

**Mercaptursäure und Nukleosidaddukt
im Harn als Biomarker in
1-Hydroxymethylpyren-exponierten Ratten**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität Potsdam

vorgelegt von
Lan Ma
aus Peking, China

Potsdam 2001

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 BIOAKTIVIERUNG UND SCHICKSAL GENOTOXISCHER SUBSTANZEN IN VIVO	1
1.2 BIOMARKER	2
1.2.1 Allgemeines	2
1.2.2 Glutathionkonjugation und die Bildung von Mercaptursäuren	4
1.2.3 Nucleobasenaddukte im Harn	7
1.2.4 Die Bedeutung der Mercaptursäuren und der Nucleobasenaddukte als Biomarker	8
1.3 1-METHYLPYREN (MP) UND 1-HYDROXYMETHYLPYREN (HMP)	9
1.4 FRAGESTELLUNG	12
2. EXPERIMENTELLER TEIL	13
2.1 MATERIAL	13
2.1.1 Geräte	13
2.1.2 Chemikalien	14
2.1.3 Enzyme	16
2.1.4 Biologisches Material: Cytosol, Mikrosomen und Mitochondrien aus Geweben	16
2.2 GEWINNUNG VON STANDARDSUBSTANZEN	17
2.2.1 Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA)	17
2.2.2 Glutathion-S-Konjugat des 1-Sulfooxymethylpyren (MPSG)	18
2.2.3 ¹⁴ C-Hydroxymethylpyren (¹⁴ C-HMP)	18
2.2.4 1-Methylpyren (MP)	19
2.2.5 1-Sulfooxymethylpyren (SMP)	19
2.2.6 Biosynthese von Glucuronsäurekonjugaten	19
2.3 INKUBATIONEN	20
2.3.1 Bestimmung der GST-Aktivität gegenüber 1-Sulfooxymethylpyren (SMP) in cytosolischen Präparationen von Leber, Niere, Lunge und Colon der Ratte	20
2.3.2 NAD ⁺ -abhängige enzymatische Oxidation von 1-Hydroxymethylpyren (HMP) und Pyrencarboxaldehyd (PCA)	21
2.4 TIEREXPERIMENTE	22
2.4.1 Allgemeine Bedingungen	22
2.4.2 Bestimmung von Methylpyrenyl-Mercaptursäure (MPMA) in Plasma, Urin und Faeces nach Applikation von 1-Hydroxymethylpyren (HMP)	23
2.4.3 Bestimmung von Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) in Rattenurin nach Applikation von 1-Methylpyren (MP)	23
2.4.4 Bestimmung von Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) und N ² -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG) in Urin nach Applikation von 1-Sulfooxymethylpyren (SMP) ..	24
2.4.5 Erfassung der Eliminationskinetik und Bestimmung des Metabolitenmusters	24

2.4.6	Beeinflussung der Toxifizierung / Detoxifizierung durch Vorbehandlung mit Disulfiram und Ethanol.....	25
2.5	ANALYTIK.....	25
2.5.1	Allgemeines	25
2.5.2	Analyse des ¹⁴ C-Hydroxymethylpyren-Äquivalentes	29
2.5.3	Identifizierung ausgeschiedener Metaboliten	29
2.5.4	Quantitativer Vergleich ausgeschiedener Metaboliten	31
2.5.5	Extraktion und Identifizierung akkumulierter Metaboliten der Fettgewebe.....	32
2.5.6	Extraktion und Identifizierung von Metaboliten in der Leber	32
2.5.7	Extraktion, Identifizierung und Quantifizierung von Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) in Urin, Faeces und Blut	33
2.5.8	Extraktion und Identifizierung von N ² -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG) im Urin von Ratten.....	33
2.5.9	Bestimmung der DNA-Addukt-Häufigkeit mittels ³² P-Postlabelling	34
3.	ERGEBNISSE	37
3.1	MERCAPTURSÄURE- UND NUKLEOSIDADDUKT-AUSSCHIEDUNG ALS RESULTAT DER BIOAKTIVIERUNG VON 1-HYDROXYMETHYLPYREN (HMP) ZU 1-SULFOXYMETHYLPYREN (SMP).....	37
3.1.1	Nachweis des Glutathion-S-Konjugates (MPSG), der Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) und des N ² -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosins(MPdG).....	38
3.1.2	<i>In vitro</i> Bestimmung der GST-Aktivität gegenüber 1-Sulfooxymethylpyren (SMP).....	41
3.1.3	<i>In vivo</i> Untersuchungen zur Ausscheidung von N ² -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG) und Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA).....	43
3.2	UNTERSUCHUNG ZUM METABOLISMUS VON 1-HYDROXYMETHYLPYREN (HMP).....	51
3.2.1	Ausscheidung und Gewebeverteilung der Radioaktivität nach ¹⁴ C-Hydroxymethylpyren-Applikation	51
3.2.2	Metabolitenidentifizierung im Urin nach Applikation von 1-Hydroxymethylpyrene (HMP) ..	54
3.2.3	Bestimmung des relativen Verhältnisses der Metaboliten in Urin und Faeces mittels Radiochromatographie	68
3.2.4	Identifizierung der Metaboliten in Fettgewebe und Leber	73
3.3	EINFLUSS VON ETHANOL UND DISULFIRAM AUF DIE AKTIVIERUNG VON 1-HYDROXYMETHYLPYREN (HMP).....	74
3.3.1	Enzymatische Oxidation von 1-Hydroxymethylpyren (HMP) und Pyrenicarboxaldehyd (PCA) <i>in vitro</i>	75
3.3.2	Einfluss von Disulfiram und Ethanol auf die 1-Sulfooxymethylpyren (SMP)-Konzentration im Plasma, die DNA-Addukthäufigkeit in der Leber und die Ausscheidung der Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) <i>in vivo</i>	78
4.	DISKUSSION.....	85
4.1	DIE AUSSCHIEDUNG DER METHYLPYREN-MERCAPTURSÄURE (MPMA) UND DES N²-(1-METHYLPYRENYL)-DESOXYGUANOSINS (MPdG) ALS RESULTAT DER BIOAKTIVIERUNG.....	85

