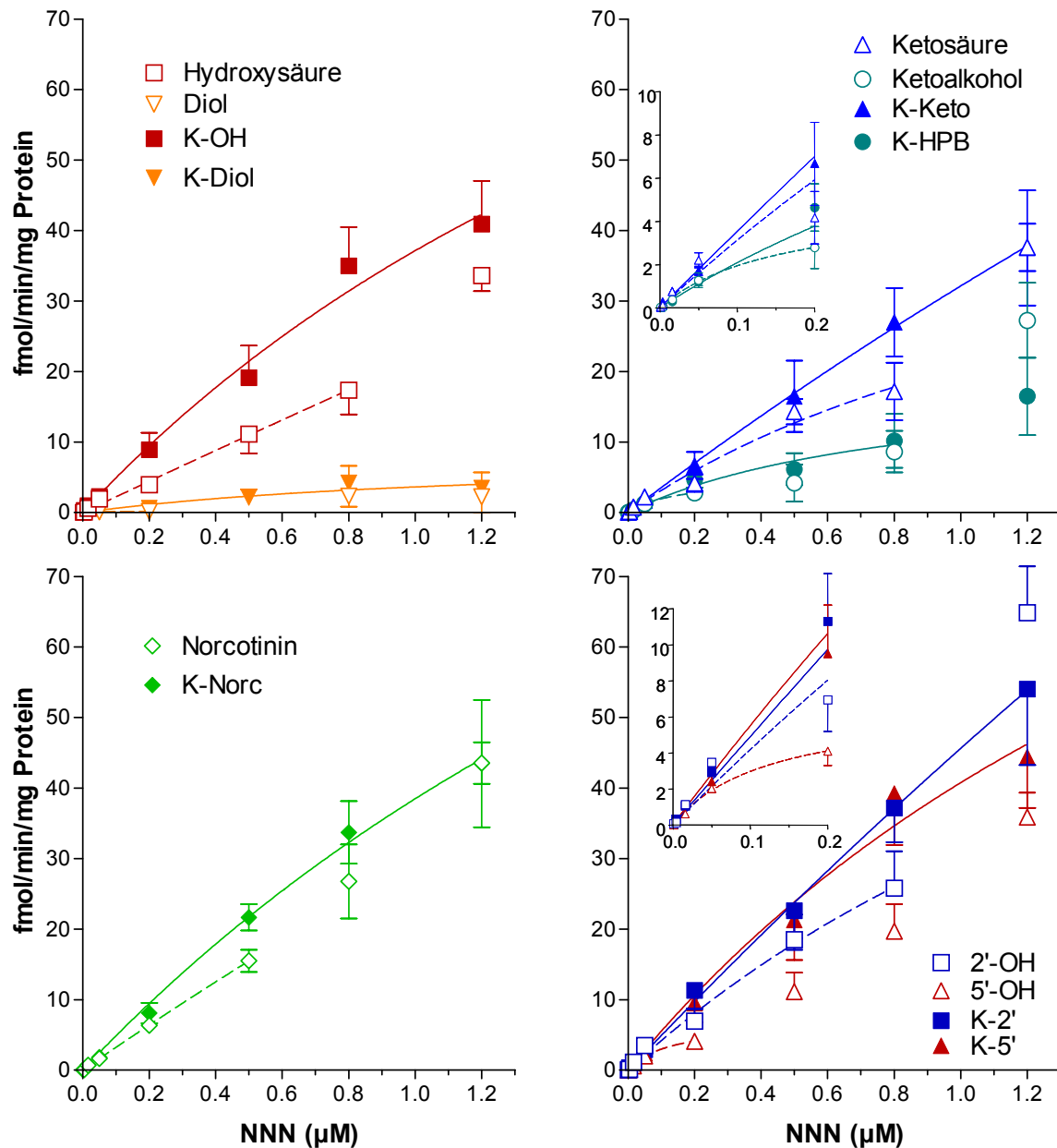


Abbildung 3-15a: Effekt von 50 μM Cotinin auf die Anpassung der Umsatzraten in Leberschnitten von Mäusen von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $\text{MW} \pm \text{SE}$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4 und 3-6).

Während sich für die intrinsische Clearance in Mäuseleber größtenteils unveränderte bis leicht erniedrigte Werte ergaben, führte die zusätzliche Inkubation der Mäuselunge mit Cotinin bei allen erfassten Metaboliten zu einem deutlichen Anstieg. Die intrinsische Clearance für Hydroxysäure, Ketosäure und Norcotinin, sowie der Summe der 5'-Hydroxylierung stieg ca. um den Faktor 1,4. Die des Ketoalkohols und der Summe der 2'-Hydroxylierung verdoppelte sich.

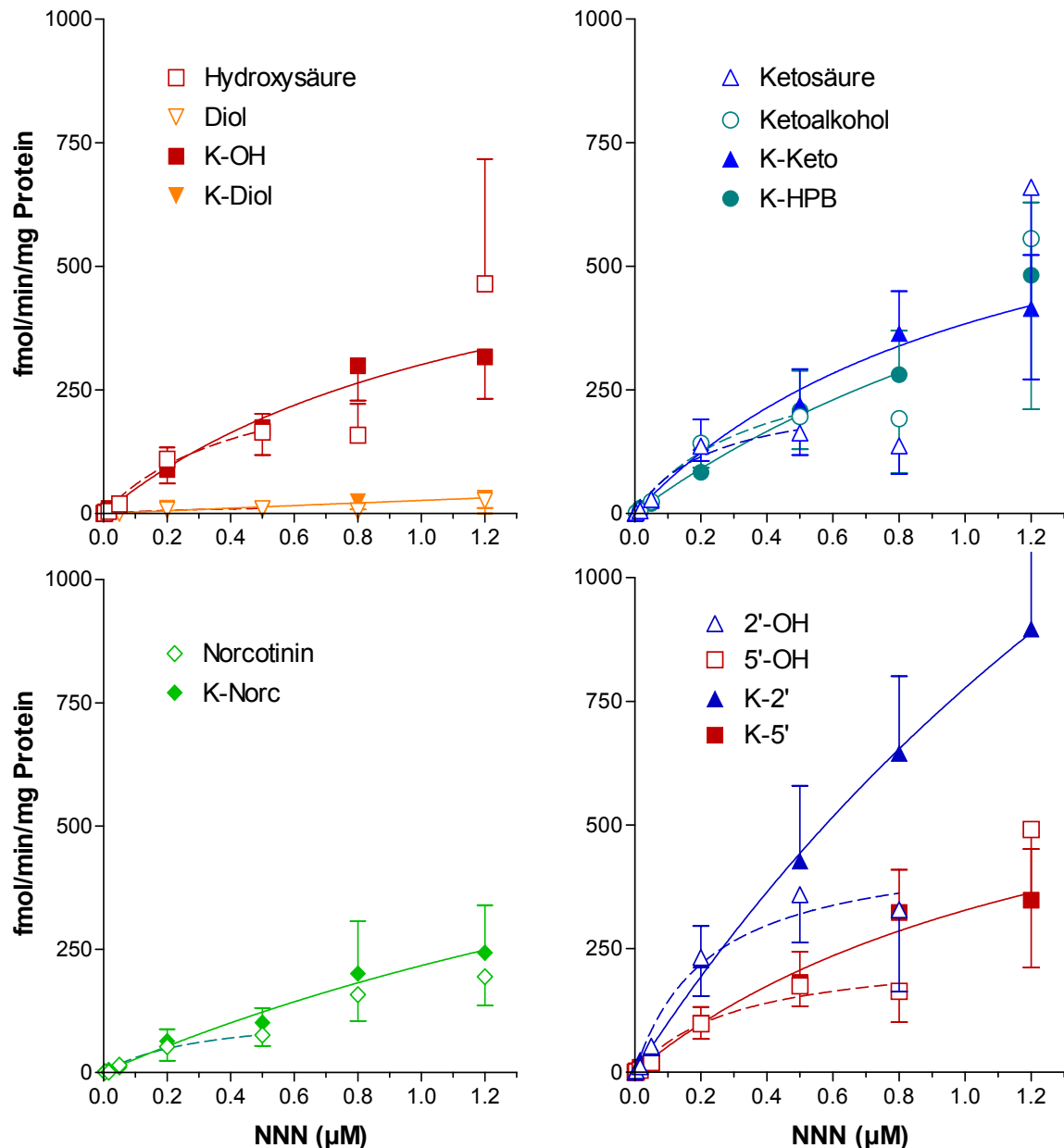


Abbildung 3-15b: Effekt von 50 µM Cotinin auf die Anpassung der Umsatzraten in Lungenschnitten von Mäusen von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $MW \pm SE$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4 und 3-6).

3.6.2.2. Ratte

3.6.2.2.1. Metabolismus

Nach Inkubation der Leberschnitte der Ratte mit NNN und 50 μM Cotinin konnten, anders als bei den Kontrollansätzen, erst ab einer NNN-Konzentration von 0,016 μM Umsätze gemessen werden. In der Rattenlunge dagegen konnte schon bei einer Konzentration von 0,004 μM ein geringer Umsatz nachgewiesen werden. Bei der Leber zeigte sich eine stärkere Gewichtung der Hemmung seitens der 5'-Hydroxylierung (ausgenommen 0,05 μM) mit 52 - 89 % des Kontrollumsatzes, gegenüber der 2'-Hydroxylierung mit 52 - 87%, wobei man hier die Konzentrationen 0,016 μM und 1,2 μM ausschließen muss. Der Umsatz des Metaboliten Norcotinin blieb außer bei der Konzentration 0,05 μM stets unter dem Kontrollumsatz (61 - 87%) (Abb. 3-16a).

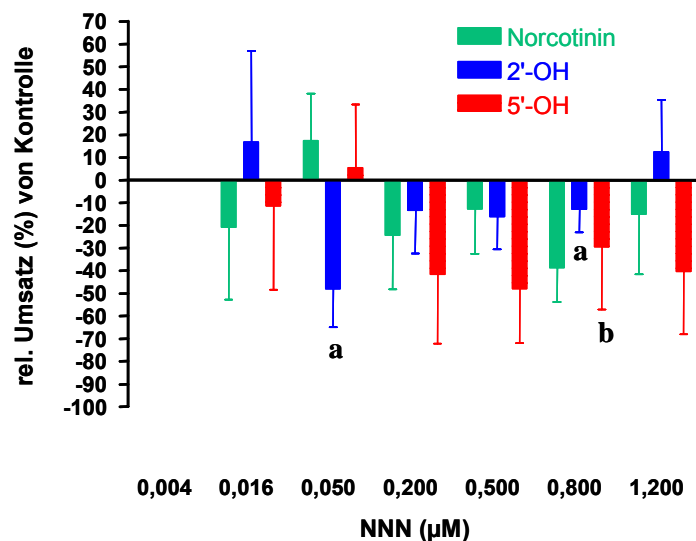


Abbildung 3-16a: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Leberschnitten von Ratten mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 50 μM Cotinin (MW \pm SE, N = 6). a, b: Signifikant verschieden zur Kontrolle, $p < 0,05$ (a) und $p < 0,01$ (b).

In der Rattenlunge hemmte Cotinin die α -Hydroxylierung abgesehen von der höchsten Konzentration. Die 2'-Hydroxylierung (6 - 50%) wurde meist etwas stärker gehemmt als die 5'-Hydroxylierung (21 - 96%) (Abb. 3-16b). Auch die Bildung von Norcotinin wurde gehemmt, jedoch nicht mehr bei 0,8 μM und 1,2 μM und meist geringer als die α -Hydroxylierung (14 - 85%).

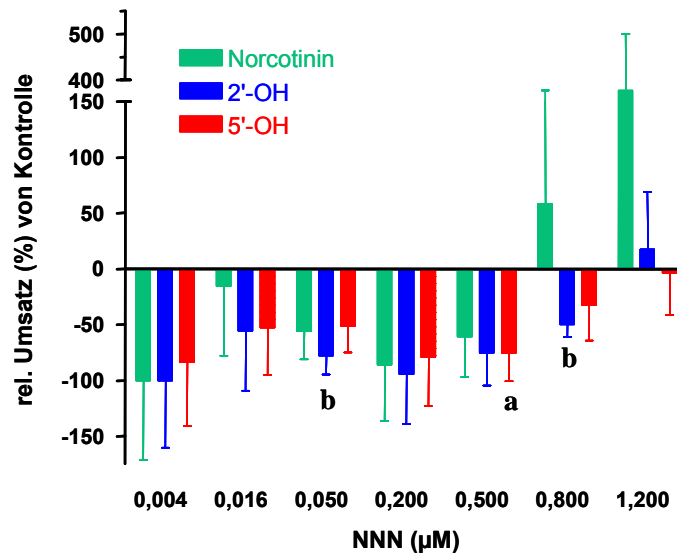


Abbildung 3-16b: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Lungenschnitten von Ratten mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 50 µM Cotinin (MW±SE; N = 6). a, b: Signifikant verschieden zur Kontrolle, $p < 0,05$ (a) und $p < 0,01$ (b).

3.6.2.2.2. Kinetik

Die Co-Inkubation der Gewebeschnitte der Ratte mit NNN und 50 µM Cotinin ergaben bei der Leber eine Reduktion der k_m -Werte der einzelnen Metaboliten, die des Metaboliten Ketoalkohol, sowie der Summen aus 2'- und 5'-Hydroxylierung jedoch erhöhten sich. Bei der Rattenlunge konnte nicht nur bei allen ausgewerteten NNN-Metaboliten, sondern auch in der Summe der 2'- und 5'-Hydroxylierung ein Anstieg der k_m -Werte verzeichnet werden (Abb. 3-17a und b, Tab. 3-4 und 3-6).

Die intrinsische Clearance der Rattenleber ergab größtenteils leicht erniedrigte Werte, die der Rattenlunge erfuhr durch die zusätzliche Inkubation mit Cotinin bei allen erfassten Metaboliten eine deutliche Reduzierung. Die intrinsische Clearance für Hydroxysäure und Diol, einzeln wie in der Summe, fiel um ca. das 4-fache, die für die Ketosäure und Ketoalkohol um das 10-fache und für deren Summe sogar um den Faktor 30. Die intrinsische Clearance des Metaboliten Norcotinin verringerte sich ebenfalls um den Faktor 10.

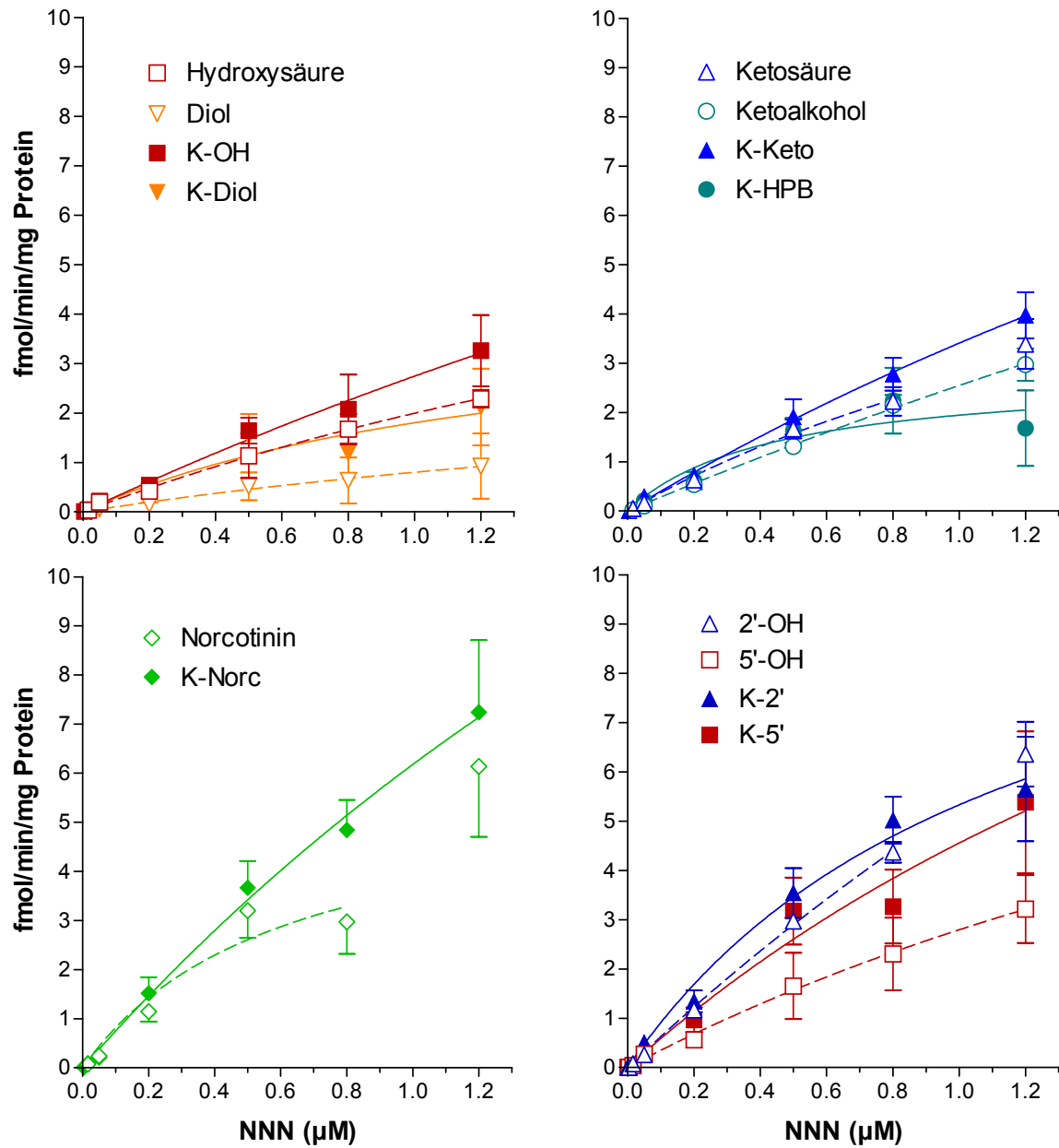


Abbildung 3-17a: Effekt von 50 µM Cotinin auf die Anpassung der Umsatzraten in Leberschnitten von Ratten von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $MW \pm SE$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4 und 3-6).

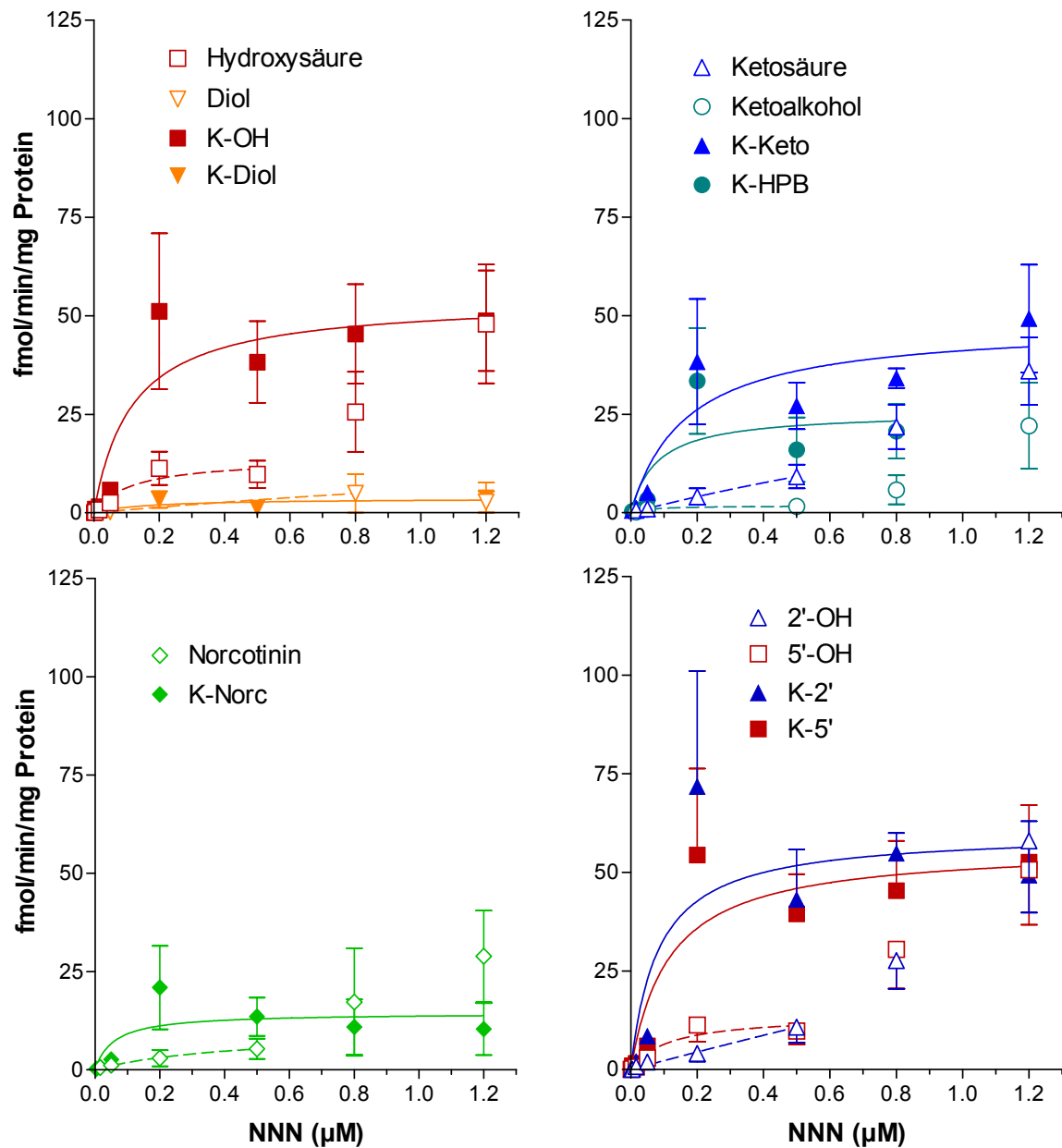


Abbildung 3-17b: Effekt von 50 µM Cotinin auf die Anpassung der Umsatzraten in Lungenschnitten von Ratten von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $MW \pm SE$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4 und 3-6).

3.6.2.3. Mensch

3.6.2.3.1. Metabolismus

Der Einfluss von 50 μM Cotinin auf die wichtigsten Stoffwechselwege des NNN in der humanen Leber sind in Abbildung 3-18 zusammengefasst. Auch hier muss erwähnt werden, dass die Ergebnisse aufgrund der geringen Anzahl der Schnitte nur einen ersten Einblick in die Thematik liefern, jedoch durchaus Tendenzen ersichtlich werden. So konnten, bis auf die zwei mittleren Konzentrationen (0,05 und 0,2 μM), deutliche Rückgänge der Metabolitenbildung gemessen werden. Die Summen der Metaboliten der 2'-Hydroxylierung machten zwischen 43 und 87% des Kontrollwertes aus, mit der 5'-Hydroxylierung wurden Werte von nur 46 bis 95% der Kontrolle erreicht. Auch die Bildung von Norcotinin schien durch den Zusatz von Cotinin beeinflussbar zu sein. Hier wurden Werte von 63 bis 96% des Kontrollumsatzes gemessen. Wie schon bei der Co-Inkubation mit Nicotin, konnte man auch bei Cotinin beobachten, dass in den niedrigen Konzentrationsbereichen vermehrt die 5'-Hydroxylierung gehemmt wurde, während dies in den oberen Konzentrationen eher für die 2'-Hydroxylierung zutraf.

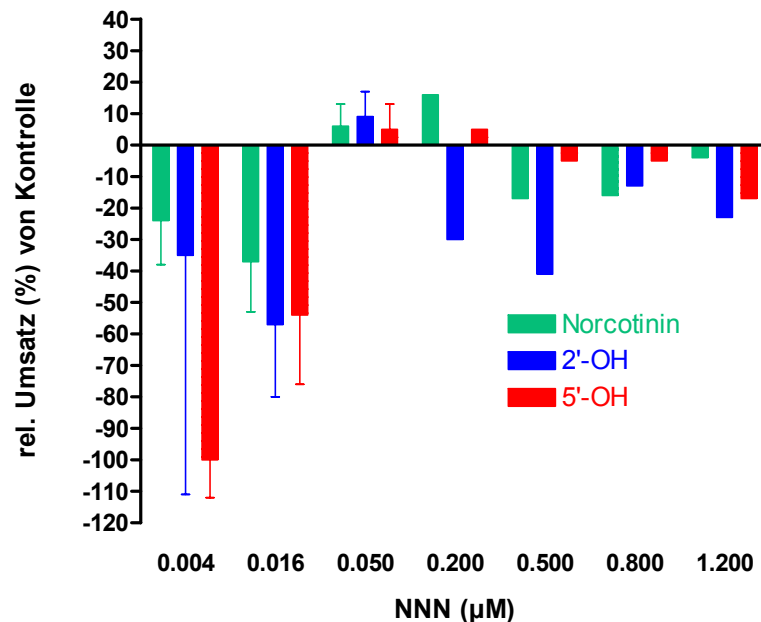


Abbildung 3-18: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Leberschnitten vom Menschen mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 50 μM Cotinin (MW \pm S.E.; N = 3: 0,004 bis 0,05 μM ; N = 2: 0,2 bis 1,2 μM).

3.6.3. Hemmung durch Phenethylisothiocyanat (PEITC)

Zur Untersuchung der Beeinflussung des NNN-Metabolismus durch Phenethylisothiocyanat (PEITC), wurde jeder Versuchsansatz zusätzlich mit 0,2 μM PEITC inkubiert. In Tabelle 3-7 sind die Ergebnisse zu den Anpassungen der Michaelis-Menten-Kinetiken angegeben.

3.6.3.1. Maus

3.6.3.1.1. Metabolismus

Die Co-Inkubation von Leber- und Lungenschnitte der Maus mit PEITC ergab, wie auch bei den vorangegangenen Untersuchungen zu Nicotin und Cotinin, ebenfalls keine messbaren Umsätze für die niedrigste NNN-Konzentration (0,001 μM). Insgesamt zeigte PEITC nur einen geringen Hemmeffekt in Leberschnitten dieser Spezies, der sich bezüglich der α -Hydroxylierung auf die beiden niedrigsten Konzentrationen 0,004 μM und 0,016 μM NNN beschränkt. Norcotinin wird bei diesen Konzentrationen ebenfalls leicht gehemmt, zusätzlich auch noch bei 0,5 μM (Abb. 3-19a).