4.1.1	GSH-Konjugation von 1-Sulfooxymethylpyren (SMP) <i>in vitro</i>	85
4.1.2	Die Ausscheidung von Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) durch 1-Methylpyren (MP)- 1-Hydroxymethylpyren (HMP)-, bzw. 1-Sulfooxymethylpyren (SMP)-behandelte Ratten	86
4.1.3	Ausscheidung von N^2 -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG)	91
4.2	METABOLISMUS VON 1-HYDROXYMETHYLPYREN (HMP) UND DESSEN BEEINFLUSSBARKEIT	95
4.3	EINFLUSS VON STÖRUNGEN DES DETOXIFIZIERENDEN SYSTEMS	102
4.3.1	Die Wirkung des Disulfirams.....	102
4.3.2	Wirkung des Ethanols.....	104
4.4	METHYLPYREN-MERCAPTURSÄURE (MPMA) ALS BIOMARKER FÜR DIE EXPOSITION GEGENÜBER 1-METHYLPYREN (MP).....	106
4.5	AUSBLICK.....	107
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	113
7.	ANHANG.....	125

Dank

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AF	Ammoniumformiat
AO	Aldehydoxidase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AU	Absorption Unit
APCl-	chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
CMP	1-Chlormethylpyren
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfälle pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI- / ESI+	Elektrosprayionisation, negativer bzw. positiver Modus
GC	Gaschromatographie
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase
HMP	1-Hydroxymethylpyren
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
i.p.	intraperitoneal
KM	Körpermasse
MP	1-Methylpyren
MPdG	N^2 -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin
MPMA	<i>N</i> -Acetyl-S-methylpyrenyl-L-cystein (Methylpyrenyl-Mercaptursäure)
MPSG	S-Methylpyrenyl-glutathion (Methylpyrenyl-S-glutathion)
MS	Massenspektrometrie
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion
NAD ⁺	Nicotin-adenin-dinukleotid, oxidierte Form
NADP ⁺	Nicotin-adenin-dinukleotid-phosphat, oxidierte Form
<i>p.a.</i>	für die Analytik geeignete Qualität
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PCA	Pyrencarboxaldehyd
PCS	Pyrencarbonsäure
PDA	Photodiodenarray-Detektor
R _t	Retentionszeit
SD	Standardabweichung
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SMP	1-Sulfooxymethylpyren
SULT	Sulfotransferase
S _N	Nukleophile Substitution
TIC	Totalionenstrom
TMSH	Trimethylsilylhydroxid
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteile
XO	Xanthinoxidase

1. Einleitung

Bereits im Jahre 1761 beschrieb der Londoner Arzt John Hill den Gebrauch von Schnupftabak als eine mögliche Ursache für Nasenkrebs. Im Jahre 1775 nahm der britische Chirurg Pott an, dass der Beruf des Schornsteinfegers mit Skrotumkrebs ursächlich zusammenhängen könnte. Seitdem währt die Suche nach dem Prinzip der Krebsentstehung, um die Krankheiten zu heilen und vor allem um präventive Maßnahmen zu finden. Heute gilt der Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und Umweltfaktoren als nachgewiesen.

Die Kanzerogenese ist nach heutigem Verständnis ein Mehrstufenprozess, bestehend aus Initiation, Promotion und Progression. Der initiale Schritt der Kanzerogenese ist die Schädigung der DNA, eine notwendige, aber nicht hinreichende Voraussetzung für die Entstehung und Manifestation von Tumoren. Bei der Initiation führt ein genotoxisches Ereignis zu Veränderungen an der DNA, die bereits nach einer Zellteilung als irreversible Schäden erhalten bleiben können. UV- und ionisierende Strahlung, Exposition mit Chemikalien und die endogene Belastung durch oxidativen Stress gelten als die wesentlichen Ursachen für die Initiation.

1.1 Bioaktivierung und Schicksal genotoxischer Substanzen *in vivo*

Die Wirkung genotoxischer Kanzerogene beruht häufig auf ihrer Fähigkeit, mit der DNA zu reagieren und so DNA-Schädigungen zu verursachen. Die meisten dieser Substanzen sind nicht genotoxisch *per se*. Sie erlangen diese Fähigkeit erst nach metabolischer Aktivierung. Letztere ist eine Konsequenz des Fremdstoffmetabolismus, einer Abfolge von chemischen Reaktionen, die Lebewesen befähigt, die aufgenommenen, oftmals lipophilen Fremdstoffe in polarere, effizient ausscheidbare Substanzen zu überführen. Beim Metabolismus von resorbierten Fremdstoffen steht die Bildung DNA-reaktiver Metaboliten der Sequestrierung des Fremdstoffes gegenüber (Abb. 1.1). Die entstehenden toxischen Intermediate werden meistens durch Konjugationsreaktionen abgefangen (z.B. durch Glutathionkonjugation) und anschließend ausgeschieden. Nur ein kleiner Teil bindet an die DNA und verursacht primäre DNA-Schädigungen (Abb. 1.1). Die Menge der

Metaboliten, die mit der DNA reagieren kann, wird durch die empfindliche Balance zwischen Prozessen der Sequestrierung, der Bioaktivierung und der Bioinaktivierung bestimmt. Strukturelle und damit verbundene elektronische und sterische Eigenschaften entscheiden über die chemische Reaktivität und die Detoxifizierbarkeit der betroffenen Metaboliten.

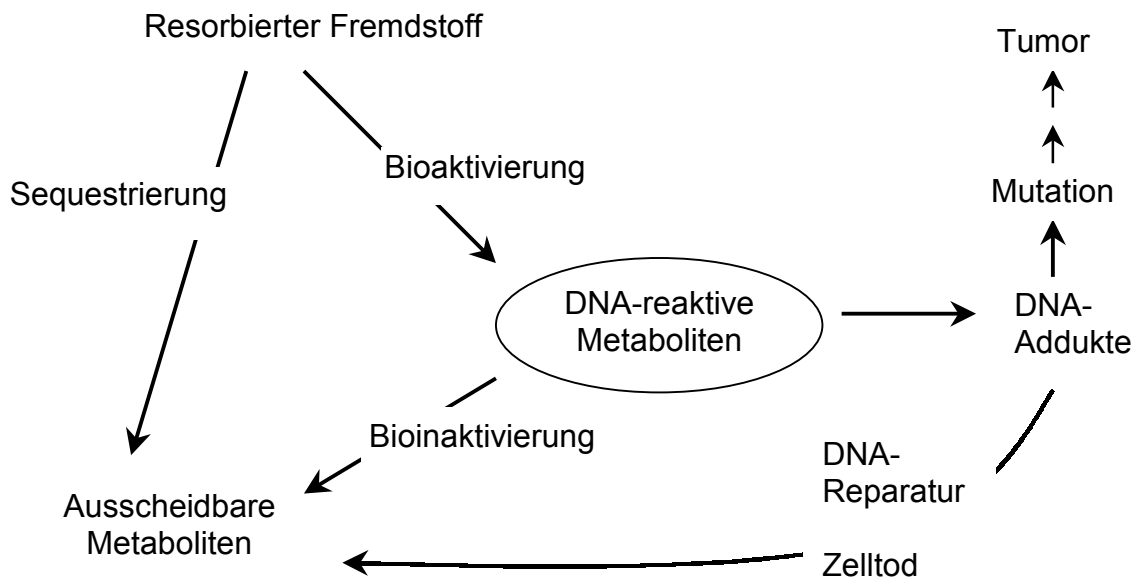


Abbildung 1.1 Herkunft und Konsequenz der DNA-reaktiven Metaboliten.