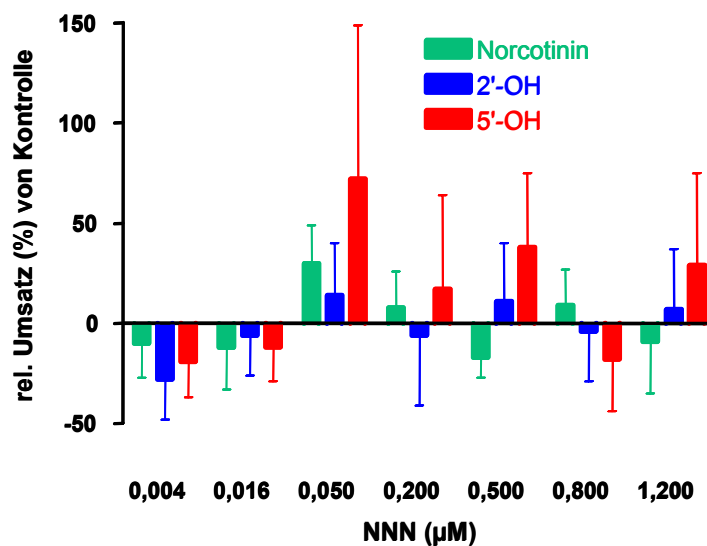


Abbildung 3-19a: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Leberschnitten von Mäusen mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 0,2 μM PEITC (MW \pm SE; N = 6)

Tabelle 3-7: Michaelis-Menten Kinetiken der NNN-Metaboliten bei Leber- und Lungenschnitten von Maus, Ratte und Mensch nach 6 Stunden Inkubation mit 0,004 μM -1,2 μM und zusätzlich je 0,2 μM PEITC (MW \pm SE; N = 6).

Die Cl_{intr} entspricht dem Quotienten aus den Mittelwerten für V_{max} (fmol/min/mg Protein) und k_m (μM).

Metabolit	Maus						Ratte					
	Leber			Lunge			Leber			Lunge		
	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}	V_{max}	k_m	Cl_{intr}
Hydroxysäure	81 \pm 18 ^a	1,20 \pm 0,41	67	956 \pm 2015 ^a	2,4 \pm 6,5	393	5,6 \pm 7,2 ^b	2,3 \pm 3,5	2	34 \pm 26 ^b	0,38 \pm 0,57	89
Ketosäure	120 \pm 15 ^a	2,9 \pm 0,4	42	keine Anpassung möglich			4,5 \pm 2,9 ^b	0,97 \pm 0,89	5	24 \pm 15 ^b	0,31 \pm 0,39	78
Diol	2,7 \pm 2,5 ^a	0,23 \pm 0,60	12	keine Anpassung möglich			1,6 \pm 1,8 ^b	0,59 \pm 1,15	3	2 \pm 17 ^b	0,36 \pm 6,6	6
Norcotinin	124 \pm 78	2,4 \pm 2,1	52	871 \pm 2490 ^a	2,5 \pm 9,0	349	27,1 \pm 27,7 ^a	4,3 \pm 5,1	6	4 \pm 3 ^b	0,13 \pm 0,31	28
Ketoalkohol	31 \pm 14 ^a	1,8 \pm 1,8	17	273 \pm 308 ^a	0,6 \pm 1,3	453	14 \pm 25	4,4 \pm 9,4	3	7 \pm 3 ^b	0,11 \pm 0,16	60
2'-OH	526 \pm 1124 ^a	11 \pm 24	49	1669 \pm 3388 ^a	2,1 \pm 5,6	793	16 \pm 25 ^b	2,5 \pm 4,5	7	29 \pm 13 ^b	0,2 \pm 0,2	140
5'-OH	94 \pm 61 ^a	1,4 \pm 1,3	67	1583 \pm 5075 ^a	4,2 \pm 16	377	7,1 \pm 4,4	1,52 \pm 1,47	5	39 \pm 31 ^b	0,46 \pm 0,66	85

^aBerechnet für den Konzentrationsbereich bis 0,8 μM

^bBerechnet für den Konzentrationsbereich bis 0,5 μM

In der Mäuselunge ist der Hemmeffekt von PEITC sehr viel stärker ausgeprägt und bezüglich der α -Hydroxylierung in der Tendenz bis auf die höchsten Konzentrationen nachweisbar (Abb. 3-19b). Die Hemmung ist bei der 2'- und 5'-Hydroxylierung weitgehend gleich (3% bzw. 9% - 78% bzw. 99%). Die Norcotininbildung wird nur bei den beiden niedrigsten Konzentrationen, 0,004 μ M (15%) und 0,016 μ M (20%) gehemmt.

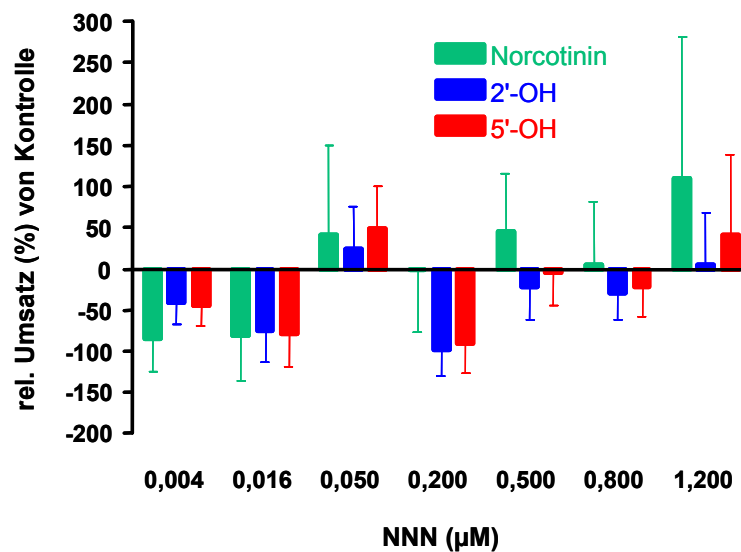


Abbildung 3-19b: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Lungenschnitten von Mäusen mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 0,2 μ M PEITC (MW \pm S.E.; N = 6)

3.6.3.1.2. Kinetik

Durch die zusätzliche Inkubation der Versuchsansätze mit 0,2 μ M PEITC ließen sich bei der Mäuseleber und -lunge Veränderungen der Anpassung der Kinetik nachweisen. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte eine Verringerung der k_m -Werte der 5'-Hydroxylierung festgestellt werden, wobei der k_m -Wert für die 2'-Hydroxylierung unverändert blieb. In der Mäuselunge stellte sich bis auf den Metaboliten Hydroxysäure ebenfalls ein Rückgang der k_m -Werte ein (Abb. 3-20a und b, Tab. 3-4 und 3-7).

In der Leber der Maus blieb die intrinsische Clearance für den Metabolismus über die 2'- und 5'-Hydroxylierung unverändert. Ebenso ergeben sich keinerlei Veränderungen bezüglich der Norcotininbildung. Die des Ketoalkohols nahm leicht ab. In der Mäuselunge sank die

intrinsische Clearance für alle Abbauwege um ca. das 1,5-fache, die des Ketoalkohols blieb unverändert. Bezüglich des Norcotinins hat sich durch die Co-Inkubation mit PEITC ein deutlicher Anstieg der intrinsische Clearance bei der Lunge ergeben.

Für den Metaboliten Ketosäure konnte in der Lunge nach zusätzlicher Inkubation mit PEITC keine Kinetik mehr angepasst werden.

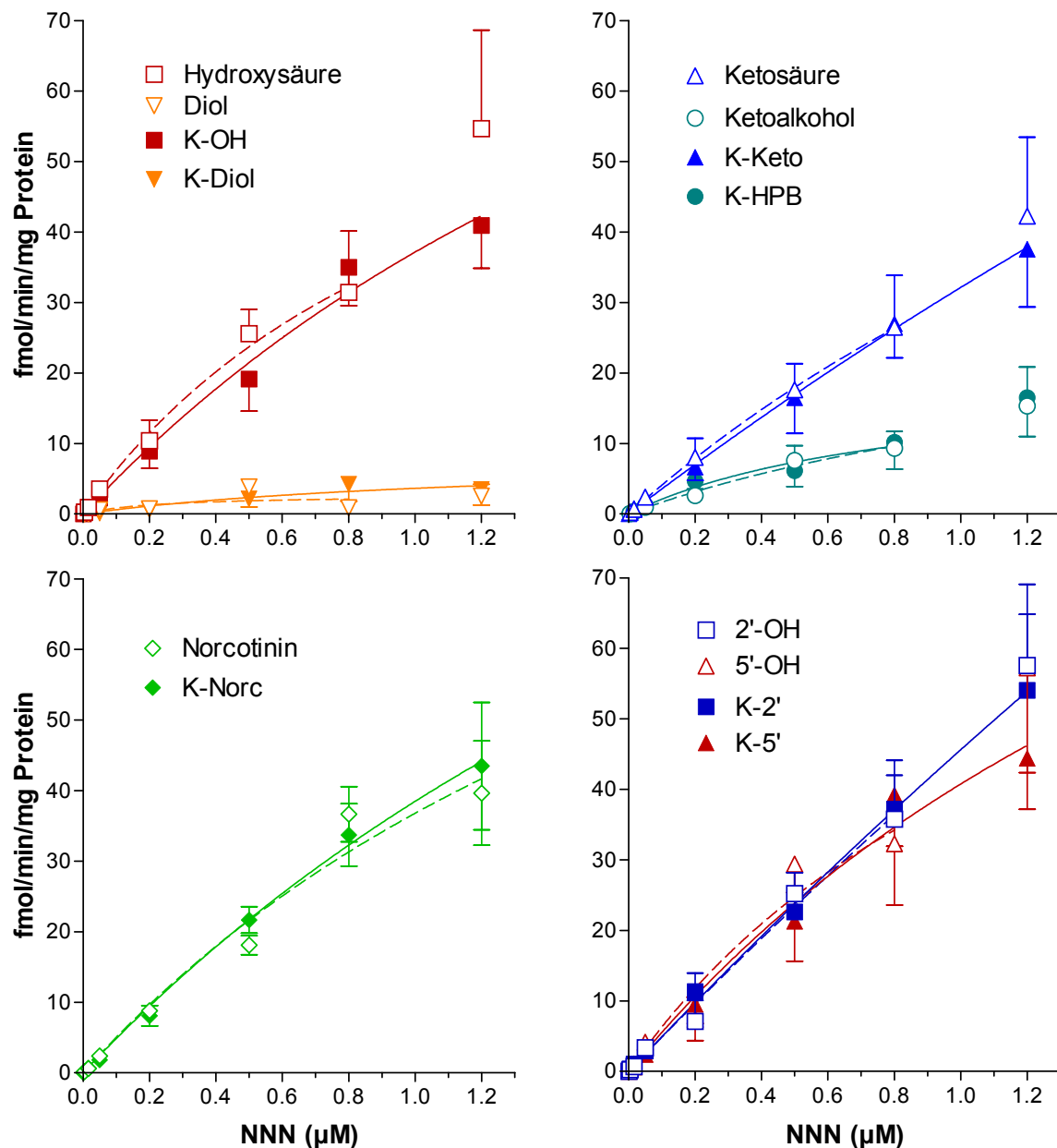


Abbildung 3-20a: Effekt von 0,2 μM PEITC auf die Anpassung der Umsatzraten in Leberschnitten von Mäusen von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus der 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, MW±SE; N = 6 (vergl. Tab. 3-4 und 3-7).

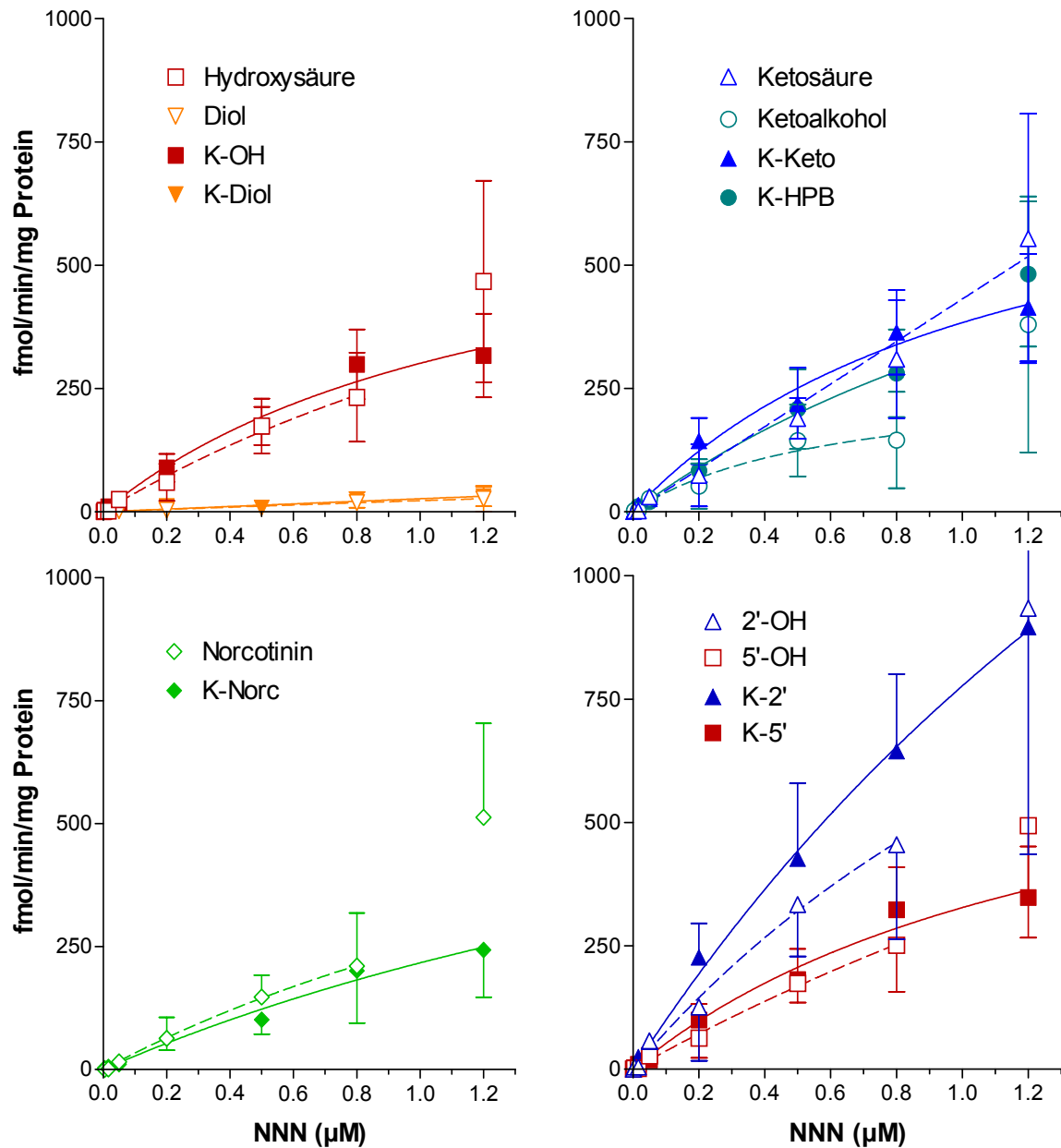


Abbildung 3-20b: Effekt von 0,2 µM PEITC auf die Anpassung der Umsatzraten in Lungenschnitten von Mäusen von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus der 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $MW \pm SE$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4 und 3-7).

3.6.3.2. Ratte

3.6.3.2.1. Metabolismus

Die zusätzliche Inkubation von 0,2 µM PEITC mit NNN ergab, wie auch bei der Maus, für die niedrigste Konzentration (0,001 µM) keine messbaren Umsätze. In der Rattenleber traf dies auch bei einer NNN-Konzentration von 0,004 µM zu. Der hemmende Effekt von PEITC auf die 5'-Hydroxylierung konnte erst ab einer Konzentration von 0,05 µM beobachtet werden (54 – 91%). Eine Verringerung der Metabolitenbildung über die 2'-Hydroxylierung

konnte in der Leber nur im Konzentrationsbereich von 0,05 μM bis 0,5 μM NNN gezeigt werden. Norcotinin wird ebenfalls leicht gehemmt (75 – 91%), jedoch nicht bei 0,05 μM und 1,2 μM NNN (Abb. 3-21a).

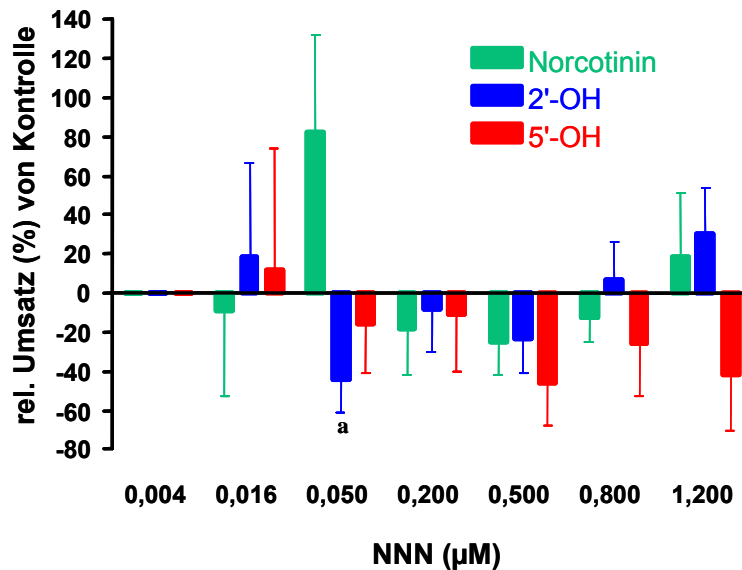


Abbildung 3-21a: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Leberschnitten von Ratten mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 0,2 μM PEITC (MW \pm SE; N = 6). a: Signifikant verschieden zur Kontrolle, $p < 0,05$.

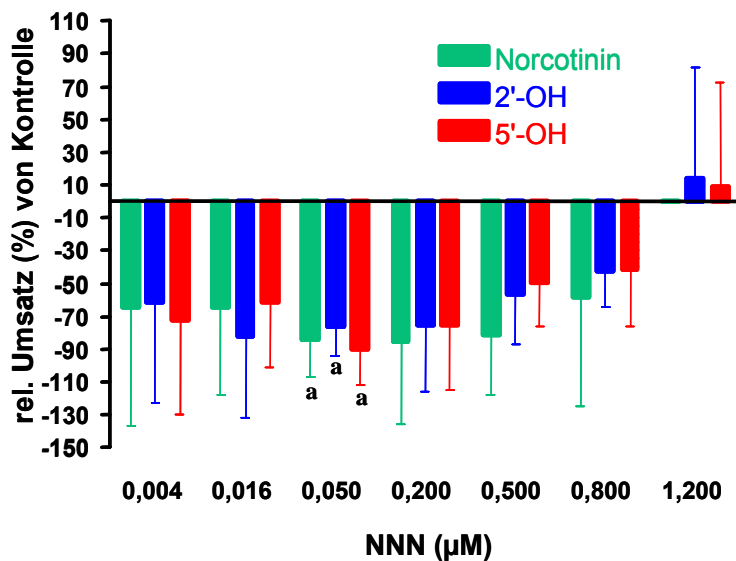


Abbildung 3-21b: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Lungenschnitten von Ratten mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 0,2 μM PEITC (MW \pm SE; N = 6). a: Signifikant verschieden zur Kontrolle, $p < 0,01$.

In der Rattenlunge konnte der hemmende Effekt von PEITC auf den Metabolismus von NNN über die α -Hydroxylierung, bis auf die höchste Konzentration, erheblich deutlicher nachgewiesen werden (Abb. 3-21b). Wie auch schon bei der Maus ist die Hemmung bei der 2'- und 5'-Hydroxylierung weitgehend gleich (18 – 58%, bzw. 10 – 58%). Die Bildung des

Metaboliten Norcotinin wird über den gesamten Konzentrationsbereich gehemmt (15 – 42%). Bei der Konzentration 0,05 μM erwies sich die Hemmung von PEITC als signifikant.

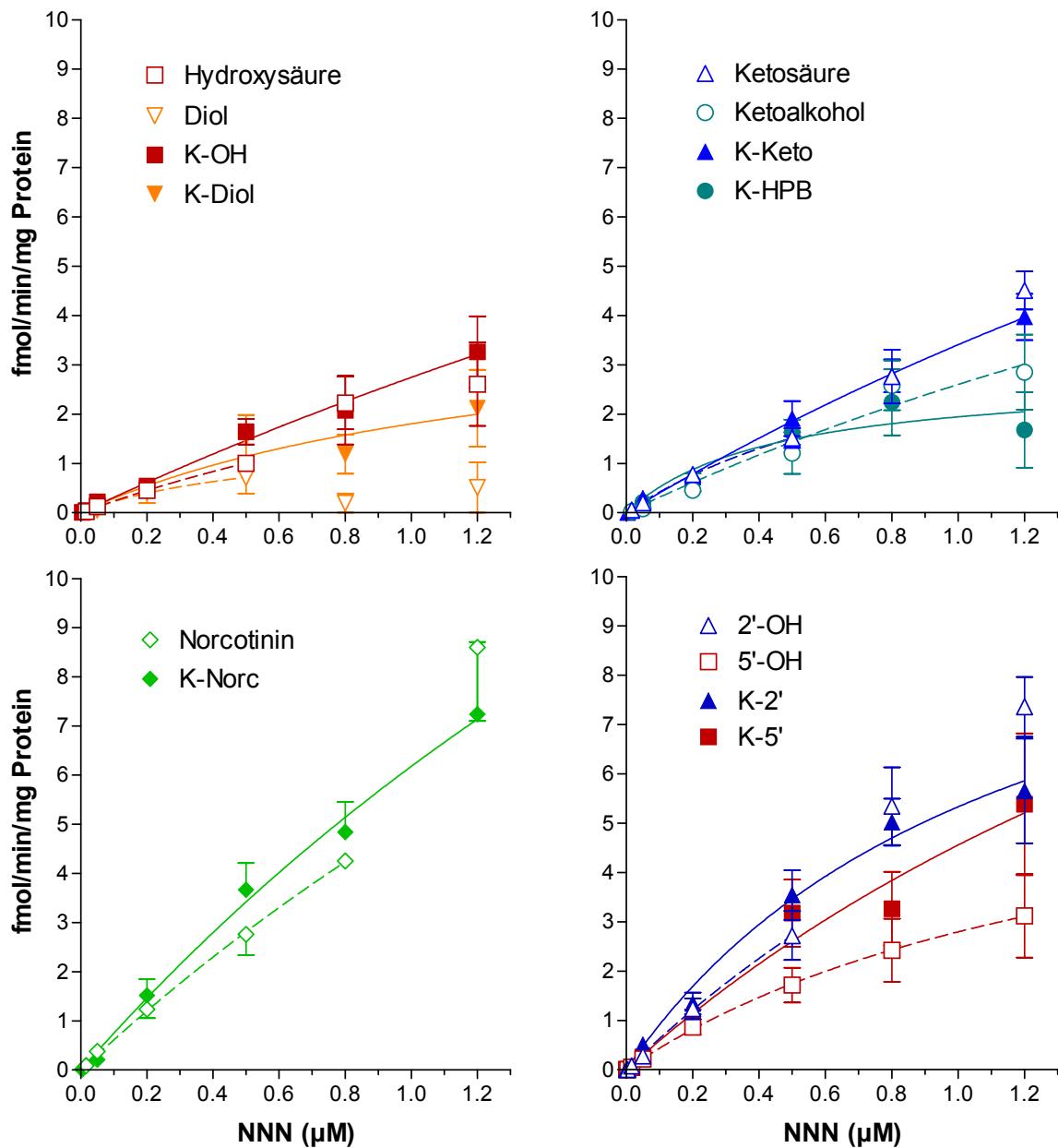


Abbildung 3-22a: Effekt von 0,2 μM PEITC auf die Anpassung der Umsatzraten in Leberschnitten von Ratten von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus der 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $\text{MW} \pm \text{SE}$; N = 6 (vergl. Tab. 3-4 und 3-7).

3.6.3.2.2. Kinetik

Die Anpassung der Umsatzraten von NNN in Rattenleber und -lunge nach zusätzlicher Inkubation der verschiedenen NNN-Konzentrationen mit jeweils 0,2 μM PEITC ergaben vor allem in der Lunge große Unterschiede zu den Ergebnissen der Kontrollansätze. Während sich

die k_m -Werte in der Leber bis auf Ketoalkohol und die Summe der 2'-Hydroxylierung reduzierten, stiegen sie in der Lunge sowohl bei allen Metaboliten im Einzelnen als auch in der Summe (Abb. 3-22a und b, Tab. 3-4 und 3-7). Die intrinsische Clearance veränderte sich durch die Zugabe von 0,2 μM PEITC in der Leber nur gering. Es konnte ein leichter Rückgang verzeichnet werden. In der Rattenlunge jedoch sank die intrinsische Clearance um das 4- bis 5-fache. Die Clearance bezüglich Norcotinin sank um den Faktor 9.