1.2 Biomarker

1.2.1 Allgemeines

Zur Erfassung der toxisierenden Prozesse werden sogenannte Biomarker beim Überwachungssystem (Biomonitoring), das vor allem in der Arbeitsmedizin angesiedelt ist, eingesetzt. Als Biomarker bezeichnet man biochemische und biologische Endpunkte, die Veränderungen biologischer Systeme, welche mit der Exposition gegen bestimmte Noxen bzw. ihren toxischen Effekten einhergehen, widerspiegeln.

Das Monitoringverfahren ist hierarchisch nach dem Prinzip der Dosis-Wirkungsbeziehung und mit der Zielsetzung zur Prävention aufgebaut. Die äußere Dosis, die innere Dosis und die biologisch wirksame Dosis werden überwacht. Letztere führt zu biologischen Effekten, zu veränderten Funktionen und schließlich

zur Krankheit (Abb. 1.2). Im Rahmen dieser Kaskade ist das humane Biomonitoring der übergeordnete Begriff für die Bestimmung der inneren Dosis, der biologisch wirksamen Dosis und von frühen, messbaren biologischen Effekten.

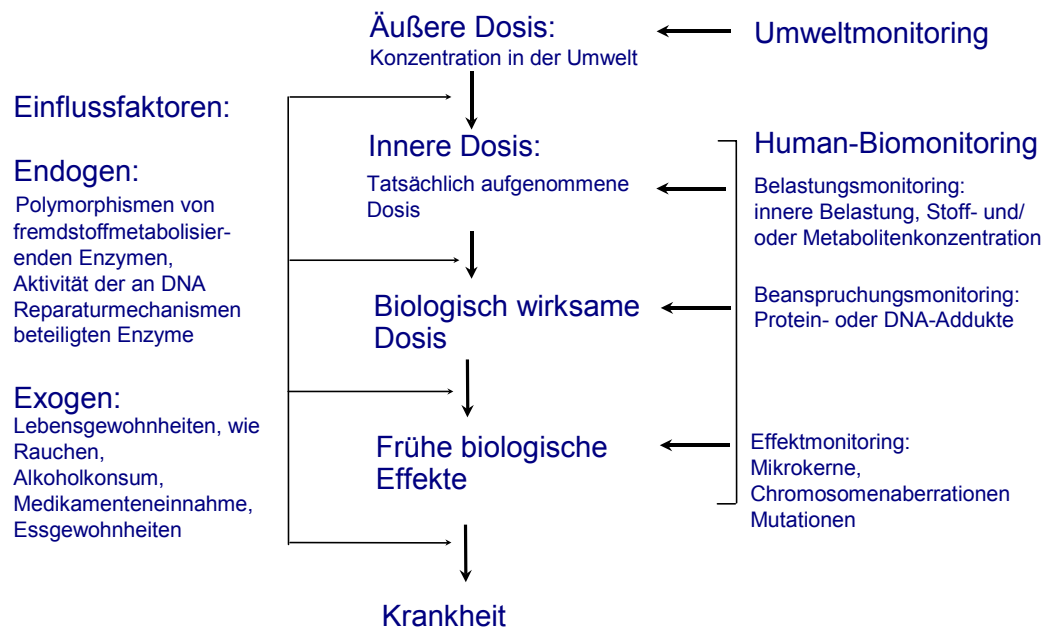


Abbildung 1.2 Angewandte Monitoringverfahren und deren praktische Relevanz (In Anlehnung an Henderson *et al.* 1989; Lowry 1995; Farmer *et al.* 1996).

In epidemiologischen Untersuchungen steht am Anfang der Kaskade das Belastungsmonitoring. Hier wird die innere Belastung durch die Stoff- und Metabolitenkonzentration in Körperflüssigkeiten (z.B. Plasma, Urin) wiedergegeben. Bei den gemessenen Metaboliten handelt es sich meistens nicht um das DNA-reaktive Intermediat, das aufgrund seiner Reaktivität nur schwer zu erfassen ist. Somit steht das Belastungsmonitoring nur in indirektem Zusammenhang zum toxischen Ereignis. Im Beanspruchungsmonitoring dagegen hängen die gemessenen DNA-Schädigungen kausal mit der Initiation der Kanzerogenese zusammen. Theoretisch genügt eine einzige initialisierte Zelle, um Krebs zu induzieren. Zu den Parametern des Effektmonitorings zählen die frühen biologischen Effekte, wie chromosomale Aberrationen oder Mikrokerne. Beanspruchungs- und Effektmonitoring erfordern in der Regel eine invasive Probenahme. Bei Menschen steht dafür meistens nur das Blut zur Verfügung, so dass Effekte im Zielorgan der Kanzerogenese übersehen werden können. Zudem werden alle diese Parameter durch endogene und exogene Faktoren beeinflusst.