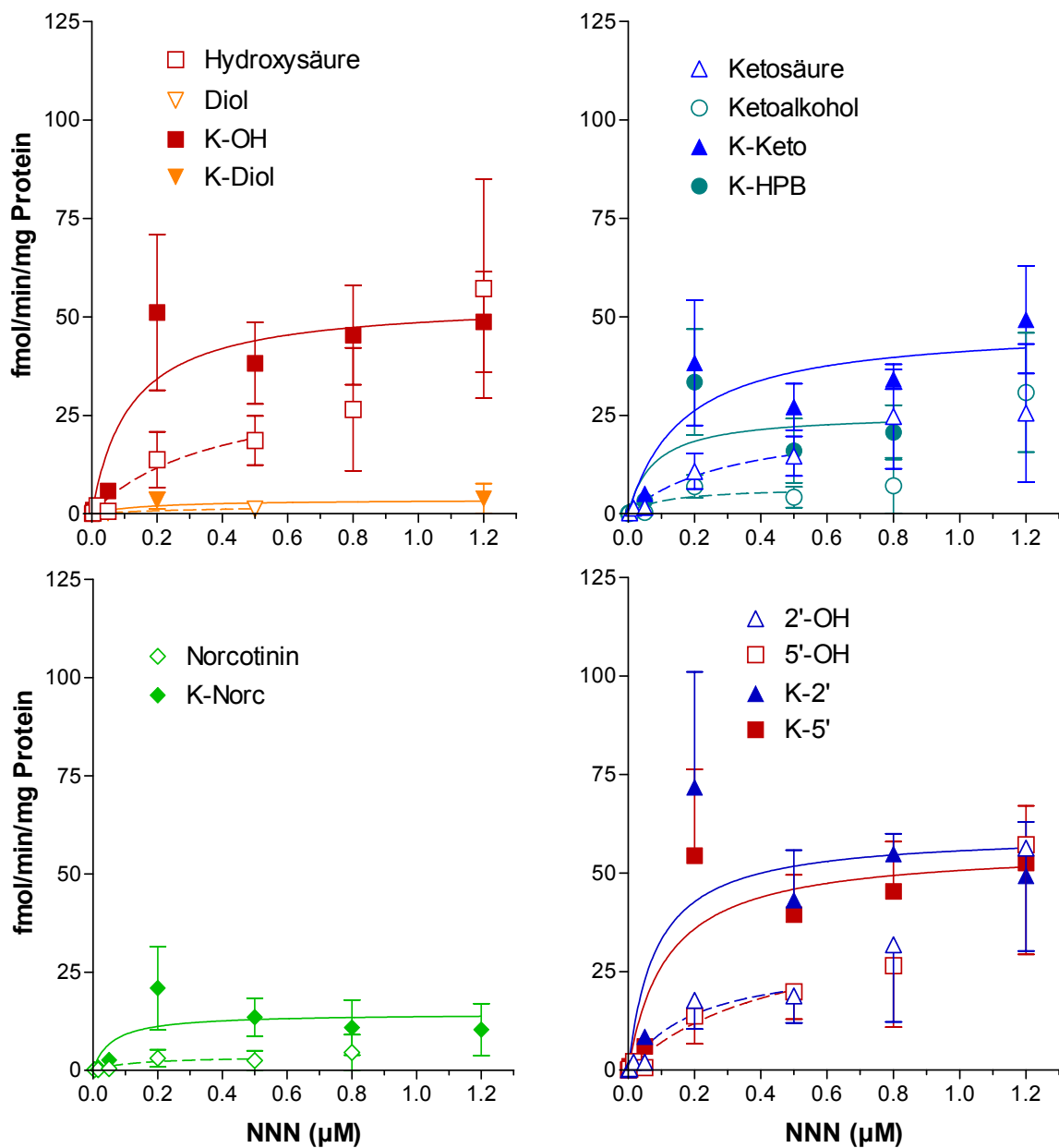


Abbildung 3-22b: Effekt von 0,2 μM PEITC auf die Anpassung der Umsatzraten in Lungenschnitten von Ratten von NNN zu einzelnen Metaboliten und der Summen der Metaboliten aus der 2'- und 5'-Hydroxylierung an eine Michaelis-Menten Kinetik, $\text{MW} \pm \text{SE}$; $N = 6$ (vergl. Tab. 3-4 und 3-7).

3.6.3.3. Mensch

3.6.3.3.1. Metabolismus

Der Zusatz von 0,2 μM PEITC zu den mit NNN inkubierten humanen Leberschnitten zeigte deutlich, dass sowohl die α -Hydroxylierung als auch der Entgiftungsweg, also die Bildung des Metaboliten Norcotinin, beeinflusst wurden. Ausgenommen bei einer NNN-Konzentration von 0,05 μM , konnte über den gesamten Konzentrationsbereich ein Rückgang der Metabolitenbildung verzeichnet werden. Durch den Einfluss von PEITC wurden über die 2'-Hydroxylierung nur noch 38 - 86%, bezüglich der 5'-Hydroxylierung 39 - 88% und über die Norcotininbildung etwa 42 - 69% der Kontrollumsätze erreicht.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Nicotin und Cotinin konnten bei der Co-Inkubation mit PEITC keinerlei Beobachtungen hinsichtlich einer verstärkten Hemmung des einen oder anderen Stoffwechselweges gemacht werden.

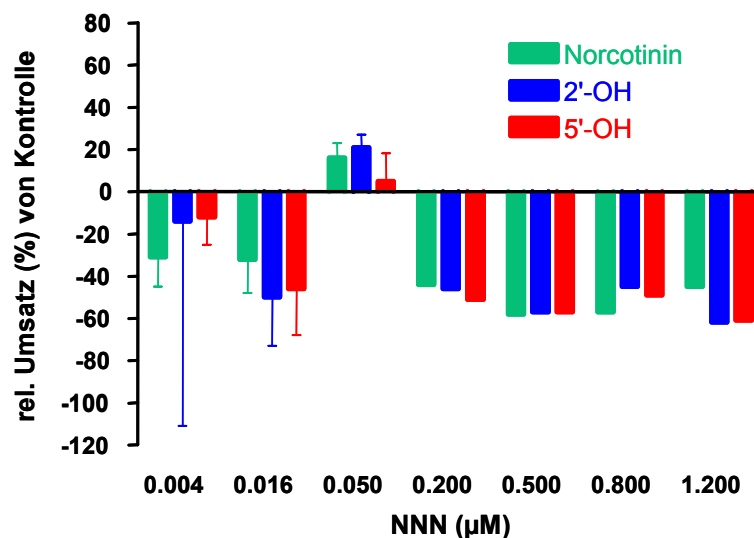


Abbildung 3-23: Vergleich des Kontrollumsatzes von NNN in Leberschnitten vom Menschen mit dem Umsatz von NNN nach Hemmung mit 0,2 μM PEITC (MW \pm S.E., N = 3: 0,004 bis 0,05 μM ; N = 2: 0,2, 0,8 und 1,2 μM , N = 1: 0,5 μM).

3.7. Vergleich des NNN-Metabolismus bei Hamster, Maus, Ratte und Mensch

Im Folgenden werden die Gesamtumsätze von NNN (Abb. 3-24), die Metabolitenverteilung auf 2'- bzw. 5'-Hydroxylierung (Abb. 3-25 und 3-26) und der Einfluss der Hemmstoffe Nicotin, Cotinin und des Chemopräventivums PEITC auf den NNN-Metabolismus für diejenige Konzentration vergleichend dargestellt, bei der das Nitrosamin mit höchster Konzentration

ohne Verdünnung der spezifischen Aktivität ($0,016 \mu\text{M}$) eingesetzt worden ist. In diesen Vergleich werden Daten für den Hamster einbezogen, die bereits in einer früheren Untersuchung von Frau Daniela Marchand in der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Richter erhoben worden waren.

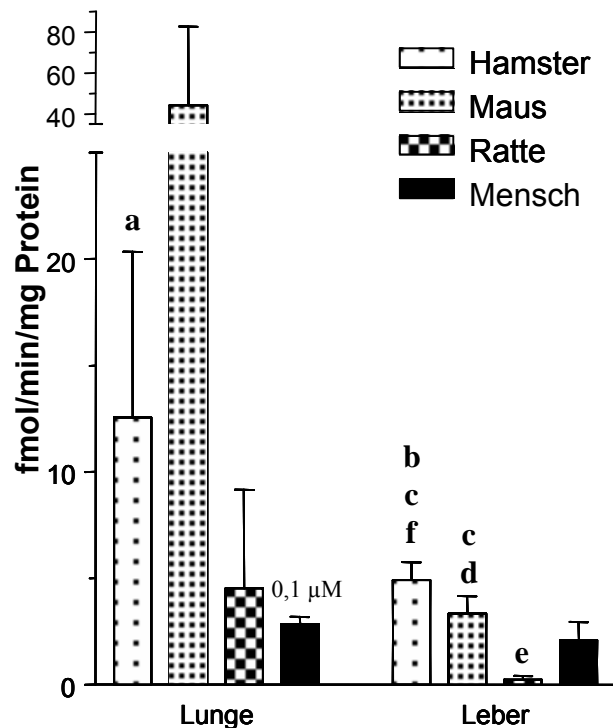


Abbildung 3-24: Gesamtumsatz von $0,016 \mu\text{M}$ NNN in Lungen- und Leberschnitten von Hamster, Maus, Ratte und Mensch ($\text{MW} \pm \text{SE}$; $N = 5$ bzw. $N = 7$). a, c: Signifikant verschieden zur Ratte, $p < 0,05$ (a), $p < 0,001$ (c); b: Signifikant verschieden zur Maus, ($p < 0,01$); d, e, f: Signifikant verschieden zum Menschen, $p < 0,05$ (d), $p < 0,01$ (e) und $p < 0,001$ (f).

Der Vergleich des Gesamtumsatzes zeigt, dass der NNN-Umsatz in der Lunge deutlich stärker ausgeprägt ist als in der Leber. Nur in der humanen Lunge konnte nach 6 h Inkubation keine metabolische Aktivität bei $0,016 \mu\text{M}$ NNN nachgewiesen werden. Ergänzend sind daher die Ergebnisse aus der Inkubation der humanen Lungenschnitte mit $0,1 \mu\text{M}$ NNN mit dargestellt (Abb. 3-24). Des Weiteren sind signifikante speziesspezifische Unterschiede bei der Verstoffwechslung von NNN zu beobachten. Die Lunge der Maus besitzt von den untersuchten Spezies die höchste Aktivität NNN zu verstoffwechseln. Dabei liegt der Umsatz des Lungengewebes von Mäusen und Hamstern trotz erhöhter NNN-Konzentration beim Menschen ($0,1 \mu\text{M}$) signifikant darüber. Der Hamster zeigt in der Leber den größten Umsatz. Der Lebermetabolismus des Hamsters bezüglich NNN ist zu allen untersuchten Spezies signifikant erhöht. In der Leber ist der Metabolismus des Menschen zu dem der Ratte signifikant erhöht.

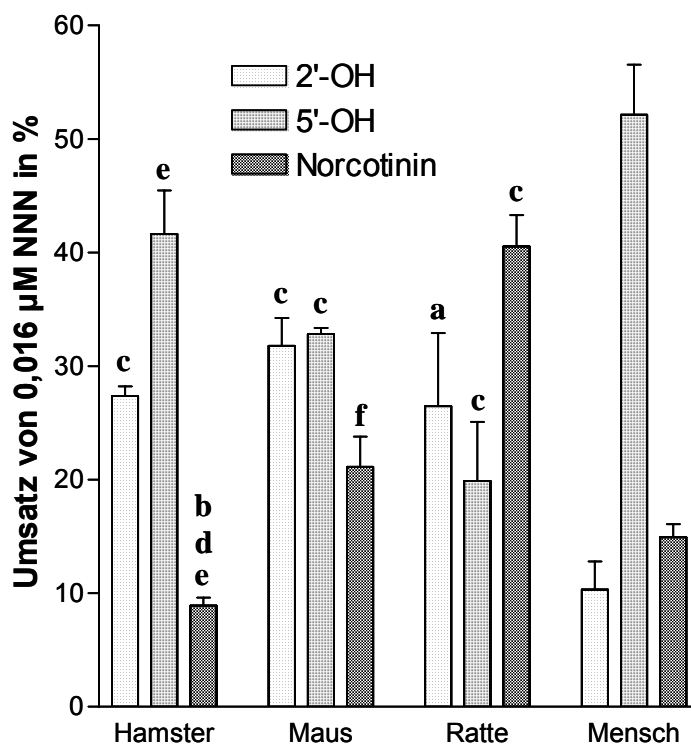


Abbildung 3-25: Metabolismuswege des NNN in Leberschnitten (MW±SE; N = 6). a, b, c: Signifikant verschieden vom Menschen, $p < 0,05$ (a), $p < 0,01$ (b) und $p < 0,001$ (c); d: Signifikant verschieden von der Maus, $p < 0,01$; e, f: Signifikant verschieden von der Ratte, $p < 0,01$ (e) und $p < 0,001$ (f).

Ein Vergleich der wichtigsten Abbauege von NNN über 2'- und 5'-Hydroxylierung sowie der Bildung von Norcotinin zeigt für das Lebergewebe eine deutliche Speziesabhängigkeit (Abb. 3-25). NNN wird demnach sowohl beim Hamster als auch beim Menschen zum größten Teil über die 5'-Hydroxylierung verstoffwechselt. Auch in der Maus erfolgt der Abbau von NNN hauptsächlich über die α -Hydroxylierung mit leichter Tendenz zur 5'-Hydroxylierung. Die Denitrosierung und anschließende Oxidation zu Norcotinin stellt dagegen den Hauptabbaueweg in der Rattenleber dar. In humanem Lebergewebe stellt dieser Weg den zweitwichtigsten Abbaueweg dar, gefolgt von der 2'-Hydroxylierung. Wie bei der Maus spielt die Norcotininbildung insbesondere beim Hamster eine untergeordnete Rolle.

In der Lunge besitzt die Maus die höchste Stoffwechselkapazität für NNN (Abb. 3-26). Wie schon bei der Leber zeigt der Metabolismus der Lunge ebenfalls Unterschiede zwischen den untersuchten Spezies. Während in der Lunge sowohl bei der Maus, der Ratte und dem Menschen ($0,1 \mu\text{M}$) der größte Teil der Verstoffwechslung des NNN über die 2'-Hydroxylierung verläuft, so lag der Anteil der 5'-Hydroxylierung beim Hamster deutlich über dem der 2'-Hydroxylierung und der Norcotininbildung (Abb. 3-26).

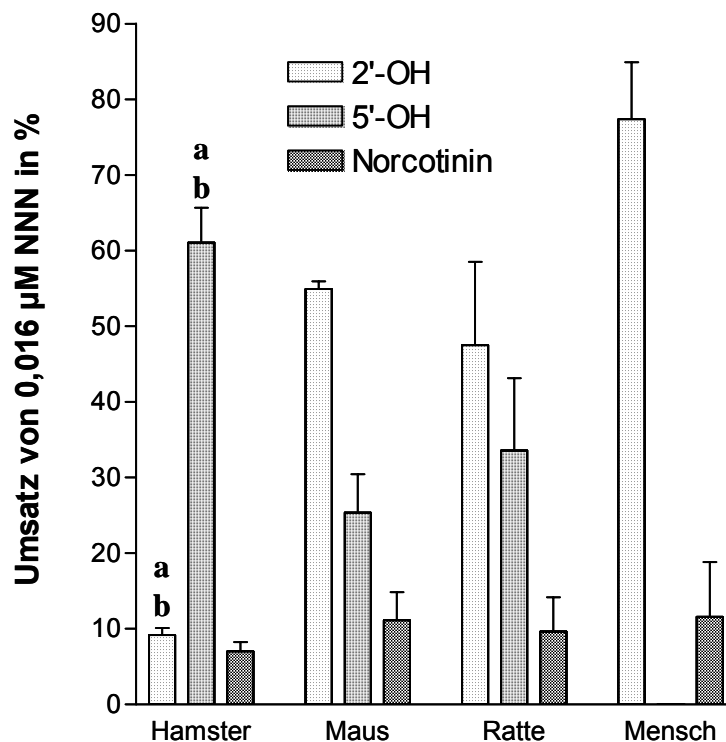


Abbildung 3-26: Metabolismuswege des NNN in Lungenschnitten (MW±SE; N = 6). a: Signifikant verschieden von der Maus, $p < 0,001$; b: Signifikant verschieden von der Ratte, $p < 0,05$.

In Humanlungenschnitten konnte nach 6 Stunden Inkubation, trotz erhöhter NNN-Konzentration ($0,1 \mu\text{M}$), keine aus der 5'-Hydroxylierung resultierenden Metaboliten nachgewiesen werden. Sowohl bei der Maus als auch bei allen anderen untersuchten Spezies wurde der Abbau zu Norcotin nur in geringem Maße nachgewiesen.

Abbildung 3-27 zeigt den Einfluss der untersuchten Inhibitoren auf den Leber- und Lungenmetabolismus der verschiedenen Spezies. Sowohl in der Leber als auch in der Lunge des Hamsters konnte nach Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ Nicotin, $50 \mu\text{M}$ Cotinin und $0,2 \mu\text{M}$ PEITC ein signifikanter Rückgang der NNN-Verstoffwechslung nachgewiesen werden. In der Lunge reduzierte sich der Umsatz an NNN mit Nicotin im Mittel um 90%, mit Cotinin um 87% und mit PEITC um 88%. In der Leber konnte ein Rückgang um 89%, 62% und 71% nachgewiesen werden.

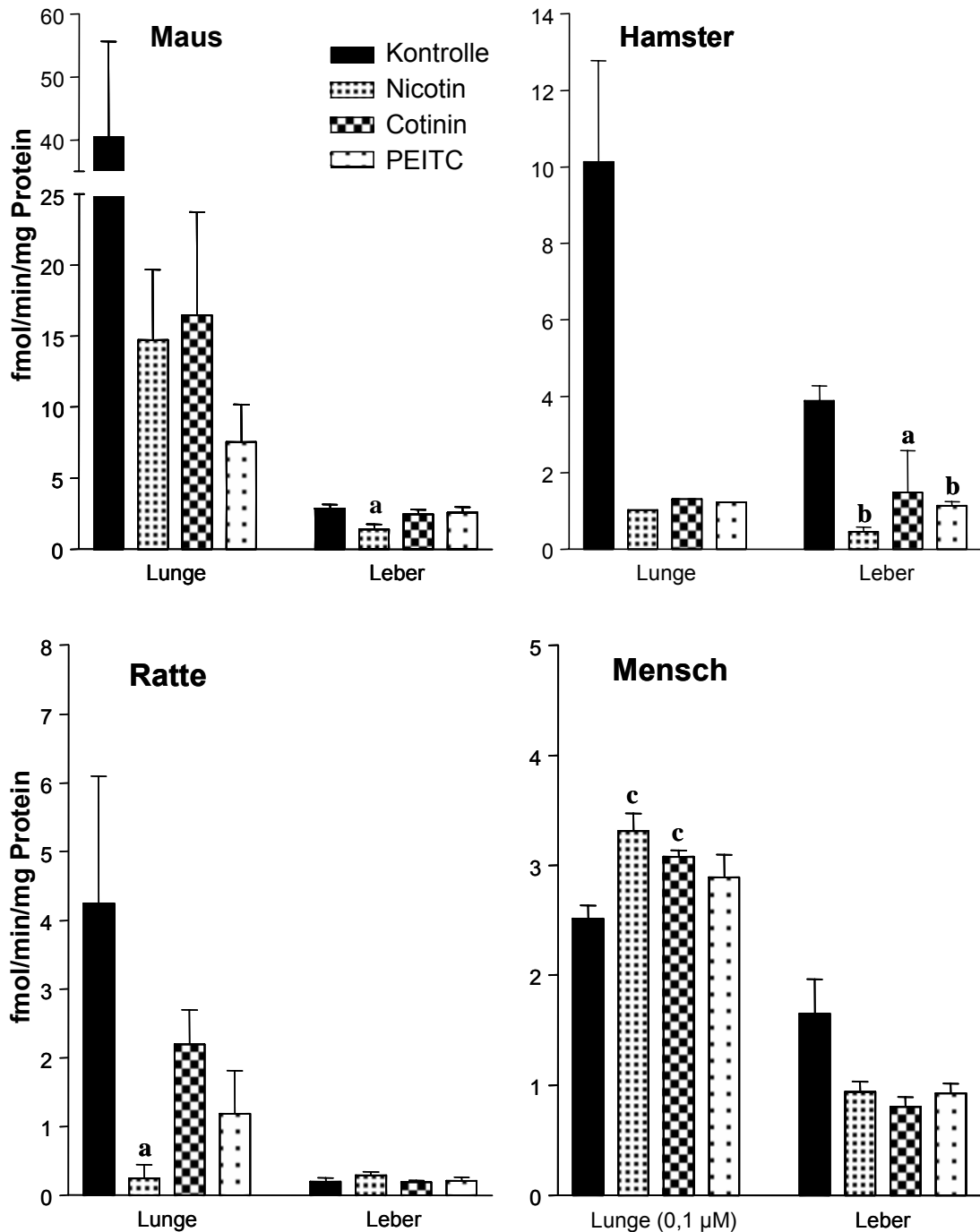


Abbildung 3-27: Effekt von Nicotin (5 µM), Cotinin (50 µM) und PEITC (0,2 µM) auf den Umsatz von 0,016 µM NNN nach 6 Std. Inkubation in Leber- und Lungenschnitten von Hamstern, Mäusen, Ratten und Menschen (MW±SE; N= 5 bis 6, Hamsterlunge N=1; Hamsterleber N=3; a, b, c: Signifikant verschieden zur Kontrolle, p<0,05 (a); p<0,001 (b); und p<0,01 (c).

Co-Inkubation von Leberschnitten der Maus bei 0,016 µM NNN mit Nicotin hatte einen signifikanten Rückgang des NNN-Stoffwechsels um 51% gegenüber der Kontrolle zur Folge. Durch gleichzeitige Inkubation mit Cotinin konnte nur ein Rückgang um 14% beobachtet werden. Die Inkubation der Mäuseleber mit PEITC hatte bei dieser NNN-Konzentration

ebenfalls keinen deutlichen Effekt (9%) auf die Verstoffwechslung des NNN. In der Lunge der Maus konnte dagegen bei allen drei Substanzen eine Hemmung beobachtet werden. Sowohl die Inkubation mit 5 μM Nicotin und 50 μM Cotinin als auch mit 0,2 μM PEITC bewirkten einen Rückgang der NNN-Verstoffwechslung um 64%, 59% sowie 81%. Aufgrund der hohen Streuung erreichen die Unterschiede jedoch nicht Signifikanzniveau.

Die stärkste Hemmung des NNN-Metabolismus konnte mit einem signifikanten Rückgang des Metabolismus um 94% des Kontrollumsatzes in der Rattenlunge durch Nicotin beobachtet werden. Beim Cotinin ergab sich ein Rückgang um 48%, PEITC bewirkte eine Reduktion von 72%. Wird Rattenleber mit NNN und Nicotin, Cotinin und PEITC co-inkubiert, so zeigen sich teils erhöhte Umsatzraten.

In humanen Lungen- und Leberschnitten lieferten die Untersuchungen zur Beeinflussung des NNN-Metabolismus deutlich unterschiedliche Ergebnisse. Während die drei Substanzen den NNN-Umsatz in der Lunge nach 6 Stunden etwas erhöhten, konnte in der Leber ein Rückgang des Umsatzes von 0,016 μM NNN verzeichnet werden. Durch die gleichzeitige Inkubation der humanen Leberschnitte mit 5 μM Nicotin, ging die Verstoffwechslung des eingesetzten NNN um 43% zurück. Co-Inkubation mit 50 μM Cotinin ergab einen Rückgang des NNN-Metabolismus auf 51% des Kontrollumsatzes, gleichzeitige Inkubation mit 0,2 μM des Chemopräventivums PEITC bewirkte eine Reduktion auf 44% der Kontrollen.

4. Diskussion

Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass unter den Krebserkrankungen in Deutschland der Lungenkrebs bei den Männern in der Todesursachenstatistik an erster Stelle steht. Eine Vielzahl von Studien erhärteten die Tatsache, dass das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken stark mit dem Genuss von Tabakprodukten korreliert und Männer wie Frauen gleichermaßen betroffen sind [7]. Im Laufe der Zeit floss dabei immer wieder das Argument der Passivrauchbelastung von Nichtrauchern in die Diskussion um ein erhöhtes Krebsrisiko durch das Rauchen mit ein [21-23]. Die Bemühungen, einen geeigneten Biomarker zu finden, um die relative Aufnahme relevanter Kanzerogene aus dem Zigarettenrauch beim Raucher und Nichtraucher zu erfassen, bewegten sich in Richtung DNA- und Hämoglobinaddukte von tabak-spezifischen Nitrosaminen (TSNA) [191,192]. Aufgrund ihres starken kanzerogenen Potenzials spielen das *N*-Nitrosornicotin (NNN) und das 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) unter den TSNA die wichtigste Rolle. Sie entstehen bei der Nitrosierung der Tabakalkaloide Nicotin und/oder Nornicotin und sind bisher nur im Tabak und Tabakrauch nachgewiesen worden. Sowohl NNN als auch NNK stellen so genannte Präkanzerogene dar, die ihr Potenzial erst nach metabolischer Aktivierung im Organismus entfalten. Dabei entsteht bei NNN und NNK ein instabiles Produkt, welches zu einer Pyridyloxobutylierung an Proteinen und der DNA führt. Bei NNK entsteht zusätzlich eine reaktive methylierende Spezies. Myosmin, ein weiteres Alkaloid, wird einerseits leicht zu NNN nitrosiert und löst andererseits über eine instabile Zwischenstufe eine direkte Pyridyloxobutylierung aus [44,45]. Die Entdeckung des bisher als tabakspezifisch bezeichneten Myosmins in einer Vielzahl von Grundnahrungsmitteln [38,40] schafft neue Erklärungsansätze bei der bisher noch unbefriedigt gelösten Suche nach spezifischen Biomarkern der Tabakrauchbelastung. Die Tatsache, dass sich die HPB-freisetzenden Hämoglobinaddukte bei Rauchern und Nichtrauchern nur um den Faktor 2-3 unterscheiden und nicht um mindestens das 100-fache - wovon man durch die erhöhte Aufnahme an TSNA durch das Rauchen ausging - erhärtet den Verdacht einer zusätzlichen tabakunabhängigen Quelle für Addukte am Hämoglobin. Eine weitere mögliche Ursache für die geringen Unterschiede der Addukt mengen bei Rauchern und Nichtrauchern ergab sich für *Scherer und Richter* [193] in einer unterschiedlichen Metabolisierung von TSNA bei Rauchern und Nichtrauchern. Unterschiede in den Metabolisierungskapazitäten von humanem und tierischem Gewebe erfordern vergleichende Untersuchungen zum Metabolismus bei Menschen und Labortieren. Da sich eine Untersuchung von Kanzerogenen beim Menschen *in vivo* nicht durchführen lässt, musste eine *in vitro* Methodik ausgewählt werden, mit der man den Bedingungen *in vivo* so nahe wie möglich kommt. Mit der Untersuchung des Metabo-

lismus in Gewebeschnitten kann man diesen Anforderungen am ehesten gerecht werden [183,186]. In der vorliegenden Arbeit sollten die speziesspezifischen Unterschiede des NNN-Metabolismus in den Organen Lunge und Leber der Ratte, Maus und des Menschen untersucht werden.

Der zweite Teil der Arbeit untersucht den Einfluss von Nicotin, Cotinin und PEITC auf den Metabolismus von NNN. Wie schon in früheren Studien zur Hemmung bzw. chemopräventiven Wirkung dieser Tabak- und Pflanzeninhaltsstoffe im Zuge der NNK-Aktivierung, sollen in der vorliegenden Arbeit entsprechende Effekte auf den NNN-Stoffwechsel in Gewebeschnitten aufgeklärt werden.