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Forschung bemüht, Biomarker zu finden, die keine invasive Probennahme erfordern und trotzdem unmittelbar mit dem toxischen Ereignis im Zusammenhang stehen. Solche Biomarker können ausgeschiedene Metaboliten sein, die mit DNA-reaktiven Metaboliten einhergehen. Sie spiegeln die Aktivität der Bioaktivierung und Bioinaktivierung wider. Sie geben zudem Auskunft darüber, gegenüber welchen Fremdstoffen die betroffenen Individuen exponiert waren. Die Klasse der *N*-Acetylcystein-S-Konjugate, auch Mercaptursäuren genannt, ist ein typisches Beispiel für die oben beschriebenen, chemisch spezifischen Biomarker. Darüber hinaus kommt eine besondere Aufmerksamkeit den Nukleobasen- und Nukleosidaddukten zu, welche die DNA-Schädigung des ganzen Organismus erfassen sollen. Im Folgenden wird die Bildung der Mercaptursäuren und Nukleobasenaddukte beschrieben.

1.2.2 Glutathionkonjugation und die Bildung von Mercaptursäuren

Die Konjugationsreaktion mit Glutathion (GSH) ist der wichtigste Schutzmechanismus der Zelle vor Elektrophilen. Die Reaktion läuft zwar auch spontan ab, doch kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch Glutathion-S-Transferasen (GST) erheblich gesteigert werden. Ziel dieser Konjugationsreaktion ist es, elektrophile Metaboliten abzufangen, um so die Zelle effektiv vor deren Angriff zu schützen.

In der Zelle entstehende GSH-Konjugate inhibieren die GST-Aktivität (Akerboom & Sies 1989), so dass sich die Notwendigkeit des Transportes, des Abbaus und der Ausscheidung ergibt. Die Konjugate werden durch die ATP-abhängige GS-X-Pumpe und verschiedene Carrierproteine aktiv aus der Zelle transportiert und weiter prozessiert (Lash & Jones 1984; Ishikawa 1992; Zaman *et al.* 1995). Bei Menschen und Ratten werden Glutathionkonjugate bevorzugt als Mercaptursäuren ausgeschieden (Commandeur *et al.* 1995).

Der Mercaptursäure-Weg ist ein Multi-Organ-Prozess. Die Konjugation mit GSH erfolgt hauptsächlich in der Leber. Für die gebildeten GSH-Konjugate befinden sich aktive Transporter auf der kanikularen und sinusoidalen Membran. Die Substrataffinität der kanikularen Transporter erhöht sich mit steigendem Molekulargewicht der zu transportierenden Verbindung. So gelangen große Moleküle

bevorzugt in die Galle, während kleinere in das Blut übergehen. Die Konjugate werden nun in mehreren Schritten zum entsprechenden Cystein-Konjugat abgebaut, unabhängig davon, ob sie über die Blutbahn in die Niere oder über die Galle in den Intestinaltrakt gelangen. Die Reaktionen werden durch die γ -Glutamyltranspeptidase und die Cysteinglycindipeptidase bzw. Aminopeptidase M katalysiert. Das Cystein-Konjugat kann dann durch die Cystein-S-Konjugat-N-Acetyltransferase zur Mercaptursäure acetyliert oder durch die β -Lyase zum Sulfhydrylderivat des Fremdstoffes abgebaut werden. Je nach Spezies werden Metaboliten verschiedener Zwischenstufen renal ausgeschieden. Der Mensch und die Ratte scheiden bevorzugt die Mercaptursäure als Endprodukt aus, während Meerschweinchen und Kaninchen andere Endprodukte, wie das S-Konjugat des 3-Mercaptopyruvates (Commandeur *et al.* 1995) bilden. Die wichtigsten Zwischenstufen des Katabolismus von Glutathion-S-Konjugaten und die daran beteiligten Enzyme und Organe sind in Abbildung 1.3 vereinfacht dargestellt.