4.1. Gewebeschnitte als Methode für *in vitro* Studien

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Herstellung von Gewebeschnitten aus den Organen Lunge und Leber verschiedener Spezies ein Krumdieck Tissue Slicer verwendet [194]. Dieses Präzisionsschneidegerät hat sich in der Vergangenheit im Bereich der Herstellung von Gewebeschnitten gut etabliert, da es den Anforderungen an *in vitro* Modellen in der Pharmakologie und Toxikologie gerecht werden kann. Faktoren wie eine gute Reproduzierbarkeit, eine leichte Handhabung oder kostengünstige Herstellung wird mit diesem System garantiert. Kein anderes *in vitro* Inkubationsmodell, welches auch für menschliches Gewebe in Frage kommt, gibt die Komplexität der Vorgänge in einem Organismus besser wieder. Im Vergleich zu Mikrosomen (oder auch isolierten Zellen) besitzen Gewebeschnitte zwar eine geringere Stoffwechselkapazität, doch diesem Nachteil kann das Vorhandensein aller am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Zelltypen und eine intakte interzelluläre Kommunikation entgegengesetzt werden. Da es Gewebeschnitte aufgrund ihrer größeren Vielfalt an Zelltypen ermöglichen sämtliche Phase I und Phase II Reaktionen des Fremdstoffmetabolismus im jeweiligen Organ durchzuführen und zu untersuchen, wird im Rahmen eines *in vivo* – *in vitro* Vergleichs den Erkenntnissen solcher Studien mehr Bedeutung geschenkt als anderen *in vitro* Untersuchungen [186].

Zur Gewinnung von Leberschnitten konnte ohne Einschränkung oder Modifikation bei allen untersuchten Spezies problemlos mit dem Krumdieck Tissue Slicer gearbeitet werden. Lediglich die Gewinnung von humanem Probenmaterial - sowohl in Bezug auf Größe als auch der Frequenz - um daraus die benötigte Anzahl von Gewebeschnitten herzustellen, stellte ein erhebliches Problem dar. Die Herstellung von humanen Lungenschnitten gestaltete sich ebenfalls schwierig, da die in der Arbeit von *Stefaniak et al.* [195] beschriebene Methode zur

Gewinnung von Lungenschnitten mit dem Krumdieck Tissue Slicer das Befüllen des Organs mit Agarose vorsieht. Für die Humanlungenproben musste die beschriebene Vorgehensweise entsprechend angepasst werden. Bei der zu Grunde liegenden Methode wird die Lunge mit auf Körpertemperatur erwärmter, in NaCl gelöster Agaroselösung perfundiert, durch Abkühlen zum Erstarren gebracht und anschließend erst geschnitten. Aufgrund der geringen Größe und Beschaffenheit der humanen Lungenproben war es nicht möglich die Organproben ausreichend zu stabilisieren um im Anschluss eine ausreichend große Menge an Gewebeschnitten zu erhalten. Für die Arbeit mit Lungen von Nagern ergaben sich mit dieser Methode jedoch keinerlei Probleme.

Im Vergleich zu den Vorgängermodellen des Krumdieck Tissue Slicers, bei denen sich die gesamte Schneideapparatur der Gerätes außerhalb des Pufferbads befand, war mit dem verwendeten Gerät gewährleistet, dass sich die gewonnenen Schnitte zu keiner Zeit außerhalb des Puffers bzw. der physiologischen Kochsalzlösung befanden. Zudem konnte durch einen Zu- und Ablauf von gekühltem Wasser eine gleichmäßige Schneidetemperatur eingehalten werden, was insgesamt eine Schonung der Schnitte bzw. der Zellen ermöglichte. Die Vitalität der gewonnenen Schnitte wurde stichprobenartig durch Messung des Lactatdehydrogenase-Austritts aus der Zelle in das Medium bestimmt. Die Bestimmung dieses Parameters gilt mittlerweile allgemein als etabliert [196,197]. Die Gewebeschnitte zeigten auch 6 h nach Inkubation keine signifikante Freisetzung des Enzyms, die auf eine zunehmende Zellschädigung hinweisen würde. Die Ergebnisse zum LDH-Austrittes korrelieren durchaus mit den Erkenntnissen aus vorangehenden Studien [198]. Auf die Untersuchung des Kaliumaustrittes aus der Zelle, eine weitere verbreitete Methode zur Vitalitätsprüfung von Zellen, konnte in unserer Arbeitsgruppe aufgrund fehlender apparativer Ausstattung nicht zurückgegriffen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Inkubationsmethodik, allgemein als „Dynamic Organ Culture System“ bezeichnet [187,194,199], unterscheidet sich nur geringfügig von der bisher in vielen Arbeitsgruppen verwendeten Methode. Der größte Vorteil liegt in einer reduzierten Zellschädigung, da die Gewebeschnitte nicht, wie oft beschrieben, auf Netze aus Edelstahl oder Titan gelegt und in runde, verschließbare Inkubationsgefäße eingebracht werden, sondern in glatten Polypropylen-Gefäßen inkubiert werden. Durch langsame Rotation der Gefäße kann somit eine Zellschädigung durch Abrieb von Zellschichten weitgehend vermieden werden. *Dogterom* [200] konnte mit seiner vergleichenden Arbeit über verschiedene Inkubationssysteme nachweisen, dass durch das Drehen und wiederholte Eintauchen der auf den Netzen liegenden Gewebeschnitte den Zellen ein deutlicher Schaden zugefügt wird. Der Nachweis erfolgte über die Quantifizierung des Kaliumaustritts aus den Zellen.

4.2. **Übertragbarkeit der *in vitro* Experimente auf die *in vivo* Situation**

Die Entwicklung moderner Gewebeschneider ermöglicht die reproduzierbare und schnelle Herstellung von Gewebeschnitten. Mit Hilfe dieser Geräte trat diese Untersuchungsmethode in den letzten Jahren wieder in den Vordergrund und wird wieder vermehrt für Metabolismusstudien in der Pharmakologie und Toxikologie herangezogen [201]. Zudem besteht eine weitere Notwendigkeit für möglichst realistische Untersuchungsmethoden für den Fremdstoffwechsel nicht nur in der Leber, sondern auch in Zielorganen der Toxizität und Kanzerogenität darin, dass *in vivo* Untersuchungen am Menschen nur begrenzt möglich sind. Systematische Studien mit definierter Belastung können am Menschen nur mit weitgehend ungiftigen Substanzen vorgenommen werden. Des Weiteren sind die Untersuchungsmöglichkeiten in der Regel auf Körperflüssigkeiten und Exkremente beschränkt. Die Inkubation von Schnitten aus humanen Gewebeproben lässt jedoch auch die Untersuchung toxischer oder kanzerogener Substanzen zu und bietet die Möglichkeit relevante Zielorgane wie z.B. beim Raucher die Lunge, zu untersuchen. Bei Versuchstieren können bei Gabe von Kanzerogenen nach Ablauf der Versuchszeit entweder durch Obduktion direkt das Ergebnis in Form von Tumorinzidenz und –multiplizität abgelesen, oder in komplexeren Verfahren Parameter der Initiation, z.B. kovalente DNA-Addukte und Indikatoren für Promotion und Progression wie Onkogene, Tumorsuppressoren und Tumormarker quantifiziert werden. Beim Menschen kann diese Art von Untersuchungen nicht vorgenommen werden. Hier stellt die Arbeit mit Gewebeschnitten eine brauchbare Alternative dar. Da jedoch Gewebeschnitte nur einen Teil des Organs, aus dem sie gewonnen werden, darstellen, kann sowohl eine Übertragbarkeit auf das gesamte Organ als auch eine Extrapolation auf den gesamten Organismus nur mit Einschränkungen gemacht werden. Im Vergleich zu Hepatocyten zeichnen sich Gewebeschnitte generell durch höhere k_m -Werte und kleinere Werte der intrinsischen Clearance aus. Dies kann dadurch begründet werden, dass die Versorgung der Zellen mit Substrat nur durch Diffusion erfolgt, da ein dem Blutkreislauf entsprechendes Transport- und Verteilungssystem bei *in vitro* Inkubationen fehlt [186]. Für bestimmte Substanzen sind aber bereits Skalierungsfaktoren für die Übertragbarkeit von Schnittergebnissen zu Hepatocyten oder *in vivo* Ergebnissen aus Tierversuchen bekannt, mit deren Hilfe Extrapolationen in gewissem Maße möglich sind [199]. Des Weiteren konnten *de Kanter et al.* [202] mit ihrem Vergleich der metabolischen Clearance *in vivo* und *in vitro* eindrücklich beweisen, dass Gewebeschnitte als *in vitro* Modell durchaus die Situation im Organismus wiedergeben können, den direkten Vergleich mit dem Menschen zulassen und eine Reduzierung der im Experiment eingesetzten Anzahl von Tieren

ermöglichen. In Organen wie der Lunge, die mit einer größeren Vielzahl von unterschiedlichen Zellen ausgestattet sind, die am Fremdstoffwechsel teilhaben können, wird der Vorteil von Gewebeschnitten deutlich größer. Hinzu kommt, dass die Methoden zur Isolierung von Zellen und Mikrosomen aus anderen Geweben, als der Leber bei weitem nicht so gut etabliert sind und z.T. zu erheblichen Verlusten fremdstoffmetabolisierender Kapazität führen können [184].

4.3. DNA-Addukte

Die Erzeugung von DNA-Addukten durch Inkubation von Lungen- und Leberschnitten der Ratte mit radioaktiv markierten Nitrosaminen ergaben für NNN eine relativ hohe Bindung der Radioaktivität in der Leber (0,005%). In der Lunge konnte eine Bindung von nur 0,0001% gemessen werden. Im Vergleich dazu zeigte sich, wie erwartet, die höchste Bindung nach Inkubation mit NNK in Lungenschnitten (0,02%) und weniger in der Leber (0,0004%). Somit kann auch durch die Arbeit an Schnitten die Aussage über NNK als starkes Lungenkanzerogen bestätigt werden [102]. Summiert man jeweils die erzeugte Bindung in Leber und Lunge auf, erreicht man für NNN nur ca. 24% der für NNK bestimmten Bindung. Das stimmt gut mit den *in vivo* erhaltenen Ergebnissen von *Carmella et al.* [203] überein, die bei Vergleich der Bildung von HPB-Addukten durch NNN und NNK in der Ratten mit NNN bei gleicher Dosis nur ca. 16% der durch NNK erzeugten Hämoglobinadduktmenge fanden.

4.4. NNN-Metabolismus in Gewebeschnitte

Lange Zeit stand das Nitrosamin NNK als Lungenkanzerogen im Mittelpunkt der Forschung. Die Hauptmetaboliten des NNK, NNAL und NNAL-Glucuronid, konnten sowohl im Urin von NNK-belasteten Nagern als auch von Rauchern nachgewiesen werden [204]. Da NNK bisher ausschließlich in Tabakprodukten und mit ETS belasteter Luft nachgewiesen wurde, können NNK-Metaboliten als tabakspezifische Biomarker beim Menschen Anwendung finden. In jüngster Zeit steigt das Interesse an NNN, jedoch stehen bisher nur wenige Informationen zum Metabolismus von NNN in Gewebeschnitten zur Verfügung. Mit dieser Arbeit konnte erstmals der direkte Vergleich von Ergebnissen aus NNN-Metabolisierungsversuchen in Gewebeschnitten von Mensch und Nagern unter identischen äußeren Versuchsbedingungen angestellt werden. Die Inkubationen erstreckten sich dabei über einen Konzentrationsbereich von 0,001 $\mu\text{mol/l}$ bis 1,2 $\mu\text{mol/l}$. In einer anderen Studie (des Arbeitskreises) mit Leber- und

Lungenschnitten von Hamstern wurden auch Konzentrationen bis 250 μM untersucht. Die Notwendigkeit den NNN-Metabolismus bei so niedrigen Konzentrationen zu untersuchen, macht folgende Rechnung plausibel: Ein Raucher nimmt in Deutschland mit 20 Filterzigaretten im Schnitt $1,05 \pm 0,57 \mu\text{g}$ NNN pro Tag auf [49], was einer Menge von 5,93 nmol oder, bezogen auf ein durchschnittliches Körpergewicht von 70 kg, einer Konzentration von 0,08 nmol/kg entspricht. Diese ist bereits in dieser Summenbetrachtung mehr als 10-fach niedriger als die von uns in Gewebeschnitten untersuchte niedrigste Konzentration. Berücksichtigt man noch, dass diese NNN-Mengen nicht auf einmal, sondern über den Tag verteilt aufgenommen werden und dass die NNN-Konzentrationen sich durch Metabolismus und Ausscheidung wieder ständig vermindern, dann muss man von noch wesentlich geringeren NNN-Konzentrationen in den Geweben ausgehen.

4.4.1. NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten der Maus

Bei der Maus wurde die Lunge als Zielorgan der NNN-Kanzerogenese beschrieben [102]. Zwar ist das NNN ein weitaus schwächeres Lungenkanzerogen als NNK, doch konnten mit einer intraperitonäalen Gabe von NNN wiederholt Lungentumoren in A/J Mäusen induziert werden (Tab. 1-5). Autoradiographische Studien zeigten eine rasche Verteilung von ^{14}C -markiertem NNN im gesamten Organismus. Dabei wurde eine Anreicherung von gebundener Radioaktivität insbesondere in der Bronchial- und Nasenschleimhaut, der Leber, den Speicheldrüsen und dem Ösophagus beobachtet [101]. Die Metabolisierungskapazität der Lungenschnitte liegt bei der Maus über der der Leberschnitte, was für die nachgewiesene Organspezifität von NNN in der Maus spricht. Anders als erwartet, lagen die bei der Maus ermittelten k_m -Werte, verglichen mit den übrigen untersuchten Spezies, insbesondere in der Lunge, aber auch in der Leber höher. In beiden Organen ergaben sich erhöhte Werte insbesondere für die α -Hydroxylierung der 2'-Position. Das Verhältnis von 2'- zu 5'-Hydroxylierung lag in der Leber bei 1,1 und in der Lunge bei 2,3. Die 2'-Hydroxylierung spiegelt indirekt das kanzerogene Potenzial von NNN wieder, da bisher nur über diesem Weg die Bildung von DNA- und Hämoglobinaddukten nachgewiesen wurde. So konnten in Lungengewebe von Mäusen, die mit NNN behandelt wurden, HPB-freisetzende Addukte an der DNA gemessen werden [205].

4.4.2. NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten der Ratte

Die wichtigsten Zielorgane für die Kanzerogenität von NNN in der Ratte sind die Nasenhöhle und der Ösophagus (Tab. 1-5). Dabei spielt die Art der Applikation des Kanzerogens eine wichtige Rolle. Die Gabe von NNN über das Trinkwasser verursacht in der Ratte Tumoren in Nasenhöhle und Ösophagus [119,137]. Nach subkutaner Injektion führte NNN bei der Ratte hauptsächlich zur Ausbildung von Tumoren in der Nasenhöhle [121]. Der Hauptstoffwechselweg *in vivo* läuft bei Ratte, Maus und dem Hamster über die α -Hydroxylierung. Die im Urin nachgewiesenen Hauptmetaboliten sind Hydroxysäure und in einem etwas geringeren Maße die Ketosäure [106]. Unterschiede der Metabolitenanteile *in vivo* und *in vitro* zeigte eine Studie von *Hecht und Young* [105], wonach im Rattenurin der größte Anteil der Metaboliten nach 5'-Hydroxylierung resultierten, gefolgt von *N*-Oxidation und 2'-Hydroxylierung. Die Inkubation von Gewebekulturen des Ösophagus zeigte hauptsächlich Hydroxylierung an der 2'-Position, jedoch keine Pyridin-*N*-Oxidation. Die Inkubation von Lungen- und Leberschnitten der Ratte in der vorliegenden Arbeit ergaben organspezifische Ergebnisse. Während die Leber den geringsten Gesamtumsatz von NNN zeigte und der größte Anteil zu Norcotinin umgesetzt wurde, verstoffwechselte die Rattenlunge den größten Teil des NNN über die 2'-Hydroxylierung. Eine Pyridin-*N*-Oxidation konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. In der Rattenleber ergaben sich um das 10-fache erhöhte k_m -Werte gegenüber der Rattenlunge. Anders als in der Maus liegen die k_m -Werte zur 5'-Hydroxylierung über dem k_m -Wert der 2'-Hydroxylierung. In der Rattenlunge sind die k_m -Werte für beide α -Hydroxylierungswege in etwa gleich. Die ermittelten k_m -Werte liegen sowohl in der Leber als auch in der Lunge weit unter denen der Maus. Der Vergleich der V_{max} zwischen den Spezies ergab ebenfalls für die Ratte, sowohl in der Leber als auch in der Lunge erhebliche Unterschiede. So liegen die Reaktionsgeschwindigkeiten für die α -Hydroxylierung aber auch die Norcotinin-Bildung in den Organen der Ratte weit unter denen der Maus. Der Vergleich der intrinsischen Clearance zeigt, wie erwartet, dass bei beiden Spezies (verstärkt bei der Maus) in der Lunge pro mg Protein wesentlich mehr verstoffwechselt wird als in der Leber. Verglichen mit Ergebnissen aus der Literatur wurden in der vorliegenden Arbeit wesentlich kleinere k_m - und V_{max} -Werte ermittelt. Während *Chen et al.* [206] in ihrer Arbeit mit Rattenlebermikrosomen k_m -Werte im millimolaren Bereich erhielten (1,81 mM für die 2'-Hydroxylierung und 1,96 mM für die 5'-Hydroxylierung), lagen in den Leberschnitten die Werte im mikromolaren Bereich. Auch *Murphy et al.* [207] ermittelten für den NNN-Stoffwechsel in Lebermikrosomen k_m -Werte im millimolaren Bereich, während sie für Mikrosomen aus dem Ösophagus Werte im mikromolaren Bereich erhielten.

4.4.3. NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten des Menschen

Der Gesamtmetabolismus von humanen Gewebeschnitten der Leber und der Lunge wies einen deutlichen Unterschied auf. Während von der Leber nach 6 Stunden Inkubation im Mittel 18% des eingesetzten NNN verstoffwechselt wurde, konnte man in der humanen Lunge bei gleicher Versuchszeit und Konzentration keinen messbaren Umsatz erkennen. Erst der Einsatz einer höheren Radioaktivitätsmenge, also höherer NNN-Konzentrationen mit unverdünnter spezifischer Aktivität, förderte vereinzelt ein Metabolitenmuster zu Tage. Dabei lag der Umsatz des eingesetzten NNN mit 5% ebenfalls weit unter der Metabolisierungskapazität der Humanleber und der Umsätze bei den Nagern, einschließlich des Hamsters [182,208]. Dieses Ergebnis war nicht unbedingt zu erwarten, denn unter gleichen Bedingungen wurde in einer früheren Dissertation im Arbeitskreis bei NNK kein so großer Unterschied zwischen Ratten und Menschen hinsichtlich der Aktivierung durch α -Hydroxylierung gesehen [188,209]. Bei der Untersuchung zeigten Lungenschnitte von 3 von 10 Patienten eine deutlich höhere Aktivität als der Rest. Ob solche Unterschiede auch hinsichtlich des NNN-Metabolismus bestehen, kann durch die vorliegende Arbeit nicht sicher ausgeschlossen werden. Untersuchungen an verschiedenen humanen extrahepatischen Gewebeproben ergaben, dass die Aktivität des Menschen, NNN zu metabolisieren um das 10. bis 100-fache unter der von Nagern liegt und der Stoffwechsel vorrangig über die 5'-Hydroxylierung abläuft [210]. Gleiche Ergebnisse erhielten *Staretz et al.* [211] in ihrer Arbeit mit Humanlebermikrosomen, während die α -Hydroxylierung in Mikrosomen aus humanem Ösophagus in etwa zu gleichen Teilen an der 2'- und 5'-Position stattfindet [117]. Des Weiteren ließ sich feststellen, dass der Mensch *in vitro* (Lebermikrosomen) NNN schneller metabolisiert als NNK, NNAL oder BaP [211]. Das Verhältnis von 2'- und 5'-Hydroxylierung ergibt in Lebermikrosomen einen Wert von 0,02 und in Leberschnitten 0,1. In humanen Lungenschnitten, die mit einer höheren Konzentration inkubiert wurden, ergab sich eine Metabolisierung ausschließlich über die 2'-Position. Die ermittelten k_m -Werte in der humanen Leber liegen im Vergleich zu den Nagern weit darunter. Bisher konnten nur *in vitro* Untersuchungen zum humanen Metabolismus von NNN und weiteren Nitrosaminen gemacht werden. Auf der Suche nach einem möglichen Biomarker zur Exposition mit NNN beim Menschen bezogen sich *Upadhyaya et al.* [109] auf Ergebnisse aus Untersuchungen des NNK-Metabolismus im Affen, die zeigten, dass durchaus Gemeinsamkeiten zwischen Mensch und Affe vorzuweisen sind [212]. So wurden im Urin von mit NNN behandelten Affen hauptsächlich Hydroxysäure, resultierend aus der 5'-Hydroxylierung, und Norcotinin nachgewiesen.

4.4.4. Vergleich des NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten von Maus, Ratte, Hamster und Mensch

Der direkte Vergleich des NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten unter identischen Bedingungen bei einer Konzentration von 0,016 μM zwischen Mäusen, Ratten, Hamstern und Mensch zeigt deutlich, dass sich das im Tierversuch ermittelte Krebsrisiko nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen lässt. So ergibt die Gegenüberstellung des Gesamtmetabolismus, dass die Lunge von Maus und Ratte NNN wesentlich besser verstoffwechselt als die Leber (Abb. 3-24). Beim Menschen verhält es sich dagegen genau entgegengesetzt. Während in der Lunge nach 6 h Inkubation kein messbarer Umsatz erkennbar war, ergaben sich für die humane Leber sogar höhere Umsätze als bei der Ratte. Beim Hamster ist zwar der Umsatz in der Leber geringer als in der Lunge, die Unterschiede sind aber weit weniger ausgeprägt als bei Ratten und Mäusen.

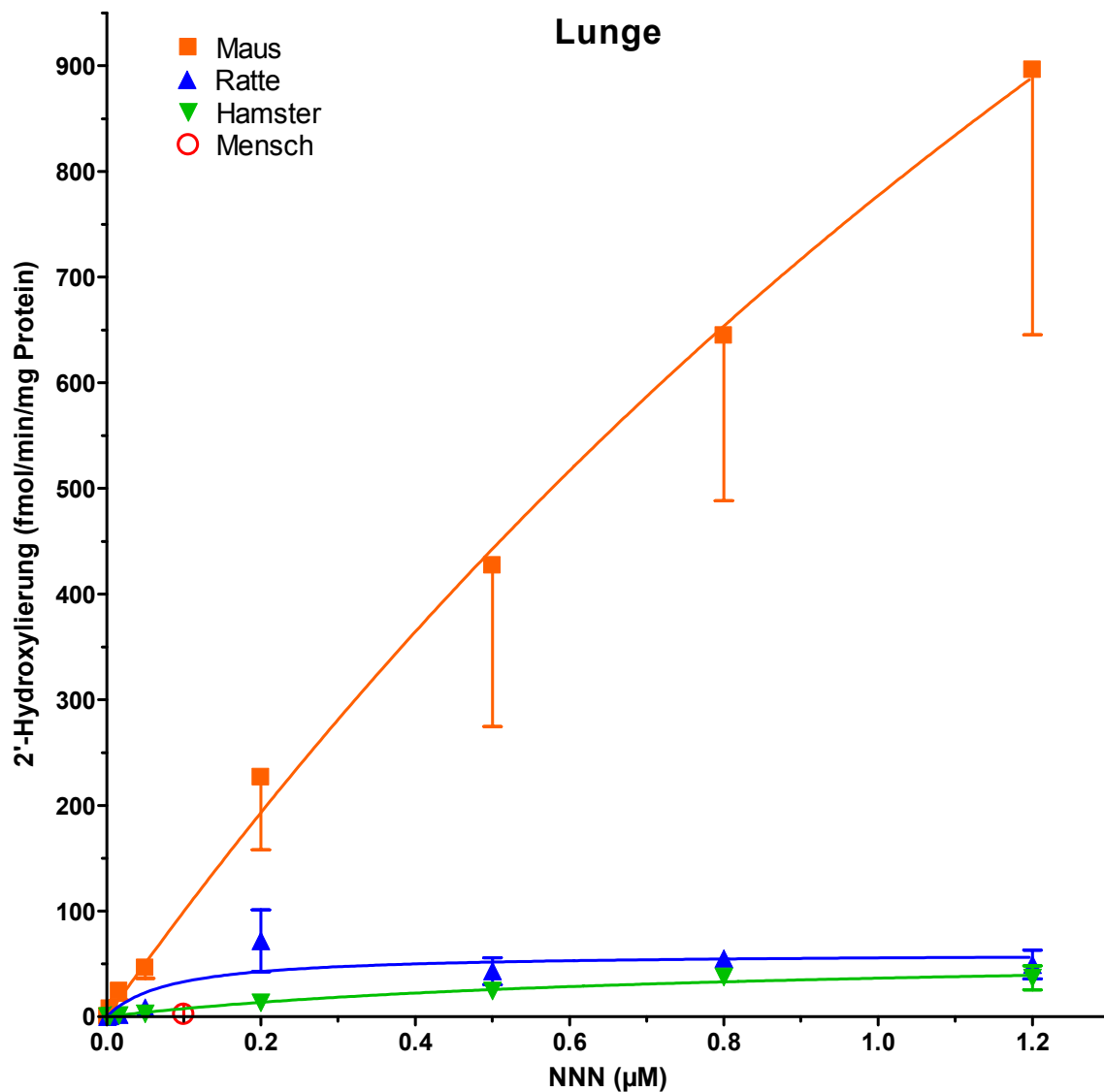


Abbildung 4-1: Speziesabhängige Aktivierung von NNN in Lungenschnitten durch 2'-Hydroxylierung

Die entscheidenden Speziesunterschiede zeigen sich jedoch erst bei der differenzierten Betrachtung der verschiedenen Metabolismuswege. Nach dem aktuellen Stand der Forschung wird die 2'-Hydroxylierung von NNN für dessen kanzerogene Wirkung verantwortlich gemacht. Dieser Stoffwechselweg ist mit großem Abstand in Lungenschnitten von Mäusen am stärksten ausgeprägt, während er bei den anderen Nagern und beim Menschen eine untergeordnete Rolle spielt (Abb. 4-1). In Leberschnitten ist die 2'-Hydroxylierung von NNN bei Hamstern am größten, jedoch immer noch etwa um den Faktor 10 geringer als in den Lungenschnitten der Mäuse (Abb. 4-2). Bei Ratten und beim Menschen ist auch in der Leber die NNN-Aktivierung durch 2'-Hydroxylierung nur sehr gering ausgeprägt. Die Ergebnisse bei den Nagern zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen der Organotropie der NNN-Kanzerogenese und dem Metabolismus in den Schnitten. Die Maus ist die einzige Spezies bei der NNN eindeutig Lungenkrebs erzeugt (Tab. 1-6). Bei keiner Nagerart wurden nach NNN-Gabe Lebertumoren gesehen. Die Untersuchung des Metabolismus in Zielorganen erlaubt bei NNN somit eine gute Vorhersage der kanzerogenen Eigenschaften in den untersuchten Tierarten. Überträgt man diese Ergebnisse auf den Menschen, dann kann man davon ausgehen, dass NNN für die menschliche Lunge und Leber nur ein sehr schwaches Kanzerogen sein sollte.