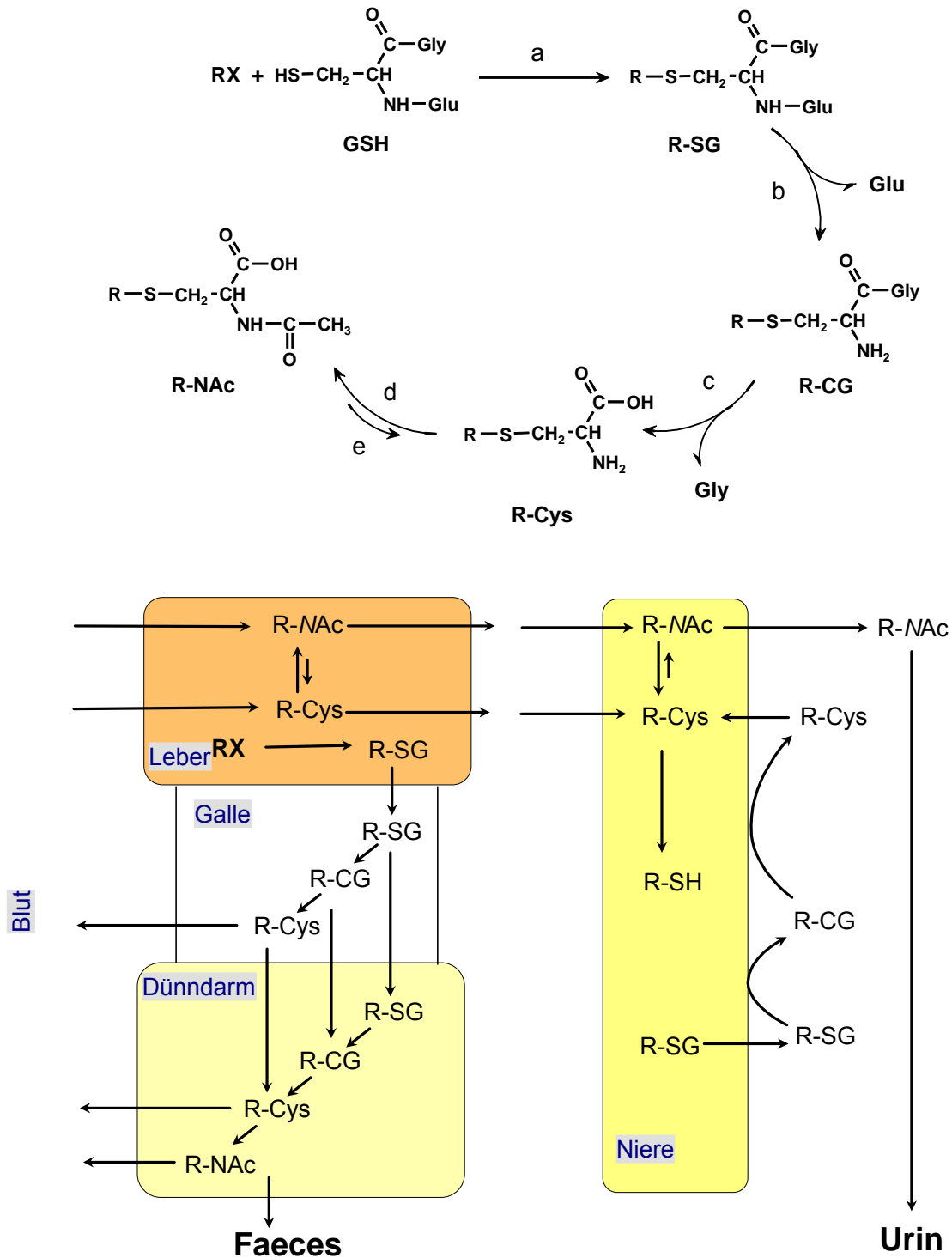


Abbildung 1.3 Der Katabolismus von GSH-Konjugaten und die Bildung entsprechender Mercaptursäuren. a) Glutathion-S-Transferase (GST); b) γ -Glutamyltranspeptidase; c) Cystein-glycindi-peptidase und Aminopeptidase M; d) Cystein-Konjugat-*N*-Acetyltransferase; e) *N*-Deacetylase

R-SG: Glutathion-S-Konjugat; R-CG: Cysteinylglycin-S-Konjugat; R-Cys: Cystein-S-Konjugat; R-NAc: *N*-Acetylcystein-S-Konjugat = Mercaptursäuren; RX: elektrophile Stoffe (in Anlehnung an Commandeur *et al.* 1995).

1.2.3 Nucleobasenaddukte im Harn

Der größte Teil der DNA-Addukte verursacht keine bleibenden DNA-Schädigungen: Modifizierte Nukleotide, Nukleoside und Nucleobasen werden durch DNA-Reparatur, Zelltod oder spontane Depurinierung bzw. Depyrimidinierung freigesetzt und ausgeschieden.