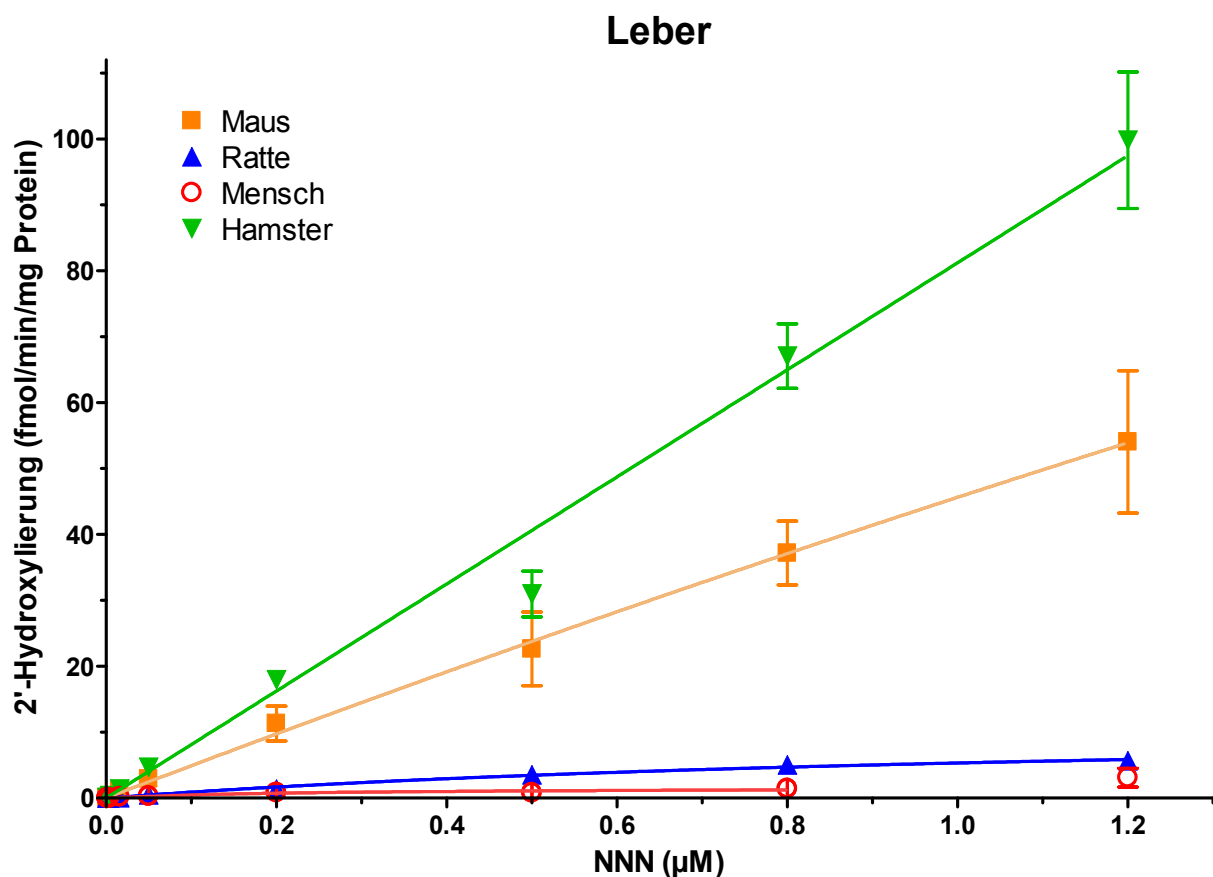


Abbildung 4-2: Speziesabhängige Aktivierung von NNN in Leberschnitten durch 2'-Hydroxylierung

Der Vergleich der Ergebnisse zur Ausscheidung von NNN-Metaboliten *in vivo* und dem Metabolismus in den Gewebeschnitten zeigt ebenfalls die Überlegenheit dieser *in vitro* Methode hinsichtlich der Vorhersage der gewebespezifischen Kanzerogenität, denn in einer vergleichenden Untersuchung mit kanzerogenen Dosierungen von NNN sahen Hecht *et al.* [106] bei Ratte, Maus und Hamster ein nahezu gleiches Metabolitenmuster im Urin. Das Endprodukt der 5'-Hydroxylierung, die Hydroxysäure, machte in diesen Versuchen mehr als die Hälfte der identifizierten Metaboliten aus, die durch 2'-Hydroxylierung gebildete Ketosäure dagegen weniger als ein Viertel. Diese Metaboliten lassen sich im humanen Urin nicht auf die NNN-Belastung zurückführen, weil sie auch aus dem NNK- und in noch wesentlich höheren Mengen aus dem Nicotinabbau resultieren [213].

4.5. Beeinflussung des NNN-Metabolismus

Im Gegensatz zu NNK, dem am meisten untersuchten tabakspezifischen Nitrosamin, zu dem schon eine Vielzahl von *in vivo* und *in vitro* Wechselwirkungsstudien mit verschiedenen Tabakalkaloiden, TSNA und PEITC vorliegen, wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal der Einfluss von Nicotin, Cotinin und PEITC auf den NNN-Metabolismus in Gewebeschnitten untersucht. Die dabei verwendeten Dosierungen orientierten sich an den real im Raucher vorkommenden Verhältnissen und stützten sich auf Erfahrungen, die im eigenen Arbeitskreis bereits mit NNK und NNN in Gewebeschnitten von Hamstern gewonnen wurden [182,208,214]. So konnte durch Einsatz von 5 µM Nicotin dem bis zu 5000-fachen Überschuss gegenüber NNN im Tabakrauch nachgekommen werden, was *in vivo* aufgrund der akut toxischen Wirkung von Nicotin nicht möglich ist. Bei Cotinin orientiert man sich nicht an den Konzentrationen in Tabakprodukten, die nur etwa 20-fach über denen von NNN liegen [215], sondern an den Verhältnissen die im menschlichen Organismus nach Nicotinaufnahme vorliegen. Cotinin als Hauptmetabolit von Nicotin hat eine deutlich längere Halbwertszeit und erreicht deshalb höhere Konzentrationen im Blut und in den Geweben. Der Einsatz von 50 µM Cotinin entsprach einem 50- bis 50000 fachen Überschuss. Die Zugabe von PEITC erfolgte aufgrund der in anderen Studien verwendeten Konzentrationen [164,177].

4.5.1. Hemmung der NNN-Aktivierung durch Nicotin und Cotinin

Der Einfluss von Nicotin und Cotinin auf den NNN-Metabolismus zeigte sich in der vorliegenden Arbeit sowohl bei der Maus als auch bei der Ratte deutlicher in Schnitten der Lunge als in der Leber. Die Co-Inkubation von Nicotin und Cotinin bewirkte in beiden

untersuchten Organen sowohl bei der Maus, als auch bei der Ratte einen deutlichen Rückgang der Metabolitenbildung für alle beobachteten Stoffwechselwege. Eine Verschiebung des Verhältnisses der 2'- zur 5'-Hydroxylierung zu Gunsten der 5'-Hydroxylierung stellte sich nur in Lungenschnitten der Ratte unter Einfluss von Nicotin und Cotinin ein. Von einem Ausgangsverhältnis von 1,2 in den Kontrollen ergab sich für mit Nicotin inkubierte Ansätze ein Verhältnis von 0,8 und für das Cotinin ein Verhältnis von 0,3. Obwohl sich die Ergebnisse zum humanen Lebermetabolismus auf wenige Daten stützen und noch ergänzt werden sollten, kann man aus den hier vorliegenden Ergebnissen bereits absehen, dass Nicotin und Cotinin auch beim Menschen den NNN-Metabolismus hemmen und somit eine Übertragbarkeit von Tierversuchen auf den Menschen auch in dieser Hinsicht möglich sein sollte.

Der Vergleich der Umsatzkonstanten aus Kontrolle und Co-Inkubation zeigt, dass durch den Einsatz von Nicotin und Cotinin sowohl in der Lunge als auch in der Leber bei der Spezies Maus die k_m -Werte aber auch die Reaktionsgeschwindigkeiten abgesunken sind. In der Ratte konnte jedoch eher ein Anstieg der k_m -Werte bei sinkenden Reaktionsgeschwindigkeiten beobachtet werden.

Den Stoffwechsel des NNN kann man vereinfacht mit der Inaktivierung, über die Bildung der Metaboliten Norcotinin und NNN-N-Oxid und der metabolischen Aktivierung mit α -Hydroxylierung an der 2'- und 5'-Position beschreiben, bei der die Metaboliten über instabile, reaktive Zwischenstufen gebildet werden. Eine kovalente Bindung an DNA bzw. Proteine, mit der man das kanzerogene Potenzial einer Substanz beschreiben kann, konnte bisher nur für das aus der 2'-Hydroxylierung entstehende 4-(3-pyridyl)-4-oxobutan-diazohydroxid nachgewiesen werden. Daraus ließe sich ableiten, dass die α -Hydroxylierung an der 5'-Position, zumindest bisher, ebenfalls eine Inaktivierung der Kanzerogens darstellen könnte. Unter Chemoprävention versteht sich zum einen die generelle Verringerung des Gesamtmetabolismus von NNN in einem möglichen Zielorgan und, zum zweiten, durch Verschiebung der Metabolitenanteile aus der 2'-Hydroxylierung hin zur 5'-Hydroxylierung eine verminderte Bildung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten, was somit ebenfalls das kanzerogene Potenzial reduziert. Die chemopräventiv wirkende Substanz sollte aber per se dem Organismus nicht schaden. Dies ist für Nicotin eindeutig nicht der Fall und bei Cotinin nicht auszuschließen. Deshalb sollten diese Substanzen nicht als „chemopräventiv“ bezeichnet werden. Kritisch muss in diesem Zusammenhang aber auch die für PEITC berichtete Förderung der Entwicklung von Blasen Tumoren betrachtet werden [153].

Der Zigarettenrauch ist ein Gemisch aus einer Vielzahl von verschiedenen chemischen Substanzen, die unter anderem Alkaloide und Nitrosamine enthalten. Anders als für das NNN, wurden in der Vergangenheit schon eine Vielzahl an Untersuchungen über Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Inhaltsstoffen von Tabak und Tabakrauch und dem Nitrosamin NNK angestellt. Einige Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Nicotin, Cotinin und Zigarettenrauch auf den NNK-Metabolismus sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Untersuchungen an Gewebekulturen aus der Mundschleimhaut von Ratte haben gezeigt, dass Nicotin auch den Metabolismus von NNN signifikant hemmt [181]. Die Co-Inkubation von Nicotin ergab sowohl eine Erhöhung von unverändertem NNN, als auch eine Verringerung der Metabolitenbildung. *Patten et al.* [112] beschrieben die kompetitive Hemmung der 2'- und 5'-Hydroxylierung von NNN durch NNK und Cumarin in der Nasenschleimhaut von Ratten. Die Tatsache, dass Cumarin ein relativ spezifischer Hemmstoff für Cyp2A6 ist, gibt Grund zur Annahme, dass weitere Substrate dieses Enzyms, wie Nicotin und Cotinin ebenfalls die α -Hydroxylierung von NNN hemmen. Mögliche Ursachen können in der strukturellen Ähnlichkeit von Nicotin, das rasch zu Cotinin verstoffwechselt wird und NNN liegen, wobei es zu einer Überlappung der Substratspezifität des CYP2A6 kommen könnte, welches für die Metabolisierung dieser Substanzen verantwortlich ist [216,217]. *Van Vleet et al.* [218] bestätigten, dass Nicotin, mehr noch als Cotinin auch das Isoenzym CYP2E1 kompetitiv hemmt, welches nachweislich mit der metabolischen Aktivierung von TSNA, insbesondere NDMA und NNK, in verschiedenen Säugetieren und verschiedenen humanen Geweben in Zusammenhang gebracht wurde [113,117,219,220]. Inwiefern das Isoenzym CYP2A13, das nachweislich eine wichtige Rolle im Fremdstoffmetabolismus und der tabak- bzw. NNK-bezogenen Tumorigenese der Atemwege des Menschen spielt [221], auch in den NNN-Metabolismus eingreift, ist noch nicht bekannt. Eine synergistische Wirkung des Konsums Tabak und Alkohol auf die Kanzerogenese im oberen Atem- und Verdauungstrakt ist in vielen epidemiologischen Untersuchungen nachgewiesen worden (Übersicht bei *Seitz et al.* [222]). Während die metabolische Aktivierung und der kanzerogene Effekt von verschiedenen Nitrosaminen durch Ethanol nachweisbar verstärkt wird, die Bedeutung einer Alkoholbelastung für das NNN-Kanzerogenese aus den wenigen Versuchen noch nicht eindeutig abzuleiten [124,125,223]. Über den Nachweis von HPB-absplattendenden DNA-Addukten in den Schleimhäuten der oberen Verdauungs- und Atemwege sollte es möglich sein, den Einfluss von Alkohol- und Tabakgenuss genauer zu charakterisieren. Solche Studien sind im Rahmen einer internationalen Studie in unserer Arbeitsgruppe in Vorbereitung. Erste Ergebnisse mit Schleimhautproben des unteren Ösophagus, die im Rahmen von Autopsien aus der Gerichts-

medizin erhalten wurden, haben allerdings keine Abhängigkeit vom Rauchstatus gezeigt [224]. Hinsichtlich der Spezifität der HPB-abspaltenden DNA-Addukte muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese offensichtlich nicht nur von dem parallel mit NNN aufgenommenen NNK stammen können, sondern auch von Myosmin [46].

Tabelle 4-1: Beeinflussung der NNK-Kanzerogenese und des NNK-Metabolismus durch Tabakrauch und Tabakalkaloide in verschiedenen Spezies

Spezies	Methode	Effekt	Literatur
Maus	NNK + Zigarettenrauch (<i>in vivo</i>)	Keinerlei Entwicklung von Lungentumoren	[225]
Maus	NNK + Zigarettenrauch oder Cotinin (<i>in vivo</i>)	Reduktion von O ⁶ -Methylguanin-Addukten in DNA von Leber und Lunge Signifikante Verringerung von NNK-Metaboliten aus der α -Hydroxylierung und Anstieg von NNAL-Glucuronid (Entgiftung) im 24 h-Urin	[175,226]
Ratte	NNK + 2000- bis 20000-fach niedrigere Nicotinkonzentrationen (<i>in vivo</i>)	Keine Hemmung der metabolischen NNK-Aktivierung in der Leber,	[227]
		Sondern Induktion der metabolischen NNK-Aktivierung in der Lunge	[228]
Ratte	NNK + Nicotin (<i>in vivo</i>)	Signifikante Verringerung von NNK-Metaboliten aus der α -Hydroxylierung und Anstieg von NNAL-Glucuronid und N-Oxid (Entgiftung) im 24 h-Urin	[174]
Hamster	NNK + Nicotin oder Cotinin (<i>in vivo</i>)	Signifikante Verringerung der metabolischen Aktivierung von NNK und Anstieg von NNAL-Glucuronid und N-Oxid (Entgiftung) im 24 h-Urin	[177]
<i>Salmonella typhimurium</i>	Nitrosamine + Nicotin oder Cotinin (<i>in vitro</i>)	Hemmung der Mutagenität von NNK und NDMA, jedoch nicht von NNN	[173]
Ratte	Mit NNK und Nicotin oder Cotinin perfundierte Leber (<i>in vitro</i>)	Signifikante Hemmung der NNK-Elimination, Verringerung der metabolischen Aktivierung durch α -Hydroxylierung, Erhöhung der N-Oxidation und Bildung von NNAL-Glucuroniden	[180]
Ratte	Mit NNK und Nicotin oder Cotinin perfundierte Lunge (<i>in vitro</i>)	Keinerlei derartiger Effekte	
Hamster	Lunge (<i>in vitro</i>) NNK + Nicotin		[229]
Ratte	Mundschleimhäute	Hemmung der α -Hydroxylierung	[181]
Kaninchen	Mikrosomen der Nasenhöhle		[230]

4.5.2. Chemoprävention mit PEITC

Trotz des nachweislich schützenden Effekts einer fruchte- und gemüsereichen Ernährung auf die Entwicklung von Krebserkrankungen beim Menschen, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, welche Inhaltsstoffe dafür hauptsächlich verantwortlich gemacht werden können und auf welche Weise diese in die Kanzerogenese einwirken. Diskutiert und teilweise nachgewiesen sind in diesem Zusammenhang Effekte von Vitaminen, Spurenelementen und phenolischen Verbindungen. In epidemiologischen Studien zur protektiven Wirkung diverser Antioxidantien durch ihre Aufnahme mit der Nahrung, konnte, insbesondere für β -Carotin, Vitamin E und Calcium, eine signifikant umgekehrte Korrelation zu Brustkrebs gezeigt werden [231]. Die präventive Behandlung von Rauchern mit β -Carotin und Vitamin E (ATBC-Studie) [232] bzw. β -Carotin und/oder Vitamin A (CARET-Studie) [233] zeigte dagegen z.T. keine und z.T. sogar negative Auswirkungen auf die Inzidenz von Lungenkrebs. Protektiv gegen Ösophaguskrebs wirken Carotinoide, Vitamin C und E [234,235]. Die Ursache des schützenden Effekts der Ascorbinsäure vor Krebserkrankungen des Magens liegt vermutlich in ihrer reduktiven Reaktion mit dem nitrosierenden Reagens, wobei die im Magen vorhandenen Amine unverändert bleiben. Unter den Teesorten werden insbesondere für grünen Tee chemopräventive Wirkungen beschrieben. Die Ergebnisse epidemiologischer Studien zur Beziehung von Teekonsum und der Entwicklung verschiedener Krebserkrankungen sind jedoch widersprüchlich. In Tierexperimenten mit NNK bewirkten schwarzer und grüner Tee sowie auch Koffein einen Rückgang der Tumorentwicklung [236].

Epidemiologische Studien zeigten schon früh, dass Isothiocyanate, die weitgehend als Konjugate in Kohlgemüse und anderen Gemüsesorten der Familie der Kreuzblütler vorkommen, ein breites Spektrum an hemmenden Effekten auf verschiedene Nitrosamine in Tabakprodukten und Nahrungsmittel haben [160,169]. Von den verschiedensten natürlichen und synthetischen Isothiocyanaten wurden BITC und PEITC bisher am intensivsten untersucht. BITC erwies sich vor allem gegen den durch polyzyklischen Kohlenwasserstoffe wie DMBA und BaP ausgelösten Brustkrebs in Ratten und den Lungenkrebs in Mäusen als effektives Chemopräventivum, weniger jedoch bei der Nitrosamin-induzierten Kanzerogenese. Dagegen ist PEITC ein effektiver Inhibitor der NNK-induzierten Tumorigenese. Dies geht parallel mit der in zahlreichen *in vitro* Studien nachgewiesenen Hemmung des NNK-Stoffwechsels insbesondere in allen untersuchten Gewebeproben der Ratte, ausgenommen der Nasenhöhle [148].

In der vorliegenden Arbeit zeigt PEITC in Leberschnitten von Ratten und Mäusen gegenüber NNN nicht über den gesamten Konzentrationsbereich einen hemmenden Effekt (Abb. 3-19a

und 3-21a). Dagegen war bei Hamster [237] und Mensch (Abb. 3-23) ein deutlicher Rückgang der hepatischen NNN-Metabolisierung festzustellen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen *Staretz et al.* [238], die in ihrer Arbeit mit Rattenlebermikrosomen keinen Effekt von PEITC auf die metabolische Aktivierung von NNK feststellen konnten, während beim Hamster PEITC sowohl die *N*-Oxidation als auch die α -Hydroxylierung von NNK hemmte [239]. Ebenso zeigte in der vorliegenden Arbeit der Vergleich der Kinetiken zum NNN-Metabolismus in Leberschnitten der Maus und der Ratte, dass sich durch den Einsatz von PEITC keine nennenswerten Veränderungen der kinetischen Parameter k_m und V_{max} und damit auch der intrinsischen Clearance einstellten (Tab. 3-4 und 3-7; Abb. 3-20a und 3-22a).

In Lungenschnitten hemmte PEITC dagegen bei allen Nagern die NNN-Metabolisierung (Abb. 3-19b und 3-21b; [237]). Beim Menschen waren wegen des extrem geringen Umsatzes von NNN in der Lunge keine Hemmversuche möglich. Am wenigsten konsistent war die Hemmung bei der Maus. Aber auch bei dieser Tierart war die toxikologisch relevante 2'-Hydroxylierung überwiegend gehemmt. Die Co-Inkubation mit PEITC führte in der Lunge der Maus und Ratte, zu Veränderungen der Michaelis Menten Kinetik, die eine Verringerung der intrinsischen Clearance zur Folge hatten. Ausschließlich für den Metaboliten Norcotinin, dessen Bildung als NNN-Entgiftung zu werten ist, ergab sich in der Mäuselunge eine Erhöhung der Clearance. Während sich die V_{max} - und k_m -Werte für die 2'-Hydroxylierung in der Mäuselunge verkleinerten, stiegen sie für die 5'-Hydroxylierung an. In der Rattenlunge ergab sich sowohl für die 2'- und 5'-Hydroxylierung als auch für den Metaboliten Norcotinin eine Verringerung der V_{max} - und Erhöhung der k_m -Werte.

Ein stärkerer chemopräventiver Effekt von PEITC in der Lunge als in der Leber wurde auch bei NNK beobachtet. Nach gleichzeitiger Gabe von NNK und PEITC wurde bei Ratten eine signifikante Reduzierung von Tumoren in der Lunge, jedoch nicht in Leber und Nasenhöhle gesehen. Die Inzidenz von Pankreastumoren zeigt eine nicht signifikante Erhöhung [149]. Im gleichen Versuch wurde in der Lunge ein Rückgang der Methylierung und Pyridyloxobutylierung der DNA um 50% beobachtet, dagegen blieb die DNA-Methylierung in Leber und Nasenhöhle unverändert. Nach gleichzeitiger oraler Gaben von NNK und PEITC konnten *Hecht et al.* [166,167] neben einer totalen Hemmung von Tumoren in der Lunge zudem im Rattenurin einen Anstieg der NNK-Metaboliten NNAL und NNAL-Gluc um das 4- bis 6-fache beobachten. Gleichzeitig reduzierten sich HPB freisetzende Hämoglobinaddukte wieder um die Hälfte. Auch in der Maus konnte der chemopräventive Effekt von PEITC schon erfolgreich nachgewiesen werden [161,240]. Über die tatsächlichen Mechanismen der biologischen Hemmung besteht jedoch noch nicht eindeutig Klarheit [148]. So beschreiben

Witschi et al. [151], dass PEITC keinen Effekt auf die Entwicklung von Lungentumoren bei mit ETS belasteten Mäusen zeigte. Des Weiteren berichteten *Hirose et al.* [153], dass sowohl PEITC als auch BITC zu einem Anstieg der Entwicklung von Blasentumoren in der Ratte führten. In Zusammenhang mit der Hemmung des Nitrosamins NNK stellten *Staretz und Hecht* [241] die Vermutung an, dass die Hemmung spezifischer Cytochrom P450 Enzymen, die an der metabolischen Aktivierung von NNK in der Lunge beteiligt sind, den Haupteffekt von PEITC ausmacht. So beschrieben *Smith et al.* [113] die Hemmung der Aktivität des CYP1A2, das beim Menschen die Bildung von Metaboliten der α -Hydroxylierung von NNK katalysiert. In geringerem Ausmaß wurde dies auch für NNN beobachtet. *Nakajima et al.* [168] bestätigten dies in ihrer Arbeit zur Hemmung bzw. Inaktivierung verschiedener humaner Cytochrom P450 Enzyme durch PEITC, in der sie neben CYP1A2, CYP2A6 und CYP2E1 noch weitere an der metabolischen Aktivierung von Nitrosaminen beteiligte Isoenzyme mit einbezogen haben.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, speziesspezifische Unterschiede in der Metabolisierung des tabakspezifischen Nitrosamins *N*-Nitrosornicotin (NNN) in den Organen Lunge und Leber von Mäusen, Ratten und Mensch zu untersuchen. Da die Untersuchung des Kanzerogens beim Menschen *in vivo* nicht möglich ist, wurde in dieser Arbeit als Methode die Inkubation von Gewebeschnitten angewandt, mit der man den pharmakologischen und toxikologischen Anforderungen gut gerecht werden kann. Gewebeschnitte von Lunge und Leber der Maus, Ratte und des Menschen wurden unter identischen Versuchsbedingungen mit [5-³H]-NNN sechs Stunden inkubiert. Es kamen je 8 Konzentrationen von 0,001 bis 1,2 μ M zum Einsatz. Bei Maus und Ratte wurden pro Konzentration die Schnitte von je 6 Tieren untersucht. Beim Menschen kamen wegen der Schwierigkeit Lebergewebe zu erhalten und wegen des geringen Umsatzes von NNN in der Lunge weniger Schnitte pro Konzentration zum Einsatz. Art und Menge der entstandenen Metaboliten, wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit on-line Radioaktivitätsdetektion ermittelt. Die Zuordnung der Metaboliten erfolgte durch Co-Chromatographie von Referenzsubstanzen, die durch UV-Detektion bei 245 nm bestimmt wurde. Zur Vitalitätsbestimmung der Gewebeschnitte wurde der LDH-Austritt aus der Zelle über den gesamten Versuchszeitraum bestimmt.

Von den vier Hauptreaktionswegen des NNN-Metabolismus, die α - und β -Hydroxylierung an den Positionen 2' und 5' bzw. 3' und 4' des Pyrrolidinrings, die Pyridin-*N*-Oxidation und die Bildung von Nornicotin, wird nach bisherigen Erkenntnissen nur die 2'-Hydroxylierung als Aktivierungsweg betrachtet, der nach Bildung einer instabilen Zwischenstufe, die mit zellulären Makromolekülen wie der DNA reagieren kann, die Basis für die kanzerogene Wirkung von NNN schafft. In den Gewebeschnitten wurden nur Metabolite der α -Hydroxylierung und das Norcotinin nachgewiesen. Die Inkubationsversuche mit den Lungen der Versuchstiere Maus und Ratte ergaben, dass die Verstoffwechslung von NNN bei beiden Spezies hauptsächlich über die α -Hydroxylierung an der 2'-Position stattfindet. Im Gegensatz zu den Nagern ließ die Inkubation von humanen Lungenschnitten nach sechs Stunden keine messbaren Umsätze erkennen. Erst der Einsatz erhöhter Mengen von radioaktivem NNN lieferte erste Anzeichen, dass auch in der Humanlunge die Verstoffwechslung über die 2'-Hydroxylierung abläuft.

In der Leber ergaben sich bei allen untersuchten Spezies recht unterschiedliche Ergebnisse. Während in der Mäuseleber über den gesamten Konzentrationsbereich der größte Anteil über die α -Hydroxylierung vorwiegend an der 2'-Position metabolisiert wurde, fand in Ratten

hauptsächlich eine Entgiftung über Norcotinin statt. Anders als bei den Nagern wurde in den humanen Leberschnitten, die im Vergleich zur Humanlunge eine wesentlich höhere Metabolisierungskapazität aufwiesen, das Nitrosamin NNN hauptsächlich über die α -Hydroxylierung an der 5'-Position metabolisiert, die nach bisherigen Erkenntnissen keine Aktivierung darstellt. Insgesamt erwies sich die Maus, sowohl in der Leber als auch in der Lunge als die Spezies mit der höchsten Kapazität NNN zu metabolisieren.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Möglichkeiten untersucht, den Metabolismus von NNN durch verschiedene Substanzen, die sich in der Vergangenheit schon erfolgreich als Hemmstoffe bzw. Chemopräventoren bezüglich tabakspezifischer Nitrosamine darstellten, zu beeinflussen. Hierzu wurden die Gewebeschnitte zusätzlich zu den verschiedenen NNN-Konzentrationen mit jeweils definierten Konzentrationen des Alkaloids Nicotin, seinem Hauptmetaboliten Cotinin und dem Pflanzeninhaltsstoff Phenethylisothiocyanat (PEITC) inkubiert. Bei humanen Lungenschnitten konnten diese Hemmversuche wegen des geringen NNN-Umsatzes nicht durchgeführt werden.

Die Co-Inkubation von Nicotin und Cotinin bewirkte in beiden untersuchten Organen, sowohl bei der Maus als auch bei der Ratte, einen deutlichen Rückgang der Metabolitenbildung. Ebenso konnten bezüglich des NNN-Metabolismus der humanen Leber erste Hinweise auf eine Hemmung des Stoffwechsels durch diese Substanzen gewonnen werden. Dabei ergab sich nur bei Schnitten von Rattenlungen eine Verschiebung der Metabolitenverhältnisse zugunsten der 5'-Hydroxylierung, während in der Lunge von Mäusen und in der Leber aller Spezies die Hemmung durch Nicotin und Cotinin alle Metabolitenwege gleichermaßen betraf.

Das vieldiskutierte Chemopräventivum PEITC zeigte in Leberschnitten von Mäusen und Ratten nicht über den gesamten Konzentrationsbereich einen Hemmeffekt, während beim Menschen ein deutlicher Rückgang der hepatischen NNN-Metabolisierung zu beobachten war. In Lungenschnitten hemmte PEITC die Metabolisierung von NNN deutlicher bei der Ratte als bei der Maus.

6. Literaturverzeichnis

1. Geddes M Balzi D Tomatis L (1994) Progress in the fight against cancer in EC countries: changes in mortality rates, 1970-90. *Eur J Cancer Prev* 3:31-44
2. Willett WC Colditz GA Mueller NE (1996) Strategien zur Krebsprävention. *Spektrum der Wissenschaft Spezial* 5:34-40
3. Levi F Lucchini F Negri E Boyle P La Vecchia C (2004) Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960. *Int J Cancer* 110:155-169
4. Doll R (1996) Nature and nurture: possibilities for cancer control. *Carcinogenesis* 17:177-184
5. Anon (2002) Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe; Saarbrücken: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland
6. Lee PN (1975) Tobacco consumption in various countries. 4; London: Tobacco Research Council
7. Richter E Scherer G (2004) Aktives und passives Rauchen. in: *Lehrbuch der Toxikologie*; Ch 35 pp 897-918; eds.: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
8. United States Health and Human Service (1982) The health consequences of smoking: Cancer. *USPHS Publication No* :82-50179
9. Mommsen S Aagaard J (1983) Tobacco as a risk factor in bladder cancer. *Carcinogenesis* 4:243-246
10. Vineis P Esteve J Terracini B (1984) Bladder cancer and smoking in males: types of cigarettes, age of start, effect of stopping and interaction with occupation. *Int J Cancer* 34:165-170
11. Anon (1997) Passivrauchen am Arbeitsplatz. in: *Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*; ed.: DFG; Weinheim, Germany: VCH-Wiley
12. Becker N (2001) Epidemiologic aspects of cancer prevention in Germany. *J Cancer Res Clin Oncol* 127:9-19
13. Wynder EL Hoffmann D (1994) Smoking and lung cancer: scientific challenges and opportunities. *Cancer Res* 54:5284-5295
14. Hoffmann D Hoffmann I (1997) The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health* 50:307-364
15. Anon (1986) Tobacco Smoking. in: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*; Vol 38; Lyon: IARC
16. Hoffmann D Hoffmann I El-Bayoumy K (2001) The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol* 14:767-790
17. Lipp G (1965) Definitions of the various smoke streams of a cigarette. *Beitr Tabakforsch Int* 3:220-222
18. Anon (1995) *Römpp Chemie Lexikon*, CD 1.0. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
19. Scherer G Adlkofer F (1999) Tabakrauch in der Raumluft - Erfassung der Schadstoffbelastung durch Passivrauchen zur Bewertung des gesundheitlichen Risikos. *Gefahrstoffe - Reinhalt Luft* 59:435-443
20. Anon (1998) *National Cancer Institute fact book*. US Department of Health: National Cancer Institute
21. Marquardt H (1996) Leserbrief zu DGPT Mitt 17:44-50 "Gesundheitsgefährdung durch Passivrauchen". *DGPT Mitt* 19:64-65
22. Richter E (1996) Leserbrief zu DGPT Mitt 17:44-50 "Gesundheitsgefährdung durch Passivrauchen". *DGPT Mitt* 19:65-66
23. Witschi H Espiritu I Maronpot RR Pinkerton KE Jones AD (1997) The carcinogenic potential of the gas phase of environmental tobacco smoke. *Carcinogenesis* 18:2035-2042

24. Bush LP Fannin FF Chelvarajan RL Burton HR (1993) Biosynthesis and metabolism of nicotine and related alkaloids. in: Nicotine and related alkaloids: absorption, distribution, metabolism and excretion; Ch 1 pp 1-30; eds.: Gorrod JW Wahren J; London: Chapman & Hall
25. Teuscher E (1997) Biogene Arzneimittel. 5. Auflage; Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsges.mmbH
26. Frohne D Pfänder HJ (1983) Giftpflanzen: Ein Handbuch für Apotheker, Ärzte, Toxikologen und Biologen. 2. Auflage; Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
27. Franke W (1992) Naturpflanzenkunde. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
28. Rundlöf T Olsson E Wiernik A Back S Aune M Johansson L Wahlberg I (2000) Potential nitrite scavengers as inhibitors of the formation of *N*-nitrosamines in solution and tobacco matrix systems. *J Agric Food Chem* 48:4381-4388
29. Woodward CF Eisner A Haines PG (1944) Pyrolysis of nicotine to myosmine. *J Am Chem Soc* 66:911-914
30. Sisler EC (1969) Determination of myosmine with o-aminobenzaldehyde. *Anal Biochem* 31:183-188
31. Tso TC Jeffrey RN (1953) Paper chromatography of alkaloids and their transformation products in Maryland tobacco. *Arch Biochem Biophys* 43:269-285
32. Sakuma H Kusama M Yamaguchi K Matsuki T Sugawara S (1984) The distribution of cigarette smoke components between mainstream and sidestream smoke. II. Bases. *Beitr Tabakforsch Int* 12:199-209
33. Jenkins RA Palausky A Counts RW Bayne CK Dindal AB Guerin MR (1996) Exposure to environmental tobacco smoke in sixteen cities in the United States as determined by personal breathing zone air sampling. *J Expos Anal Environ Epidemiol* 6:473-502
34. Kisaki T Tamaki E (1966) Phytochemical studies of the tobacco alkaloids. X. Degradation of the tobacco alkaloids and their optical rotary changes in tobacco plants. *Phytochemistry* 5:293-300
35. Leete E Chedekel MR (1972) Aberrant syntheses in higher plants. II. Aberrant formation of (-)-*N*-methylanabasine from *N*-methyl- Δ^1 -piperideinium chloride in *Nicotiana tabacum* and *N. glauca*. *Phytochemistry* 11:2751-2756
36. Leete E (1984) The methylation of normicotine to nicotine, a minor biosynthetic-pathway in *Nicotiana tabacum*. *Beitr Tabakforsch Int* 12:113-116
37. Luanratana O Griffin WJ (1982) Alkaloids of *Duboisia hopwoodii*. *Phytochemistry* 21:449-451
38. Zwickenflog W Meger M Richter E (1998) Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. *J Agric Food Chem* 46:2703-2706
39. Benowitz NL (1996) Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 18:188-204
40. Tyroller S Zwickenflog W Richter E (2002) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables, and milk. *J Agric Food Chem* 50:4909-4915
41. Maier M (2004) Biomonitoring der Myosminbelastung des Menschen in Muttermilch, Speichel und Plasma. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU
42. Brandänge S Rodriguez B (1983) Ring chain tautomerism of myosmine. *Acta Chem Scand Ser B* 37:643-644
43. Zoltewicz JA Bloom LB Kem WR (1989) Quantitative determination of the ring-chain hydrolysis equilibrium constant for anabaseine and related tobacco alkaloids. *J Org Chem* 54:4462-4468
44. Zwickenflog W (2000) *N*-nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (*N*-nitrosornicotine). *J Agric Food Chem* 48:392-394
45. Wilp J Zwickenflog W Richter E (2002) Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem Toxicol* 40:1223-1228

46. Richter E Schlöbe D Hölzle D Wilp J (2002) Comparative DNA and hemoglobin adduct formation by dietary myosmine and *N*-nitrosomnicotine in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365 (Suppl.1):R140
47. Köhl W Eisenbrand G (2004) *N*-Nitrosoverbindungen. in: *Lehrbuch der Toxikologie*; Ch 30 pp 747-762; eds.: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
48. Tricker AR Preussmann R (1991) Occurrence of and exposure to *N*-nitroso compounds in tobacco. in: *Relevance to Human Cancer of N-Nitroso Compounds, Tobacco Smoke and Mycotoxins*; pp 493-495; eds.: O'Neill IK Chen J Bartsch H; 105; Lyon: International Agency for Research on Cancer
49. Tricker AR Ditrich C Preussmann R (1991) *N*-Nitroso compounds in cigarette tobacco and their occurrence in mainstream tobacco smoke. *Carcinogenesis* 12:257-261
50. Thornton-Manning JR Nikula KJ Hotchkiss JA Avila KJ Rohrbacher KD Ding X Dahl AR (1997) Nasal cytochrome P4502A: identification, regional localization, and metabolic activity toward hexamethylphosphoramide, a known nasal carcinogen. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:22-30
51. Tricker AR (1997) *N*-Nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev* 6:226-268
52. Koehl W Eisenbrand G (1999) *N*-nitroso compounds. in: *Toxicology*; eds.: Marquardt H Schäfer S Mc Clellan R Welsch F; San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokio, Toronto: Academic Press
53. Belitz H-D Grosch W (1992) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag
54. Baltes W (1995) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag
55. Spiegelhalter B Preussmann R (1987) Nitrosamines measurements in ambient air of an industrial area in Austria. *IARC Sci Publ* 84:411-414
56. Hecht SS Morrison JB Wenninger JA (1982) *N*-nitroso-*N*-methyl dodecylamine and *N*-nitroso-*N*-methyl tetradecylamine in hair-care products. *Food Chem Toxicol* 20:165-169
57. Kamp E Eisenbrand G (1991) Long-chain *N*-nitroso-*N*-methylalkylamines in commercial cosmetics, light-duty dishwashing, liquids and household cleaning preparations. *Food Chem Toxicol* 29:203-209
58. Challis BC Trew DF Guthrie WG Roper DV (1995) Reduction of nitrosamines in cosmetic products. *Cosmet Sci* 17:119-131
59. Dawson BA Lawrence RC (1987) Analysis of piperazine drug formulations for *N*-nitrosamines. *J AOAC Int* 80:840-841
60. Dawson BA Lawrence RC (1987) Analysis of selected drug formulations for volatile nitrosamines. *J AOAC Int* 80:554-556
61. Fan TY Morrison J Rounbehler DP Ross R Fine DH Miles W Sen NP (1977) *N*-nitroso-diethanolamine in synthetic cutting fluids; a part-per-hundred impurity. *Science* 197:70-71
62. Stephany RW Freudenthal J Schuller PL (1978) *N*-nitroso-5-methyl-1,3-oxazolidine identified as an impurity in a commercial cutting fluid. *J Royal Neth Chem Soc* 97:177-178
63. Fadlallah S Cooper SF Perrault G Truchon G Lesage J (1996) *N*-nitroso compounds in the ambient air of metal factories using metal-working fluids. *Bull Environ Contam Toxicol* 57:867-874
64. Dietrich M Meger M Meger-Kossien I Scherer G Tricker AR Adlkofer F (1996) Exposure to *N*-nitrosamines in a rubber processing factory. *Eur J Cancer Prev* 5 (Suppl.1):156
65. Wacker CD Spiegelhalter B Preussmann R (1991) New sulfenamide accelerators derived from 'safe' amines for the rubber and tyre industry. *IARC Sci Publ* 105:592-594
66. Zwicklenpflug W Richter E (1987) Rapid method for the detection and quantification of *N*-nitrosodibutylamine in rubber products. *J Chromatogr Sci* 25:506-509

67. Richter E Zwickelpflug W Forth W (1987) N-Nitrosodibutylamin in Kathetern und anderen Gummiwaren. Dtsch Ärzteblatt 84:2954-2956
68. Sen NP Baddoo PA Seaman SW (1987) Volatile nitrosamines in cured meats packaged in elastic rubber nettings. J Agric Food Chem 35:346-350
69. Xu GP Reed PI (1993) N-nitroso compounds in fresh gastric juice and their relation to intra-gastric pH and nitrite employing an improved analytical method. Carcinogenesis 14:2547-2551
70. Iijima K Henry E Moriya A Wirz A Kelman AW McColl KEL (2002) Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. Gastroenterology 122:1248-1257
71. Moriya A Grant J Mowat C Williams C Carswell A Preston T Anderson S Iijima K McColl KEL (2002) In vitro studies indicate that acid catalysed generation of N-nitrosocompounds from dietary nitrate will be maximal at the gastro-oesophageal junction and cardia. Scand J Gastroenterol 37:253-261
72. Spiegelhalder B Eisenbrand G Preussmann R (1976) Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. Food Chem Toxicol 14:545-548
73. Tannenbaum SR Weisman M Fett D (1976) The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. Food Cosmet Toxicol 14:549-552
74. Anon (1981) The health effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. Washington DC: National Academy of Sciences National Press
75. Calmels S Ohshima H Vincent P Gunot A-M Bartsch H (1985) Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by E. coli strains. Carcinogenesis 6:911-915
76. Calmels S Ohshima H Bartsch H (1988) Nitrosamine formation by denitrifying and nondenitrifying bacteria: implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. J Gen Microbiol 134:221-226
77. O'Donnell CM Edwards C Ware J (1988) Nitrosamine formation by clinical isolates of enteric bacteria. FEMS Microbiol Lett 51:193-198
78. Mackerness CW Leach SA Thompson MH Hill MJ (1989) The inhibition of bacterially mediated N-nitrosation by Vitamin C: relevance to the inhibition of endogenous N-nitrosation in the achlorhydric stomach. Carcinogenesis 10:379-399
79. Tricker AR (1996) Excretion of N-nitrosamines in patients with bacterial bladder infections or diversions of urinary tract. Eur J Cancer Prev 5 (Suppl. 1):95-99
80. Mirvish SS (1995) Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. Cancer Lett 93:17-48
81. Vermeer ITM Moonen EJC Dallinga JW Kleinjans JCS van Maanen JMS (1999) Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine in humans. Mutat Res 428:353-361
82. Vermeer ITM (2000) Nitrate exposure and endogenous formation of carcinogenic nitrosamines in humans. Ph D Thesis at the Department of Health Risk and Analytical Toxicology, Maastricht University, Netherlands
83. Andersen RA Burton HR Fleming PD Hamilton-Kemp TR (1989) Effect of storage conditions on nitrosated, acylated, and oxidized pyridine alkaloid derivatives in smokeless tobacco products. Cancer Res 49:5895-5900
84. Djordjevic MV Gay LS Bush LP Chaplin JF (1989) Tobacco-specific nitrosamine accumulation and distribution in flue-cured tobacco alkaloid isolines. J Agric Food Chem 37:752-756
85. Hilfrich J Hecht SS Hoffmann D (1977) A study of tobacco carcinogenesis. XV. Effects of N'-nitrosornnicotine and N'-nitrosoanabasine in Syrian golden hamsters. Cancer Lett 2:169-176

86. Mirvish SS Sams J Hecht SS (1977) Kinetics of nornicotine and anabasine nitrosation in relation to *N'*-nitrosornicotine occurrence in tobacco and to tobacco-induced cancer. *J Natl Cancer Inst* 59:1211-1213
87. Klimisch H-J Stadler L (1976) Untersuchungen zur Bildung von *N*-Nitrosornikotin aus Nikotin-*N'*-oxid. *Talanta* 23:614-616
88. Hoffmann D Brunnemann KD Prokopczyk B Djordjevic MV (1994) Tobacco-specific *N*-nitrosamines and *Areca*-derived *N*-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Environ Health* 41:1-52
89. Caldwell WS Greene JM Dobson GP deBethizy JD (1993) Intra-gastric nitrosation of nicotine is not a significant contributor to nitrosamine exposure. *Ann NY Acad Sci USA* 686:213-228
90. Tso TC (1990) Tobacco-specific *N*-nitrosamines. in: Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant; pp 467-486; ed.: Tso TC; Beltsville MD USA: Ideal Inc.
91. Nestor TB Gentry JS Peele DM Riddick MG Conner BT Edwards ME (2003) Role of oxides of nitrogen in tobacco-specific nitrosamine formation in flue-cured tobacco. *Beitr Tabakforsch Int* 20:467-475
92. Smith CJ Perfetti TA Rumple MA Rodgman A Doolittle DJ (2001) "IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol* 39:183-205
93. Hecht SS Hoffmann D (1989) The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv* 8:273-294
94. Hoffmann D Dong M Hecht SS (1977) Origin in tobacco smoke of *N'*-nitrosornicotine, a tobacco-specific carcinogen: brief communication. *J Natl Cancer Inst* 58:1841-1844
95. Adams JD Lee SJ Vinchkoski N Castonguay A Hoffmann D (1983) On the formation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone during smoking. *Cancer Lett* 17:339-346
96. Fischer S Spiegelhalder B Eisenbarth J Preussmann R (1990) Investigations on the origin of tobacco-specific nitrosamines in mainstream smoke of cigarettes. *Carcinogenesis* 11:723-730
97. Magee PN Barnes JM (1956) The production of malignant hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Brit J Cancer* 10:114
98. Brittebo EB Tjälve H (1981) Formation of tissue-bound *N'*-nitrosornicotine metabolites by the target tissues of Sprague-Dawley and Fisher rats. *Carcinogenesis* 2:959-963
99. Löfberg B Brittebo EB Tjälve H (1982) Localization and binding of *N'*-nitrosornicotine metabolites in the nasal region and in some other tissues of Sprague-Dawley rats. *Cancer Res* 42:2877-2883
100. Waddell WJ Marlowe C (1980) Localization of [¹⁴C]nitrosornicotine in tissues of the mouse. *Cancer Res* 40:3518-3523
101. Brittebo E Tjälve H (1980) Autoradiographic observations on the distribution and metabolism of *N'*-[¹⁴C]nitrosornicotine in mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 98:233-242
102. Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 11:559-603
103. Chen CB Hecht SS Hoffmann D (1978) Metabolic α -hydroxylation of the tobacco-specific carcinogen, *N'*-nitrosornicotine. *Cancer Res* 38:3639-3645
104. Hecht SS Chen C-H Hoffmann D (1980) Metabolic β -hydroxylation and *N*-oxidation of *N'*-nitrosornicotine. *J Med Chem* 23:1175-1178
105. Hecht SS Young R (1982) Regiospecificity in the metabolism of homologous cyclic nitrosamines, *N'*-nitrosornicotine and *N'*-nitrosoanabasine. *Carcinogenesis* 3:1195-1199
106. Hecht SS Lin D Chen CB (1981) Comprehensive analysis of urinary metabolites of *N'*-nitrosornicotine. *Carcinogenesis* 2:833-838
107. Hoffmann D Castonguay A Rivenson A Hecht SS (1981) Comparative carcinogenicity and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N'*-nitrosornicotine in Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 41:2386-2393

108. Domellöf L Andersson M Tjälve H Veals S Trushin N Hecht SS (1987) Distribution and metabolism of *N*'-nitrosornicotine in the miniature pig. *Carcinogenesis* 8:1741-1747
109. Upadhyaya P Zimmerman CL Hecht SS (2002) Metabolism and pharmacokinetics of *N*'-nitrosornicotine in the patas monkey. *Drug Metab Dispos* 30:1115-1122
110. Bouchardy C Benhamou S Jourenkova N Dayer P Hirvonen A (2001) Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung Cancer* 32:109-112
111. Richter E Branner B (2002) Biomonitoring of exposure to aromatic amines: haemoglobin adducts in humans. *J Chromatogr B* 778:49-62
112. Patten CJ Peterson LA Murphy SE (1998) Evidence for metabolic activation of *N*'-nitrosornicotine and *N*-nitrosobenzyl methylamine by a rat nasal coumarin hydroxylase. *Drug Metab Dispos* 26:177-180
113. Smith TJ Guo Z Guengerich FP Yang CS (1996) Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by human cytochrome P450 1A2 and its inhibition by phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 17:809-813
114. Abdel-Rahman SZ Salama SA Au WW Hamada FA (2000) Role of polymorphic *CYP2E1* and *CYP2D6* genes in NNK-induced chromosome aberrations in cultured human lymphocytes. *Pharmacogenetics* 10:239-249
115. Patten CJ Smith TJ Friesen MJ Tynes RE Yang CS Murphy SE (1997) Evidence for cytochrome P450 2A6 and 3A4 as major catalysts for *N*'-nitrosornicotine α -hydroxylation by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 18:1623-1630
116. Yamazaki H Inui Y Yun C-H Guengerich FP Shimada T (1992) Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of *N*-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 13:1789-1794
117. Smith TJ Liao A Wang L-D Yang G-Y Starcic S Philbert MA Yang CS (1998) Characterization of xenobiotic-metabolizing enzymes and nitrosamine metabolism in the human esophagus. *Carcinogenesis* 19:667-672
118. Zhang X Su T Zhang Q-Y Gu J Caggana M Li H Ding X (2002) Genetic polymorphisms of the human *CYP2A13* gene: identification of single-nucleotide polymorphisms and functional characterization of an Arg257Cys variant. *J Pharmacol Exp Ther* 302:416-423
119. Hoffmann D Raineri R Hecht SS Maronpot R Wynder EL (1975) A study of tobacco carcinogenesis. XIV. Effects of *N*'-nitrosornicotine and *N*'-nitrosoanabasine in rats. *J Natl Cancer Inst* 55:977-981
120. Singer GM Taylor HW (1976) Carcinogenicity of *N*'-nitrosornicotine in Sprague-Dawley rats. *J Natl Cancer Inst* 57:1275-1276
121. Hecht SS Chen CB Ohmori T Hoffmann D (1980) Comparative carcinogenicity in F344 rats of the tobacco-specific nitrosamines, *N*'-nitrosornicotine and 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 40:298-302
122. Hecht SS Young R Rivenson A Hoffmann D (1982) On the metabolic activation of *N*-nitrosomorpholine and *N*'-nitrosornicotine: effects of deuterium substitution. in: *N*-Nitroso Compounds: Analysis, Formation and Occurrence; pp 499-507; eds.: Bartsch H O'Neill IK Castegnaro M Okada M; 41; Lyon, France: International Agency of Research on Cancer
123. Hoffmann D Rivenson A Amin S Hecht SS (1984) Dose-response study of the carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines in F344 rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 108:81-86
124. Castonguay A Rivenson A Trushin N Reinhardt J Spathopoulos S Weiss CH Reiss B Hecht SS (1984) Effects of chronic ethanol consumption on the metabolism and carcinogenicity of *N*'-nitrosornicotine in F344 rats. *Cancer Res* 44:2285-2290
125. Gričiute L Castegnaro M Béréziat JC Cabral JRP (1986) Influence of ethylalcohol on the carcinogenic activity of *N*-nitrosornicotine. *Cancer Lett* 31:267-275
126. Nachiappan V Mufti SI Chakravarti A Eskelson CD Rajasekharan R (1994) Lipid peroxidation and ethanol-related tumor promotion in Fischer-344 rats treated with tobacco-specific nitrosamines. *Alcohol Alcohol* 29:565-574