Das Vorhandensein modifizierter Nucleobasen in humanem Urin wurde bereits im Jahre 1898 von Krüger und Salomon (1898 a,b) entdeckt. Sie fraktionierten 10000 l Urin und isolierten einige Gramm 7-Methylguanin. Das methylierte Guanin stammt allerdings in erster Linie aus den methylierten Nucleobasen der tRNA, die durch normalen tRNA-Turnover und fehlende Wiederverwendung ausgeschieden werden (Adams *et al.* 1981). Exposition gegenüber methylierenden Agentien wie *N*-Nitrosodimethylamin verursacht eine erhöhte Ausscheidung dieser Nucleobase in Versuchstieren (Craddock & Magee 1967). Diese Beobachtung bildete die Basis der späteren Arbeit über die Ausscheidung von Nucleobasenaddukten, die sich von der Exposition mit kanzerogenen Substanzen herleiteten. Dem folgte die Identifizierung eines Guaninaddukts des Benzo[*a*]pyren-7,8-diol-9,10-oxids im Urin (Astrup & Seremet 1986) bzw. Faeces (Tierney *et al.* 1987) von Versuchstieren nach Behandlung mit Benzo[*a*]pyren. Inzwischen wurde die quantitative Bestimmung des Aflatoxin B1-Guanin-Adduktes erfolgreich in epidemiologischen Studien eingesetzt (Ross *et al.* 1992; Qian *et al.* 1994).

Die Ausscheidung der Alkylpurine ist ein indirekter Hinweis auf die Resistenz modifizierter Nucleobasen gegenüber katabolischen Enzymen, die in den Purin-Metabolismus involviert sind. Mehrere Studien konnten zeigen, dass 7-Methylguanin und 3-Methylguanin unabhängig vom Applikationsweg unverändert ausgeschieden werden (Craddock & Magee 1967; Hanski & Lawley 1985; Shuker *et al.* 1987). Ebenso fand Frandsen (1997), dass das Guanosinaddukt von 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) in der Ratte zum großen Teil unverändert ausgeschieden wird.

Aufgrund der extrem kleinen Mengen der Nucleobasen- bzw. Nucleosidaddukte, die realistischer Weise renal oder biliär ausgeschieden werden, ist deren Nachweis stets mit hohem analytischen Aufwand verbunden. Aus dem gleichen Grund wurden

bislang nur wenige Nucleobasenaddukte identifiziert. Dadurch, dass sie die Primärschäden der DNA reflektieren, werden sie als nicht-invasive substanzspezifische Biomarker der Zukunft angesehen.

1.2.4 Die Bedeutung der Mercaptursäuren und der Nucleobasenaddukte als Biomarker

Die Etablierung von Mercaptursäuren und Basenaddukten als Biomarker hat einen besonderen Stellenwert im Biomonitoring. Zunächst sind Mercaptursäuren und Nucleobasenaddukte substanzspezifisch. Sie beinhalten die chemische Struktur des genotoxischen Agens und eignen sich daher zur Dekuvrierung von genotoxischen Substanzen, die für bestimmte Individuen oder Populationen eine Belastung darstellen. Bei Belastung mit bekannten Substanzen können Mercaptursäuren und Nucleobasenaddukte zur Einschätzung der internen Dosis eingesetzt werden. Durch die rasante Entwicklung der instrumentellen Analytik ist die Erfassung renal ausgeschiedener Mercaptursäure von bestimmten Substanzen in den letzten Jahrzehnten mehr und mehr zur Routine geworden (van Welie *et al.* 1992). Die Bestimmung der Ausscheidung von Nucleobasenaddukten dagegen steht noch am Anfang. Wegen der Herkunft der beiden Verbindungsklassen wurde ihre Anwendung zur Bestimmung der effektiven Dosis diskutiert (van Welie *et al.* 1992; Legator *et al.* 1993). Darüber hinaus könnten renal ausgeschiedene Mercaptursäuren und Nucleobasenaddukte als Biomarker zur Einschätzung der individuellen Suszeptibilität eingesetzt werden. Dieser Aspekt ist in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung und wird deshalb im Folgenden detailliert dargelegt.

Bei der Betrachtung der Toxizität einer Substanz sollten neben der eigentlichen Reaktivität auch die im Wesentlichen daran beteiligten Prozesse der metabolischen Aktivierung bzw. Inaktivierung berücksichtigt werden. Dabei wird die effektive Konzentration im Zielgewebe durch die Balance zwischen toxisierenden und detoxifizierenden Prozessen bestimmt, die wiederum von der Kapazität und Aktivität der beteiligten Enzyme, der Verfügbarkeit der Cofaktoren sowie der Transportvorgänge beeinflusst werden. Hierbei können bereits geringfügige Veränderungen (z.B. genetische Polymorphismen) die Empfindlichkeit von Versuchstieren aber auch von Menschen gegenüber toxikologischen Wirkungen

vorgegebener Stoffe verändern. Im Bereich der Arzneimittel sind diese Zusammenhänge Gegenstand der Pharmakogenetik. Der gleiche Nexus existiert auch bei der Exposition gegenüber Umweltstoffen, deren Besonderheiten häufig in der niedrigen Expositionsmenge und der langen Expositionsdauer liegen. Überdies ist eine schwer kalkulierbare Koexposition möglich, die das Gleichgewicht der Toxifizierung und Detoxifizierung beeinflussen kann. Die Bildung und Ausscheidung von Mercaptursäuren und Nukleobasenaddukten spiegeln die toxifizierenden und detoxifizierenden metabolischen Aktivitäten wider und können deshalb zur Erfassung substanzabhängiger, genetisch bedingter Suszeptibilitäten verschiedener Individuen angewendet werden.