127. Boyland E Roe FJC Gorrod JW (1964) Induction of pulmonary tumours in mice by nitroso-nornicotine, a possible constituent of tobacco smoke. *Nature* 202:1126
128. Hoffmann D Hecht SS Orna RM Wynder E (1976) Chemical studies on tobacco smoke XLII. Nitrosornicotine: presence in tobacco, formation and carcinogenicity. in: *Environmental N-Nitroso Compounds: Analysis and Formation*; pp 307-320; eds.: Walker EA Bogovski P Gričiute L; 14; Lyon, France: International Agency of Research on Cancer
129. Hecht SS Chen CB Hirota N Orna RM Tso TC Hoffmann D (1978) Tobacco-specific nitrosamines: formation from nicotine in vitro and during tobacco curing and carcinogenicity in strain A mice. *J Natl Cancer Inst* 60:819-824
130. Castonguay A Lin D Stoner GD Radok P Furuya K Hecht SS Schut HAJ Klaunig JE (1983) Comparative carcinogenicity in A/J mice and metabolism by cultured mouse peripheral lung of *N*'-nitrosornicotine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, and their analogues. *Cancer Res* 43:1223-1229
131. Deutsch-Wenzel RP Brune H Grimmer G Misfeld J (1985) Local application to mouse skin as a carcinogen specific test system for non-volatile nitroso compounds. *Cancer Lett* 29:85-92
132. LaVoie EJ Prokopczyk G Rigotty J Czech A Rivenson A Adams JD (1987) Tumorigenic activity of the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), 4-methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol (iso-NNAL) and *N*'-nitrosornicotine (NNN) on topical application to SENCAR mice. *Cancer Lett* 37:277-283
133. Hecht SS Abbaspour A Hoffmann D (1988) A study of tobacco carcinogenesis XLII. Bioassay in A/J mice of some structural analogues of tobacco-specific nitrosamines. *Cancer Lett* 42:141-145
134. Padma PR Lalitha VS Amonkar AJ Bhide SV (1989) Carcinogenicity studies on the two tobacco-specific *N*-nitrosamines, *N*'-nitrosornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* 10:1997-2002
135. Hoffmann D Djordjevic MV Rivenson A Zang E Desai D Amin S (1993) A study of tobacco carcinogenesis .LI. Relative potencies of tobacco-specific *N*-nitrosamines as inducers of lung tumours in A/J mice. *Cancer Lett* 71:25-30
136. McCoy GD Hecht SS Katayama S Wynder EL (1981) Differential effect of chronic ethanol consumption on the carcinogenicity of *N*-nitrosopyrrolidine and *N*'-nitrosornicotine in male Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 41:2849-2854
137. Hecht SS Young R Maeura Y (1983) Comparative carcinogenicity in F344 rats and Syrian golden hamsters of *N*'-nitrosornicotine and *N*'-nitrosornicotine-1-*N*-oxide. *Cancer Lett* 20:333-340
138. Chen Y-P Johnson GK Squier CA (1994) Effects of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on hamster cheek pouch and gastric mucosa. *J Oral Pathol Med* 23:251-255
139. Altuwaigi OS Papageorge MB Doku HC (1995) The cancer-promoting effect of *N*-nitrosornicotine used in combination with a subcarcinogenic dose of 4-nitroquinoline-*N*-oxide and 7,12-dimethylbenz(A)anthracene. *J Oral Maxillofac Surg* 53:910-913
140. Papageorge MB Cataldo E Jahngen EGE (1996) The effect of *N*.nitrosornicotine on the buccal mucosa of Syrian hamsters. *J Oral Maxillofac Surg* 54:187-190
141. Koppang N Rivenson A Reith A Dahle HK Evensen O Hoffmann D (1992) A study of tobacco carcinogenesis XLVIII. carcinogenicity of *N*'-nitrosornicotine in mink (*Mustela vison*). *Carcinogenesis* 13:1957-1960
142. Koppang N Rivenson A Dahle HK Hoffmann D (1997) A study of tobacco carcinogenesis, LIII: carcinogenicity of *N*'-nitrosornicotine (NNN) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in mink (*Mustala vison*). *Cancer Lett* 111:167-171
143. Prokopczyk B Rivenson A Hoffmann D (1991) A study of betel quid carcinogenesis IX. Comparative carcinogenicity of 3-(methylnitrosamino)propionitrile and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone upon local application to mouse skin and rat oral mucosa. *Cancer Lett* 60:153-157

144. Richter E Rösler S Becker A (2000) Effect of diet on haemoglobin adducts from 4-aminobiphenyl in rats. *Arch Toxicol* 74:203-206
145. Morse MR Stoner GD (1993) Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* 14:1737-1746
146. Wattenberg LW (1983) Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res* 43:2448S-2453S
147. Jongen WMF (1996) Glucosinolates in brassica: occurrence and significance as cancer-modulating agents. *Proc Nutr Soc* 55:433-446
148. Hecht SS (2000) Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab Rev* 32:395-411
149. Morse MA Wang C-X Stoner GD Mandal S Conran PB Amin SG Hecht SS Chung F-L (1989) Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA adduct formation and tumorigenicity in the lung of F344 rats by dietary phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res* 49:549-553
150. Morse MA Wang C-X Amin SG Hecht SS Chung F-L (1988) Effects of dietary sinigrin or indole-3-carbinol on *O*⁶-methylguanine-DNA-transmethylase activity and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA methylation and tumorigenicity in F344 rats. *Carcinogenesis* 9:1891-1895
151. Witschi H Espiritu I Yu M Willits NH (1998) The effects of phenethyl isothiocyanate, *N*-acetylcysteine and green tea on tobacco smoke-induced lung tumors in strain A/J mice. *Carcinogenesis* 19:1789-1794
152. Witschi H Uyeminami D Moran D Espiritu I (2000) Chemoprevention of tobacco-smoke lung carcinogenesis in mice after cessation of smoke exposure. *Carcinogenesis* 21:977-982
153. Hirose M Yamaguchi T Kimoto N Ogawa K Futakuchi M Sano M Shirai T (1998) Strong promoting activity of phenylethyl isothiocyanate and benzyl isothiocyanate on urinary bladder carcinogenesis in F344 male rats. *Int J Cancer* 77:773-777
154. Smith TJ Guo Z Li C Ning SM Thomas PE Yang CS (1993) Mechanisms of inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation in mouse by dietary phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res* 53:3276-3282
155. Jiao D Eklind KI Choi C-I Desai DH Amin SG Chung F-L (1994) Structure-activity relationships of isothiocyanates as mechanism-based inhibitors of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Res* 54:4327-4333
156. Jiao D Smith TJ Kim SB Yang CS Desai D Amin S Chung F-L (1996) The essential role of the functional group in alkyl isothiocyanates for inhibition of tobacco nitrosamine-induced lung tumorigenesis. *Carcinogenesis* 17:755-759
157. Guo Z Smith TJ Wang E Sadrieh N Ma Q Thomas PE Yang CS (1992) Effects of phenethyl isothiocyanate, a carcinogenesis inhibitor, on xenobiotic-metabolizing enzymes and nitrosamine metabolism in rats. *Carcinogenesis* 13:2205-2210
158. Smith TJ Guo Z Thomas PE Chung F-L Morse MA Elkind K Yang CS (1990) Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes and its inhibition by isothiocyanates. *Cancer Res* 50:6817-6822
159. Guo Z Smith TJ Wang E Eklind KI Chung F-L Yang CS (1993) Structure-activity relationships of arylalkyl isothiocyanates for the inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone metabolism and the modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes in rats and mice. *Carcinogenesis* 14:1167-1173
160. Chung F-L Wang M Hecht SS (1985) Effects of dietary indoles and isothiocyanates on *N*-nitrosodimethylamine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone α -hydroxylation and DNA methylation in rat liver. *Carcinogenesis* 6:539-543
161. Morse MA Amin SG Hecht SS Chung F-L (1989) Effects of aromatic isothiocyanates on tumorigenicity, *O*⁶-methylguanine formation, and metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Cancer Res* 49:2894-2897

162. Morse MA Eklind KI Hecht SS Jordan KG Choi CI Desai DH Amin SG Chung F-L (1991) Structure-activity relationships for inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone lung tumorigenesis by arylalkyl isothiocyanates in A/J mice. *Cancer Res* 51:1846-1850
163. Staretz ME Foiles PG Miglietta LM Hecht SS (1997) Evidence for an important role of DNA pyridyloxobutylation in rat lung carcinogenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone: effects of dose and phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res* 57:259-266
164. Sticha KR Kenney PMJ Boysen G Liang H Su X Wang M Upadhyaya P Hecht SS (2002) Effects of benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate on DNA adduct formation by a mixture of benzo[*a*]pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Carcinogenesis* 23:1433-1439
165. Boysen G Kenney PMJ Upadhyaya P Wang M Hecht SS (2003) Effects of benzyl isothiocyanate and 2-phenethyl isothiocyanate on benzo[*a*]pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone metabolism in F-344 rats. *Carcinogenesis* 24:517-525
166. Hecht SS Trushin N Rigotty J Carmella SG Borukhova A Akerkar S Rivenson A (1996) Complete inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced rat lung tumorigenesis and favorable modification of biomarkers by phenethyl isothiocyanate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:645-652
167. Hecht SS Trushin N Rigotty J Carmella SG Borukhova A Akerkar S Desai D Amin S Rivenson A (1996) Inhibitory effects of 6-phenylhexyl isothiocyanate on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone metabolic activation and lung tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* 17:2061-2067
168. Nakajima M Yoshida R Shimada N Yamazaki H Yokoi T (2001) Inhibition and inactivation of human cytochrome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate. *Drug Metab Dispos* 29:1110-1113
169. Chung F-L Juchatz A Vitarius J Hecht SS (1984) Effects of dietary compounds on α -hydroxylation of *N*-nitrosopyrrolidine and *N*-nitrosornicotine in rat target tissues. *Cancer Res* 44:2924-2928
170. Murphy SE Heiblum R King PG Bowman D Davis WJ Stoner GD (1991) Effect of phenethyl isothiocyanate on the metabolism of tobacco-specific nitrosamines by cultured rat oral tissue. *Carcinogenesis* 12:957-961
171. Stoner GD Adams C Kresty LA Amin SG Desai D Hecht SS Murphy SE Morse MA (1998) Inhibition of *N*-nitrosornicotine-induced esophageal tumorigenesis by 3-phenylpropyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 19:2139-2143
172. Kutzer C Richter E Oehlmann C Atawodi SE (1995) Effect of nicotine and cotinine on NNK metabolism in rats. in: *Effects of Nicotine on Biological Systems II*; pp 385-390; eds.: Clarke PBS Quik M Adlkofer F Thureau K; Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag
173. Lee CK Fulp C Bombick BR Doolittle DJ (1996) Inhibition of mutagenicity of *N*-nitrosamines by tobacco smoke and its constituents. *Mutat Res* 367:83-92
174. Richter E Tricker AR (1994) Nicotine inhibits the metabolic activation of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in rats. *Carcinogenesis* 15:1061-1064
175. Brown BG Chang C-J Ayres PH Lee CK Doolittle DJ (1999) The effect of cotinine or cigarette smoke co-administration on the formation of O⁶-methylguanine adducts in the lung and liver of A/J mice treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Toxicol Sci* 47:33-39
176. Tricker AR Brown B Doolittle D Richter E (2001) Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in A/J mouse lung and liver and effect of cigarette smoke exposure on in vivo metabolism to biologically reactive intermediates. in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*; pp 451-454; eds.: Dansette PM Snyder R Delaforge M Gibson GG Greim H Jollow DJ Monks TJ Sipes IG; New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers

177. Richter E Tricker AR (2002) Effect of nicotine, cotinine and phenethyl isothiocyanate on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolism in the Syrian golden hamster. *Toxicology* 179:95-103
178. Castonguay A Rossignol G (1992) Modulation of the activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by hamster liver microsomes to protein alkylating species. *Toxicol in Vitro* 6:397-404
179. Hong J-Y Wang ZY Smith TJ Zhou S Shi S Pan JM Yang CS (1992) Inhibitory effects of diallyl sulfide on the metabolism and tumorigenicity of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in A/J mouse lung. *Carcinogenesis* 13:901-904
180. Schulze J Schrader E Foth H Kahl GF Richter E (1998) Effect of nicotine or cotinine on metabolism of 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in isolated rat lung and liver. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357:344-350
181. Murphy SE Heiblum R (1990) Effect of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on the metabolism of *N*ⁿ-nitrosonornicotine and 4-methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by rat oral tissue. *Carcinogenesis* 11:1663-1666
182. Richter E Marchand D Tricker AR (2000) Inhibition of *N*ⁿ-nitrosonornicotine (NNN) metabolism by nicotine and cotinine in hamster liver and lung. *Drug Metab Rev* 32 (Suppl. 1):96
183. Brandon EFA Raap CD Meijerman I Beijnen JH Schellens JHM (2003) An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* 189:233-246
184. Foth H (1995) Role of the lung in accumulation and metabolism of xenobiotic compounds - implications for chemically induced toxicity. *Crit Rev Toxicol* 25:165-205
185. Ekins S (1996) Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for *in vitro* xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* 28:591-623
186. Houston JB Carlile DJ (1997) Prediction of hepatic clearance from microsomes, hepatocytes, and liver slices. *Drug Metab Rev* 29:891-922
187. Worboys PD Bradbury A Houston JB (1997) Kinetics of drug metabolism in rat liver slices. III. Relationship between metabolic clearance and slice uptake rate. *Drug Metab Dispos* 25:460-467
188. Engl J (1999) Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins NNK in Gewebeschnitten von Mäusen, Ratten und Menschen. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
189. Branner B Kutzer C Zwickenpflug W Scherer G Heller W-D Richter E (1998) Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and non-smoking women. *Biomarkers* 3:35-47
190. Lowry OH Rosebrough NJ Farr AL Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
191. Hecht SS Trushin N (1988) DNA and hemoglobin alkylation by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and its major metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in F344 rats. *Carcinogenesis* 9:1665-1668
192. Hecht SS Carmella SG Trushin N Spratt TE Foiles PG Hoffmann D (1988) Approaches to the development of assays for interaction of tobacco-specific nitrosamines with haemoglobin and DNA. *IARC Sci Publ* 89:121-128
193. Scherer G Richter E (1997) Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): a critical reappraisal. *Hum Exp Toxicol* 16:449-459
194. Price RJ Ball SE Renwick AB Barton PT Beamand JA Lake BG (1998) Use of precision-cut rat liver slices for studies of xenobiotic metabolism and toxicity: comparison of the Krumdieck and Brendel tissue slicers. *Xenobiotica* 28:361-371
195. Stefaniak MS Gandolfi AJ Brendel K (1988) Adult rat lung in dynamic organ culture: a new tool in pharmacology. *Proc West Pharmacol Soc* 31:149-51.:149-151

196. Fisher RL Hasal SJ Sanuik JT Gandolfi AJ Brendel K (1995) Determination of optimal incubation media and suitable slice diameters in precision-cut liver slices: optimization of tissue slice culture, part 2. *Toxicology Methods* 5:115-130
197. Olinga P Groen K Hof IH De Kanter R Koster HJ Leeman WR Rutten AAJL van Twillert K Groothuis GMM (1997) Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *J Pharmacol Toxicol Meth* 38:59-69
198. Thohan S Zurich MC Chung H Weiner M Kane AS Rosen GM (2001) Tissue slices revisited: evaluation and development of a short-term incubation for integrated drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 29:1337-1342
199. Worboys PD Bradbury A Houston JB (1996) Kinetics of drug metabolism in rat liver slices. II. Comparison of clearance by liver slices and freshly isolated hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 24:676-681
200. Dogterom P (1993) Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metab Dispos* 21:699-704
201. Parrish AR Gandolfi AJ Brendel K (1995) Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci* 57:1887-1901
202. De Kanter R Monshouwer M Draaisma AL de Jager MH De Graaf IAM Proost JH Meijer DKF Groothuis GMM (2004) Prediction of whole-body metabolic clearance of drugs through the combined use of slices from rat liver, lung, kidney, small intestine and colon. *Xenobiotica* 34:229-241
203. Carmella SG Hecht SS (1987) Formation of hemoglobin adducts upon treatment of F344 rats with the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and N'-nitrosornicotine. *Cancer Res* 47:2626-2630
204. Hecht SS Carmella SG Chen M Koch JFD Miller AT Murphy SE Jensen JA Zimmerman CL Hatsukami DK (1999) Quantitation of urinary metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen after smoking cessation. *Cancer Res* 59:590-596
205. Peterson LA Hecht SS (1991) O⁶-Methylguanine is a critical determinant of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone tumorigenesis in A/J mouse lung. *Cancer Res* 51:5557-5564
206. Chen CB Fung PT Hecht SS (1979) Assay for microsomal α -hydroxylation of N'-nitrosornicotine and determination of the deuterium isotope effect for α -hydroxylation. *Cancer Res* 39:5057-5062
207. Murphy SE Spina DA (1994) Evidence for a high-affinity enzyme in rat esophageal microsomes which α -hydroxylates N'-nitrosornicotine. *Carcinogenesis* 15:2709-2713
208. Marchand D Richter E Tricker AR (2000) Inhibition of N'-nitrosornicotine (NNN) metabolism by nicotine and cotinine in hamster liver and lung. *Drug Metab Rev* 32 (Suppl. 1):95
209. Engl J Richter E Tricker AR (1998) Species and tissue-specific metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in lung and liver slices from rodents and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357 (Suppl):R538
210. Castonguay A Stoner GD Schut HAJ Hecht SS (1983) Metabolism of tobacco-specific N-nitrosamines by cultured human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6694-6697
211. Staretz ME Murphy SE Patten CJ Nunes MG Koehl W Amin S Koenig LA Guengerich FP Hecht SS (1997) Comparative metabolism of the tobacco related carcinogens benzo[a]pyrene, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol and N'-nitrosornicotine in human hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* 25:154-162
212. Hecht SS Trushin N Reid-Quinn CA Burak ES Jones AB Southers JL Gombar CT Carmella SG Anderson LM Rice JM (1993) Metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the patas monkey: pharmacokinetics and characterization of glucuronide metabolites. *Carcinogenesis* 14:229-236
213. Hecht SS Hatsukami DK Bonilla LE Hochalter JB (1999) Quantitation of 4-oxo-4-(3-pyridyl)-butanoic acid and enantiomers of 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butanoic acid in human urine: a substantial pathway of nicotine metabolism. *Chem Res Toxicol* 12:172-179

214. Friesenegger S (1999) Metabolismus von 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon, NNK, in Gewebeschnitten von Syrischen Goldhamstern. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
215. Pakhale SS Maru GB (1998) Distribution of major and minor alkaloids in tobacco, mainstream and sidestream smoke of popular Indian smoking products. *Food Chem Toxicol* 36:1131-1138
216. Nakajima M Yamamoto T Nunoya K-I Yokoi T Nagashima K Inoue K Funae Y Shimada N Kamataki T Kuroiwa Y (1996) Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1010-1015
217. Nakajima M Yamamoto T Nunoya K Yokoi T Nagashima K Inoue K Funae Y Shimada N Kamataki T Kuroiwa Y (1996) Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos* 24:1212-1217
218. Van Vleet TR Bombick DW Coulombe RA, Jr. (2001) Inhibition of human cytochrome P450 2E1 by nicotine, cotinine, and aqueous cigarette tar extract in vitro. *Toxicol Sci* 64:185-191
219. Bellec G Dréano Y Lozach P Ménez JF Berthou F (1996) Cytochrome P450 metabolic dealkylation of nine N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 17:2029-2034
220. Mace K Bowman ED Vautravers P Shields PG Harris CC Pfeifer AM (1998) Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. *Eur J Cancer* 34:914-920
221. Su T Bao Z Zhang Q-Y Smith TJ Hong J-Y Ding X (2000) Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 60:5074-5079
222. Seitz HK Stickel F Homann N (2004) Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics. *Int J Cancer* 108:483-487
223. McCoy G Katayama S Young R Wyatt M Hecht SS (1982) Influence of chronic ethanol consumption on the metabolism and carcinogenicity tobacco-related nitrosamines. in: *N-Nitroso Compounds: Analysis, Formation and Occurrence*; pp 635-642; eds.: Bartsch H O'Neill IK Castegnaro M Okada M; 41; Lyon, France: International Agency of Research on Cancer
224. Richter E Hölzle D Schlöbe D Ostermeier-Hatz D von Meyer L Tricker AR (2003) The presence of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone (HPB)-releasing DNA adducts in esophagus and cardia. *Drug Metab Rev* 35 (Suppl 1):111
225. Finch GL Nikula KJ Belinsky SA Barr EB Stoner GD Lechner JF (1996) Failure of cigarette smoke to induce or promote lung cancer in the A/J mouse. *Cancer Lett* 99:161-167
226. Brown BG Richter E Tricker AR Ayres PH Doolittle DJ (2001) The effect of a 2-h exposure to cigarette smoke on the metabolic activation of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mice. *Chem Biol Interact* 138:125-135
227. Prokopczyk G Adams JD LaVoie EJ Hoffmann D (1987) Effect of snuff and nicotine on DNA methylation by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* 8:1395-1397
228. Charest M Rossignol G Castonguay A (1989) In vitro and in vivo modulation of the bioactivation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in hamster lung tissues. *Chem Biol Interact* 71:265-278
229. Schuller HM Castonguay A Orloff M Rossignol G (1991) Modulation of the uptake and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by nicotine in hamster lung. *Cancer Res* 51:2009-2014
230. Hong J-Y Ding X Smith TJ Coon MJ Yang CS (1992) Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific carcinogen, by rabbit nasal microsomes and cytochrome P450s NMa and NMb. *Carcinogenesis* 13:2141-2144
231. Levi F La Vecchia C Gulie C Negri E (1993) Dietary factors and breast cancer risk in Vaud, Switzerland. *Nutr Cancer* 19:327-335

232. Albanes D Heinonen OP Taylor PR Virtamo J Edwards BK Rautalahti M Hartman AM Palmgren J Freedman LS Haapakoski J Barrett MJ Pietinen P Malila N Tala E Liippo K Salomaa E-R Tangrea JA Teppo L Askin FB Taskinen E Erozan Y Greenwald P Huttunen JK (1996) α -Tocopherol and β -carotene supplements and lung cancer incidence in the Alpha-tocopherol, Beta-carotene Cancer Prevention Study: effects of base line characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst* 88:1560-1570
233. Omenn GS Goodman GE Thornquist MD Balmes J Cullen MR Glass A Keogh JP Meyskens FL Valanis B Williams JH Barnhart S Cherniack MG Brodtkin CA Hammar S (1996) Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *J Natl Cancer Inst* 88:1550-1559
234. Franceschi S Bidoli E Negri E Zamboni P Talamini R Ruol A Parpinel M Levi F Simonato L La Vecchia C (2000) Role of macronutrients, vitamins and minerals in the aetiology of squamous-cell carcinoma of the oesophagus. *Int J Cancer* 86:626-631
235. Negri E Franceschi S Bosetti C Levi F Conti E Parpinel M La Vecchia C (2000) Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 86:122-127
236. Chung F-L (1999) The prevention of lung cancer induced by a tobacco-specific carcinogen in rodents by green and black tea. *Proc Soc Exp Biol Med* 220:244-248
237. Richter E Marchand D Tricker AR (2000) Chemoprevention of N'-nitrosornicotine (NNN) metabolism by PEITC in hamster liver and lung. *Drug Metab Rev* 32 (Suppl. 1):96
238. Staretz ME Koenig LA Hecht SS (1997) Effects of long term dietary phenethyl isothiocyanate on the microsomal metabolism of 4-(methylnitrosamino)-(3-pyridyl)-1-butanone and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in F344 rats. *Carcinogenesis* 18:1715-1722
239. Hamilton SM Teel RW (1994) Effects of isothiocyanates on the metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and benzo[*a*]pyrene by hamster and rat liver microsomes. *Anticancer Res* 14:1089-1094
240. Morse MA Eklind KI Amin SG Hecht SS Chung F-L (1989) Effects of alkyl chain length on the inhibition of NNK-induced lung neoplasia in A/J mice by arylalkyl isothiocyanates. *Carcinogenesis* 10:1757-1759
241. Staretz ME Hecht SS (1995) Effects of phenethyl isothiocyanate on the tissue distribution of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and metabolites in F344 rats. *Cancer Res* 55:5580-5588

7. Tabellenanhang

Tabelle A-1: Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von weiblichen A/J Mäusen (fmol/min/mg Protein)
Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	0,03	0,02	6 (2)*	0,02	0,01	6 (2)	zu wenig Umsatz			0,03	0,02	6 (2)	zu wenig Umsatz		
0,004	0,33	0,05	6	0,28	0,04	6	zu wenig Umsatz			0,18	0,03	6	0,06	0,03	6 (3)
0,016	0,97	0,10	6	0,77	0,14	6	0,11	0,69	6 (4)	0,69	0,30	6	0,30	0,06	6
0,05	2,30	0,41	6	1,71	0,21	6	0,10	1,84	6 (1)	1,84	1,21	6	1,21	0,19	6
0,2	8,90	2,44	6	6,67	1,92	6	0,60	8,10	6 (1)	8,10	4,64	6	4,64	1,09	6
0,5	19,1	4,56	6	16,5	5,05	6	2,14	21,7	6 (3)	21,7	6,15	6	6,15	2,26	6 (4)
0,8	35,0	5,46	6	27,0	4,86	6	4,20	33,7	6 (3)	33,7	10,2	6	10,2	3,80	6 (4)
1,2	40,9	6,11	6	37,5	8,18	6	3,47	43,5	6 (2)	43,5	16,5	6 (5)	16,5	5,51	6 (4)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern

Tabelle A-2: Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von weiblichen A/J Mäusen (fmol/min/mg Protein)
Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	0,15	0,15	6(1)*	0,44	0,44	6(1)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	3,52	0,81	6	5,24	1,21	6	zu wenig Umsatz			2,85	1,11	6(5)	2,35	0,72	6(5)
0,016	10,3	3,78	6	13,5	5,77	6	zu wenig Umsatz			5,69	3,13	6(5)	11,0	4,14	6
0,05	18,6	4,01	6	26,0	8,84	6	zu wenig Umsatz			10,9	3,89	6	20,2	3,44	6
0,2	89,1	28,4	6	144	46,9	6	10,8	5,87	6(3)	63,8	24,3	6	83,2	23,3	6
0,5	174	55,5	6	219	72,8	6	7,72	7,72	6(1)	101	29,7	6	208	80,8	6(5)
0,8	299	70,7	6	364	85,8	6	24,3	16,0	6(2)	201	107	6(5)	281	88,7	6(5)
1,2	317	84,5	6	414	109	6	31,1	19,8	6(2)	243	96,4	6	482	147	6(5)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern

Tabelle A-3: Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von männlichen F344-Ratten (fmol/min/mg Protein) Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN μM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,01	0,01	6(2)*	0,04	0,003	6(2)	zu wenig Umsatz			0,01	0,01	6(3)	zu wenig Umsatz		
0,016	0,04	0,01	6(5)	0,04	0,01	6(5)	zu wenig Umsatz			0,09	0,03	6	0,02	0,01	6(2)
0,05	0,22	0,03	6	0,29	0,04	6	0,04	0,03	6(2)	0,21	0,03	6	0,21	0,06	6(5)
0,2	0,54	0,09	6	0,73	0,10	6	0,42	0,23	6(3)	1,51	0,33	6	0,62	0,18	6(5)
0,5	1,64	0,26	6	1,91	0,35	6	1,53	0,45	6(5)	3,67	0,55	6	1,63	0,25	6
0,8	2,08	0,69	6(5)	2,78	0,33	6	1,19	0,40	6(4)	4,84	0,62	6	2,24	0,67	6(5)
1,2	3,27	0,72	6	3,97	0,47	6	2,12	0,78	6(4)	7,24	1,47	6	1,68	0,77	6(3)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern

Tabelle A-4: Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von männlichen F344-Ratten (fmol/min/mg Protein)
Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN μM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	0,04	0,04	6(1)*	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,95	0,54	6(4)	0,53	0,31	6(3)	zu wenig Umsatz			0,22	0,16	6(2)	0,33	0,22	6(2)
0,016	1,58	0,60	6(5)	1,17	0,47	6	zu wenig Umsatz			0,66	0,35	6(3)	0,83	0,52	6(3)
0,05	5,80	1,35	6	5,07	0,71	6	0,19	0,19	6(1)	2,64	0,61	6(5)	3,36	0,82	6(5)
0,2	51,1	19,8	6	38,3	15,9	6	3,31	2,12	6(2)	20,9	10,6	6(4)	33,5	13,4	6
0,5	38,2	10,3	6	27,1	5,93	6	1,25	1,25	6(1)	13,5	4,86	6(5)	16,0	8,18	6(4)
0,8	45,4	12,6	6(5)	34,1	2,48	6	zu wenig Umsatz			10,9	7,03	6(2)	20,7	6,88	6(4)
1,2	48,8	12,8	6(5)	49,3	13,6	6	3,81	3,81	6(1)	10,4	6,60	6(2)	zu wenig Umsatz		

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern

Tabelle A-5: Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von humanem Gewebe (fmol/min/mg Protein) Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN μM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	0,04	0,004	3	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,19	0,02	6	0,01	0,005	6(3)*	zu wenig Umsatz			0,07	0,01	6	zu wenig Umsatz		
0,016	1,09	0,25	6	0,15	0,03	6	0,06	0,01	6	0,30	0,04	6	0,06	0,02	6
0,05	2,01	0,16	6	0,22	0,01	6	0,11	0,01	6	0,62	0,04	6	0,06	0,02	6(4)
0,2	5,47	0,73	6	0,68	0,05	6	0,37	0,04	6	1,90	0,15	6	0,15	0,07	6(3)
0,5	15,9	1,48	3	1,65	0,10	3	1,52	0,29	3	5,33	0,56	3	zu wenig Umsatz		
0,8	20,9	2,91	3	2,42	0,23	3	1,18	0,73	3(2)	8,76	0,74	3	0,44	0,44	3(1)
1,2	28,2	4,62	3	4,42	0,36	3	2,90	0,47	3	12,8	0,61	3	1,78	1,03	3(2)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern

Tabelle A-6: Umsatz von 0,1 µM NNN nach 6 und 24 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von humanem Gewebe (fmol/min/mg Protein) Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

Lunge	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
6h	zu wenig Umsatz			0,23	0,03	5	zu wenig Umsatz			0,34	0,21	5	1,95	0,23	5
24h	0,03	0,01	5	0,08	0,01	5	0,03	0,01	5	0,14	0,10	5	0,59	0,09	5

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern

Tabelle A-7: Effekt von 5 μ M Nikotin auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von weiblichen A/J Mäusen (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN μ M	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,25 (75%)	0,04	6	0,16 (57%)	0,06	6(5)	0,03 (25%)	0,02	6(2)	0,17 (93%)	0,04	6(5)	0,14 (47%)	0,06	6(4)
0,016	0,41 (42%)	0,16	6	0,36 (46%)	0,11	6	0,24 (245%)	0,09	6(4)	0,46 (67%)	0,04	6	0,88 (72%)	0,24	6(5)
0,05	2,78 (121%)	0,74	6	2,06 (120%)	0,57	6	0,72 (120%)	0,40	6(3)	2,00 (109%)	0,25	6	2,44 (52%)	1,18	6(3)
0,2	7,22 (81%)	2,42	6(5)*	6,78 (102%)	2,46	6(5)	0,84 (40%)	0,84	6(1)	6,12 (76%)	1,35	6	6,39 (104%)	3,06	6(4)
0,5	23,6 (124%)	4,70	6	18,3 (111%)	3,00	6	0,72 (17%)	0,72	6(1)	20,0 (92%)	2,93	6	6,37 (63%)	2,64	6(4)
0,8	23,4 (67%)	4,61	6	22,0 (81%)	5,31	6	3,56 (103%)	1,53	5(3)	28,2 (84%)	7,41	6(5)	6,94 (42%)	3,21	5(3)
1,2	16,4 (40%)	5,86	5(4)	20,1 (53%)	3,56	5									

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-8: Effekt von 5 μ M Nikotin auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von weiblichen A/J Mäusen (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,10 (3%)	0,10	6(1)*	0,33 (6%)	0,21	6(2)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,016	4,29 (42%)	1,52	6(4)	4,83 (36%)	1,71	6(4)	0,31 (%)	0,31	6(1)	1,16 (20%)	0,38	6(4)	4,15 (38%)	1,63	6(4)
0,05	5,18 (28%)	1,71	6(5)	4,16 (16%)	2,00	6(4)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,2	54,9 (62%)	18,9	6(5)	56,1 (39%)	20,5	6(5)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,5	85,4 (49%)	29,9	6(5)	92,8 (42%)	25,7	6(5)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,8	115 (38%)	44,6	6(5)	141 (39%)	57,4	6(5)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
1,2	310 (98%)	143	6	308 (74%)	158	6	13,9 (45%)	13,9	6(1)	221 (91%)	96,7	6	399 (83%)	166	6

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-9: Effekt von 5 µM Nikotin auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von männlichen F344-Ratten (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,016	0,06 (140%)	0,01	6(5)*	0,11 (120%)	0,03	6	0,03 (%)	0,01		0,04 (30%)	0,004	6(1)	0,03 (155%)	0,01	6(5)
0,05	0,19 (86%)	0,04	6	0,25 (123%)	0,07	6	0,09 (221%)	0,03	6(5)	0,11 (120%)	0,03	6	0,12 (56%)	0,03	6(5)
0,2	0,71 (130%)	0,19	6(5)	1,18 (78%)	0,35	6	0,30 (70%)	0,10	6(4)	0,25 (123%)	0,07	6	0,52 (84%)	0,07	6
0,5	1,52 (93%)	0,24	6	2,49 (68%)	0,46	6	0,71 (46%)	0,16	6(5)	1,18 (78%)	0,35	6	1,20 (73%)	0,30	6(5)
0,8	2,10 (101%)	0,60	6(5)	5,13 (106%)	0,82	6	0,75 (63%)	0,34	6(3)	2,49 (68%)	0,46	6	1,14 (51%)	0,39	6(4)
1,2	3,95 (121%)	1,01	6	7,63 (105%)	2,11	6(5)	2,70 (128%)	0,63	6(5)	5,13 (106%)	0,82	6	2,85 (170%)	0,74	6(5)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-10: Effekt von 5 µM Nikotin auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von männlichen F344-Ratten (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,10 (11%)	0,10	6(1)*	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,016	0,20 (13%)	0,20	6(1)	0,04 (4%)	0,04	6(1)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,05	1,28 (22%)	0,45	6(4)	0,24 (5%)	0,24	6(1)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,2	5,31 (10%)	1,45	6(5)	2,41 (6%)	1,11	6(3)	0,36 (11%)	0,36	6(1)	1,23 (6%)	0,81	6(2)	0,77 (2%)	0,77	6(1)
0,5	25,8 (67%)	6,63	6(5)	3,97 (15%)	2,53	6(2)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,8	25,1 (55%)	9,23	6(4)	2,36 (7%)	2,36	6(1)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
1,2	22,3 (46%)	14,2	6(2)	7,35 (15%)	7,35	6(1)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz
(%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-11: Effekt von 5 µM Nikotin auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von humanem Gewebe (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,15 (81%)	0,01	3	0,006 (78%)	0,01	3(1)*	0,011 (+)	0,01	3(2)	0,057 (79%)	0,01	3	0,004 (+)	0,004	3(1)
0,016	0,57 (52%)	0,07	3	0,12 (79%)	0,02	3	0,03 (61%)	0,01	3	0,2 (67%)	0,01	3	0,02 (33%)	0,01	3(2)
0,05	1,56 (77%)	0,22	3	0,22 (103%)	0,03	3	0,11 (101%)	0,03	3	0,48 (79%)	0,04	3	zu wenig Umsatz		
0,2	17,2 (94%)	0,09	2	1,08 (74%)	0,10	2	0,59 (129%)	0,20	2	5,07 (105%)	0,01	2	0,22 (23,6%)	-	2(1)
0,5	37,1 (81%)	1,31	2	2,94 (62%)	0,60	2	1,51 (66%)	0,31	2	11,6 (74%)	0,57	2	1,14 (51%)	0,16	2
0,8	76,6 (109%)	-	1	6,66 (145%)	-	1	3,43 (94%)	-	1	23,2 (94%)	-	1	1,35 (58%)	-	1
1,2	100,2 (87%)	-	1	8,35 (104%)	-	1	4,84 (70%)	-	1	29,7 (98%)	-	1	1,87 (43%)	-	1

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz
(%) Anteil an Kontrollumsatz
(+) kein Kontrollumsatz

Tabelle A-12: Effekt von 5 µM Nikotin auf den Umsatz von NNN nach 6 und 24 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von humanem Gewebe (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

Lunge	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
6h	zu wenig Umsatz			0,19 (82%)	0,03	4	zu wenig Umsatz			2,68 (785%)	0,13	4	0,45 (23%)	0,10	4
24h	0,04 (125%)	0,003	4	0,08 (92%)	0,01	1	0,03 (83%)	0,01	5	0,04 (31%)	0,01	4	0,69 (117%)	0,03	4

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-13: Effekt von 50 µM Cotinin auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von weiblichen A/J Mäusen (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,10 (31%)	0,06	6 (3)*	0,12 (44%)	0,05	6 (4)	zu wenig Umsatz			0,06 (33%)	0,04	6 (2)	0,02 (38%)	0,02	6 (1)
0,016	0,62 (63%)	0,13	6	0,76 (98%)	0,17	6	zu wenig Umsatz			0,68 (99%)	0,05	6	0,38 (129%)	0,10	6
0,05	1,95 (85%)	0,18	6	2,20 (129%)	0,35	6	0,08 (79%)	0,08	6 (1)	1,63 (89%)	0,25	6	1,28 (106%)	0,34	6
0,2	3,94 (44%)	0,79	6	4,17 (63%)	1,21	6 (5)	0,16 (26%)	0,16	6 (1)	6,37 (79%)	0,78	6	2,79 (60%)	0,97	6 (4)
0,5	11,1 (58%)	2,73	6	14,3 (87%)	1,80	6	zu wenig Umsatz			15,5 (72%)	1,56	6	4,19 (68%)	2,66	6 (2)
0,8	17,4 (50%)	3,46	6	17,2 (64%)	4,08	6	2,31 (55%)	1,48	6 (2)	26,8 (80%)	5,25	6	8,63 (85%)	2,96	6 (4)
1,2	33,6 (82%)	2,22	6	37,6 (100%)	3,37	6	2,24 (65%)	2,24	6 (1)	43,6 (100%)	2,96	6	27,3 (165%)	5,31	6

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-14: Effekt von 50 μ M Cotinin auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von weiblichen A/J Mäusen (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN μ M	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,94 (27%)	0,66	6(2)*	1,70 (33%)	1,02	6(4)	0,12 (%)	0,12	6(1)	1,05 (37%)	0,82	6(2)	1,22 (52%)	0,91	6(2)
0,016	4,31 (42%)	2,09	6(5)	5,45 (41%)	2,46	6(5)	0,28 (%)	0,28	6(1)	0,63 (11%)	0,40	6(2)	5,78 (53%)	2,91	6(5)
0,05	15,0 (86%)	4,68	5	23,3 (90%)	12,1	5	zu wenig Umsatz			10,2 (94%)	2,66	5	18,5 (92%)	7,71	5
0,2	110 (123%)	24,1	5	136 (95%)	30,0	5	7,80 (72%)	4,81	5(2)	52,8 (83%)	28,8	5(4)	142 (171%)	49,9	5
0,5	165 (95%)	36,2	6	163 (74%)	44,7	6	9,92 (21%)	8,10	6(2)	75,8 (75%)	21,6	6(5)	196 (94%)	66,4	6(5)
0,8	158 (53%)	63,5	6(5)	137 (38%)	56,6	6(5)	5,29 (7%)	5,29	6(1)	158 (79%)	53,1	6(5)	192 (68%)	110	6(3)
1,2	217 (68%)	62,1	5	275 (66%)	63,2	5	zu wenig Umsatz			141 (58%)	28,9	5	216 (45%)	71,2	5(3)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz
(%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-15: Effekt von 50 µM Cotinin auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von männlichen F344-Ratten (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,016	0,03 (75%)	0,01	6(5)*	0,05 (120%)	0,01	6	0,01 (%)	0,004	6(2)	0,07 (79%)	0,01	6	0,03 (112%)	0,01	6(4)
0,05	0,20 (91%)	0,04	6	0,16 (55%)	0,04	6(5)	0,08 (179%)	0,03	6(4)	0,24 (117%)	0,03	6	0,10 (48%)	0,02	6(5)
0,2	0,42 (77%)	0,12	6(5)	0,63 (87%)	0,06	6	0,15 (35%)	0,10	6(2)	1,15 (76%)	0,20	6	0,54 (87%)	0,08	6
0,5	1,14 (69%)	0,45	6(5)	1,67 (87%)	0,19	6	0,52 (34%)	0,28	6(3)	3,20 (87%)	0,55	6	1,31 (80%)	0,14	6
0,8	1,67 (80%)	0,30	6	2,23 (80%)	0,29	6	0,63 (53%)	0,47	6(2)	2,97 (61%)	0,65	6	2,14 (96%)	0,21	6
1,2	2,29 (70%)	0,18	6	3,39 (85%)	0,51	6	0,93 (44%)	0,66	6(2)	6,14 (85%)	1,44	6	2,97 (177%)	0,33	6

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-16: Effekt von 50 µM Cotinin auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von männlichen F344-Ratten (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,15 (16%)	0,15	6(1)*	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,016	0,75 (47%)	0,22	5	0,62 (53%)	0,20	5	zu wenig Umsatz			0,56 (85%)	0,29	5(4)	0,26 (32%)	0,11	5(3)
0,05	2,55 (44%)	0,67	6	0,98 (19%)	0,35	6(4)	0,36 (188%)	0,36	6(1)	1,17 (44%)	0,61	6(3)	0,91 (27%)	0,58	6(3)
0,2	11,3 (22%)	4,23	6(4)	4,08 (11%)	2,08	6(3)	zu wenig Umsatz			2,95 (14%)	2,03	6(2)	zu wenig Umsatz		
0,5	9,76 (26%)	3,43	6(5)	9,19 (34%)	3,00	6(4)	zu wenig Umsatz			5,33 (40%)	2,57	6(3)	1,59 (10%)	1,59	6(1)
0,8	25,6 (56%)	10,2	6(5)	21,8 (64%)	5,60	6(5)	4,90 (%)	4,90	6(1)	17,3 (158%)	13,7	6(2)	5,81 (28%)	3,69	6(2)
1,2	47,9 (98%)	15,1	6	36,0 (73%)	8,55	6	2,72 (71%)	2,72	6(1)	28,9 (279%)	11,7	6(5)	22,1 (%)	10,9	6(3)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz
(%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-17: Effekt von 50 µM Cotinin auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von humanem Gewebe (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	zu wenig Umsatz			0,014 (65%)	-	3(1)*	zu wenig Umsatz			0,06 (76%)	0,01	3	zu wenig Umsatz		
0,016	0,50 (46%)	0,05	3	0,07 (49%)	0,01	3	0,03 (49%)	0,01	3	0,19 (63%)	0,03	3	0,03 (43%)	0,01	3(2)
0,05	2,02 (101%)	0,08	3	0,20 (94%)	0,03	3	0,20 (178%)	0,01	3	0,35 (106%)	0,01	3	0,10 (106%)	0,02	3
0,2	18,8 (102%)	2,91	2	1,15 (79%)	0,19	2	0,96 (210%)	0,07	2	5,65 (116%)	0,63	2	0,52 (56%)	0,08	2
0,5	43,4 (95%)	4,67	2	2,89 (61%)	0,23	2	2,10 (92%)	0,31	2	13,1 (83%)	2,10	2	1,20 (54%)	0,20	2
0,8	66,5 (94%)	2,94	2	3,80 (83%)	0,73	2	3,67 (101%)	0,81	2	20,6 (84%)	1,06	2	2,21 (94%)	0,23	2
1,2	97,0 (84%)	1,01	2	7,53 (94%)	0,35	2	4,84 (70%)	0,47	2	29,0 (96%)	1,25	2	2,03 (46%)	0,16	2

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-18: Effekt von 50 μ M Cotinin auf den Umsatz von NNN nach 6 und 24 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von humanem Gewebe (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

Lunge	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
6h	zu wenig Umsatz			0,16 (72%)	0,03	4	zu wenig Umsatz			2,28 (670%)	0,09	4	0,63 (33%)	0,07	4
24h	0,04 (134%)	0,01	4	0,08 (95%)	0,01	4	0,04 (117%)	0,01	4	0,06 (43%)	0,01	4	0,81 (138%)	0,07	4

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-19: Effekt von 0,2 µM PEITC auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von weiblichen A/J Mäusen (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,24 (72%)	0,02	6	0,20 (73%)	0,05	6	zu wenig Umsatz			0,16 (90%)	0,01	6	0,04 (67%)	0,03	6(2)
0,016	0,91 (94%)	0,18	4	0,66 (85%)	0,13	4	0,04 (40%)	0,04	4(1)*	0,61 (88%)	0,13	4	0,35 (117%)	0,09	4
0,05	3,56 (155%)	0,88	6	2,38 (139%)	0,57	6	0,56 (564%)	0,17	6(5)	2,39 (130%)	0,13	6	0,96 (79%)	0,25	6(5)
0,2	10,4 (117%)	2,95	4	8,03 (120%)	2,17	4	0,71 (117%)	0,44	4(2)	8,79 (108%)	0,24	4	2,60 (56%)	0,88	4(3)
0,5	25,6 (134%)	3,41	6	17,6 (107%)	3,70	6	3,83 (179%)	0,95	6(5)	18,1 (83%)	1,37	6	7,60 (124%)	2,11	6(5)
0,8	31,4 (90%)	8,72	6	26,5 (98%)	7,39	6	0,87 (20%)	0,87	6(1)	36,7 (109%)	3,91	6	9,31 (91%)	2,39	6(5)
1,2	54,7 (134%)	14	6	42,3 (113%)	11,2	6	2,53 (73%)	1,68	6(2)	39,4 (91%)	7,40	6	15,3 (93%)	5,50	6(4)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-20: Effekt von 0,2 µM PEITC auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von weiblichen A/J Mäusen (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	1,96 (56%)	0,67	6(4)*	2,15 (41%)	0,63	6(5)	zu wenig Umsatz			0,43 (15%)	0,27	6(2)	2,29 (97%)	1,05	6(3)
0,016	1,98 (19%)	0,76	6(4)	1,96 (15%)	0,73	6(4)	zu wenig Umsatz			1,13 (20%)	0,61	6(3)	2,47 (22%)	1,31	6(3)
0,05	20,4 (110%)	2,86	5	20,5 (79%)	3,60	5	1,52 (+%)	1,00	5(2)	8,10 (75%)	3,29	5	21,8 (108%)	7,07	5
0,2	59,9 (67%)	37,1	6(5)	74,0 (52%)	63,0	6(4)	3,42 (32%)	3,42	6(1)	63,5 (99%)	42,7	6(5)	52,1 (63%)	46,2	6(3)
0,5	174 (100%)	38,6	6	189 (86%)	41,0	6	zu wenig Umsatz			147 (145%)	44,5	6	144 (69%)	72,7	6(3)
0,8	232 (78%)	90,2	6	310 (85%)	120	6(5)	19,0 (78%)	12,6	6(2)	210 (105%)	108	6(4)	146 (52%)	97,6	6(3)
1,2	467 (147%)	204	6	554 (134%)	253	6	26,5 (85%)	26,5	6(1)	513 (211%)	191	6	380 (79%)	259	6(3)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz
(%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-21: Effekt von 0,2 µM PEITC auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von männlichen F344-Ratten (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,016	0,03 (59%)	0,01	6(3)*	0,05 (131%)	0,01	6(5)	0,02 (%)	0,01	6(3)	0,08 (91%)	0,03	6(4)	0,02 (96%)	0,01	6(2)
0,05	0,12 (57%)	0,03	6	0,20 (68%)	0,02	6	0,09 (221%)	0,03	6(4)	0,38 (182%)	0,05	6	0,08 (39%)	0,03	6(4)
0,2	0,45 (83%)	0,07	6	0,78 (107%)	0,15	6	0,41 (98%)	0,10	6(5)	1,23 (82%)	0,18	6	0,46 (74%)	0,07	6
0,5	1,01 (61%)	0,12	6	1,51 (79%)	0,20	6	0,71 (46%)	0,32	6(3)	2,76 (75%)	0,42	6	1,21 (74%)	0,42	6(5)
0,8	2,23 (107%)	0,54	6	2,76 (99%)	0,54	6	0,19 (16%)	0,19	6(1)	4,26 (88%)	0,09	6	2,58 (115%)	0,51	6
1,2	2,61 (80%)	0,85	6(5)	4,51 (114%)	0,39	6	0,51 (24%)	0,51	6(1)	8,60 (119%)	1,50	6	2,85 (170%)	0,76	6(5)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-22: Effekt von 0,2 µM PEITC auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von männlichen F344-Ratten (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,26 (28%)	0,26	6(1)*	0,25 (46%)	0,16	6(2)	zu wenig Umsatz			0,08 (36%)	0,08	6(1)	0,09 (26%)	0,09	6(1)
0,016	0,61 (38%)	0,37	5(3)	0,35 (30%)	0,21	5(3)	zu wenig Umsatz			0,24 (35%)	0,14	5(2)	zu wenig Umsatz		
0,05	0,62 (11%)	0,62	6(1)	1,63 (32%)	0,90	6(3)	zu wenig Umsatz			0,43 (16%)	0,27	6(2)	0,34 (10%)	0,34	6(1)
0,2	13,7 (27%)	7,08	6(4)	10,8 (28%)	4,53	6	zu wenig Umsatz			3,09 (15%)	2,19	6(2)	6,94 (21%)	2,88	6(4)
0,5	18,6 (49%)	6,25	6(5)	14,6 (54%)	5,01	6(4)	1,25 (100%)	1,25	6(1)	2,50 (18%)	2,50	6(1)	4,20 (26%)	2,66	6(2)
0,8	26,5 (58%)	15,6	6(3)	24,7 (72%)	13,3	6(3)	zu wenig Umsatz			4,54 (42%)	4,54	6(1)	7,08 (34%)	7,08	6(1)
1,2	57,2 (117%)	27,8	6(3)	25,6 (52%)	17,5	6(2)	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			30,8 (%)	15,2	6(3)

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz
(%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-23: Effekt von 0,2 µM PEITC auf den Umsatz von NNN nach 6 Stunden Inkubation in Leberschnitten von humanem Gewebe (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

NNN µM	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
0,001	zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz			zu wenig Umsatz		
0,004	0,16 (88%)	0,01	3	0,02 (86%)	-	3(1)*	0,04 (63%)	0,01	3	0,05 (67%)	0,004	3	0,03 (48%)	0,01	3
0,016	0,59 (54%)	0,05	3	0,08 (57%)	0,01	3	0,17 (155%)	0,05	3	0,21 (68%)	0,03	3	0,13 (131%)	0,02	3
0,05	2,06 (103%)	0,17	3	0,21 (99%)	0,01	3	1,10 (241%)	0,25	2	0,71 (116%)	0,02	3	0,67 (72%)	0,12	2
0,2	8,23 (45%)	0,29	2	0,61 (42%)	0,03	2	2,73 (120%)	-	1	2,70 (56%)	0,22	2	1,76 (79%)	-	1
0,5	17,9 (39%)	-	1	1,24 (26%)	-	1	4,08 (112%)	0,08	2	6,54 (42%)	-	1	1,20 (51%)	0,05	2
0,8	33,0 (47%)	2,50	2	2,63 (57%)	0,65	2	7,06 (103%)	0,59	2	10,5 (43%)	0,91	2	2,15 (49%)	0,20	2
1,2	40,4 (35%)	5,31	2	2,54 (32%)	0,43	2				16,5 (55%)	0,78	2			

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz (%) Anteil an Kontrollumsatz

Tabelle A-24: Effekt von 0,2 μ M PEITC auf den Umsatz von NNN nach 6 und 24 Stunden Inkubation in Lungenschnitten von humanem Gewebe (fmol/min/mg Protein). Mittelwert (MW) und Standardfehler (SE) von N Ansätzen

Lunge	Hydroxysäure			Ketosäure			Diol			Norcotinin			Ketoalkohol		
	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N	MW	SE	N
6h	zu wenig Umsatz			0,249 (106%)	0,01	4	zu wenig Umsatz			2,07 (609%)	0,20	4	0,58 (30%)	0,29	4
24h	0,04 (134%)	0,01	4	0,09 (109%)	0,003	4	0,02 (58%)	0,02	4	zu wenig Umsatz			0,72 (124%)	0,03	4

* Anzahl Proben mit nachweisbarem Umsatz in Klammern (%) Anteil an Kontrollumsatz

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans Brückner für die Ermöglichung der Promotion an der Justus-Liebig-Universität Giessen danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Elmar Richter für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung der Teilnahme an der Konferenz in Orlando sowie die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Thetter der Asklepios Fachklinik in Gauting und Herrn Prof. Dr. Heitland des Klinikums Bogenhausen in München möchte ich für die Überlassung der humanen Gewebeproben danken.

Bei Frau Christiana Oehlmann bedanke ich mich herzlich für die sachkundige Einführung in die Welt der HPLC, die tatkräftige Unterstützung im Labor und die angenehme und unkomplizierte Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Stefan Tyroller und Herrn Dr. Wolfgang Zwickelpflug danke ich für die fachliche und auch seelische Unterstützung, den Hilfestellungen bei der Lösung unterschiedlicher Probleme und Krisen und die stets fröhliche Zusammenarbeit.

Auch möchte ich mich bei den Kollegen und Freunden im Arbeitskreis bedanken, für die vielen anregenden Diskussionen zum Thema und darüber hinaus.

Letztendlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meinem Bruder, die mir während meiner Ausbildung stets den Rücken stärkten.

Lebenslauf

Name: Lassnack
Vorname: Bettina, Maria
geboren am: 9. November 1970 in München
Vater: Friedrich Lassnack, Schlosser
Mutter: Penelope Lassnack, geb. Camacaris, Hausfrau
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule: 1976-1980 Grund- und Hauptschule Fährichschule, München
1980-1989 Michaeli-Gymnasium, München
6/1989 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1991-1999 Studium der Ökotrophologie an der Technischen
Universität München, Weihenstephan
11/93 Diplom-Vorprüfung
8/98-2/99 Diplomarbeit an der Technischen Universität München
Weihenstephan
Thema: Ernährungssituation in Flüchtlingslagern
6/99 Mündliche Diplom-Hauptprüfung mit Abschluss
Diplom-Ökotrophologie

Promotion: seit Mai 2000 Anfertigung einer experimentellen Doktorarbeit in der
Forschungsgruppe für Chemische Kanzerogenese von Prof. Dr.
Elmar Richter am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und
Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München