In neuen Forschungsansätzen zur Beurteilung eines Zusammenhanges zwischen einer Krankheit und einer bestimmten Substanzgruppe wurde nicht nur die Expositionshöhe der Erkrankten und Nichterkrankten verglichen, sondern auch deren substanzbezogenen genetischen Dispositionen. Die Bestimmung der ausgeschiedenen Mercaptursäuren bzw. Nukleobasenaddukte eröffnet neue nicht-invasive Möglichkeiten, neben den indirekten Assoziationen der klassischen Epidemiologie auch kausale Zusammenhänge herzustellen.

1.3 1-Methylpyren (MP) und 1-Hydroxymethylpyren (HMP)

Im Zentrum dieser Arbeit steht HMP, ein Metabolit des Hepatokanzerogens MP. MP wurde von Kruber & Grigoleit (1954) erstmals in Steinkohlenteer entdeckt. Weitere Quellen der Substanz sind Zigarettenrauch-Kondensat, Autoabgase und Cellulosepyrolysat (Kubota *et al.* 1975, Yu & Hites 1981)

MP ist bei Zugabe von S9-Mix als externem Aktivierungssystem im Ames-Test mutagen (Rice *et al.* 1988). Es induziert Lebertumoren in neugeborenen männlichen Mäusen (Rice *et al.* 1987).

In vitro wird MP an verschiedenen Positionen durch Cytochrom P450-Enzyme oxidativ umgesetzt. Die Produkte der Oxidation sind Phenole des MP bzw. des HMP. In einer *in vitro* Untersuchung mit mikrosomaler Fraktion der Rattenleber wurden

neben Phenolen auch Dihydrodirole und Chinone des MP identifiziert (Abb. 1.4) (Rice *et al.* 1988). Wichtige humane CYP, z.B. 3A4, 1B1 und 2E1, haben eine ausgeprägte Präferenz (> 80 % der gesamten Metaboliten) für die Bildung von HMP, während CYP der Ratte auch Oxidationen am Ringsystem katalysieren (Engst *et al.* 1999).

HMP wirkt als Initiator und Promotor für die Bildung von ATPase-defizienten Leberfoci in weiblichen bzw. neugeborenen Ratten (Glatt *et al.* 1994c). Darüber hinaus ist HMP ein Substrat für verschiedene Sulfotransferasen (SULT). Das Sulfonierungsprodukt, 1-Sulfooxymethylpyren (SMP), wurde *in vitro* als Metabolit des HMP identifiziert (Landsiedel 1998). Die SULT katalysierte O-Sulfonierung kann bioaktivierend wirken (Abb. 1.4). Die Sulfatester allylischer bzw. benzyllischer Alkohole und aromatischer Hydroxylamine sind starke Elektrophile, die bevorzugt über einen S_N1 Mechanismus mit der DNA reagieren. Die Reaktion ist dadurch besonders begünstigt, dass die Sulfatgruppe eine gute Abgangsgruppe darstellt und dass das entstehende Kation überdies mesomeriestabilisiert ist (Boberg *et al.* 1983; Glatt 1997; 2001). SULT werden in der Ratte vor allem in Parenchymzellen der Leber exprimiert (Glatt *et al.* 1990). Dementsprechend wurde bei *in vitro* Inkubationen mit HMP in Leberparenchymzellen eine um das 10- bis 200-fach höhere DNA Addukthäufigkeit gefunden als in Endothelzellen oder Kupfferzellen (Monnerjahn *et al.* 1993). Auch humane SULT konjugieren HMP. Im Menschen sind SULT weniger stark auf die Leber konzentriert als bei der Ratte. Hohe Proteinexpression und Enzymaktivität der SULT1A3 wurden z.B. in der Mucosa des Jejunums und des Colons gefunden (Teubner *et al.* 1998; Eisenhofer *et al.* 1999; Glatt, 2001). Das Protein und die RNA der SULT4A1 wurde sogar nur im Gehirn identifiziert (Falany *et al.* 2000). Für mehrere dieser humanen SULT (insbesondere 1A1, 1E1 und 2A1) wurde die Fähigkeit, HMP zu aktivieren, nachgewiesen (Glatt *et al.* 1995; 1998). In der Abbildung 1.4 sind die oben beschriebenen Wege der Sequestrierung und Bioaktivierung von MP zusammengefasst.

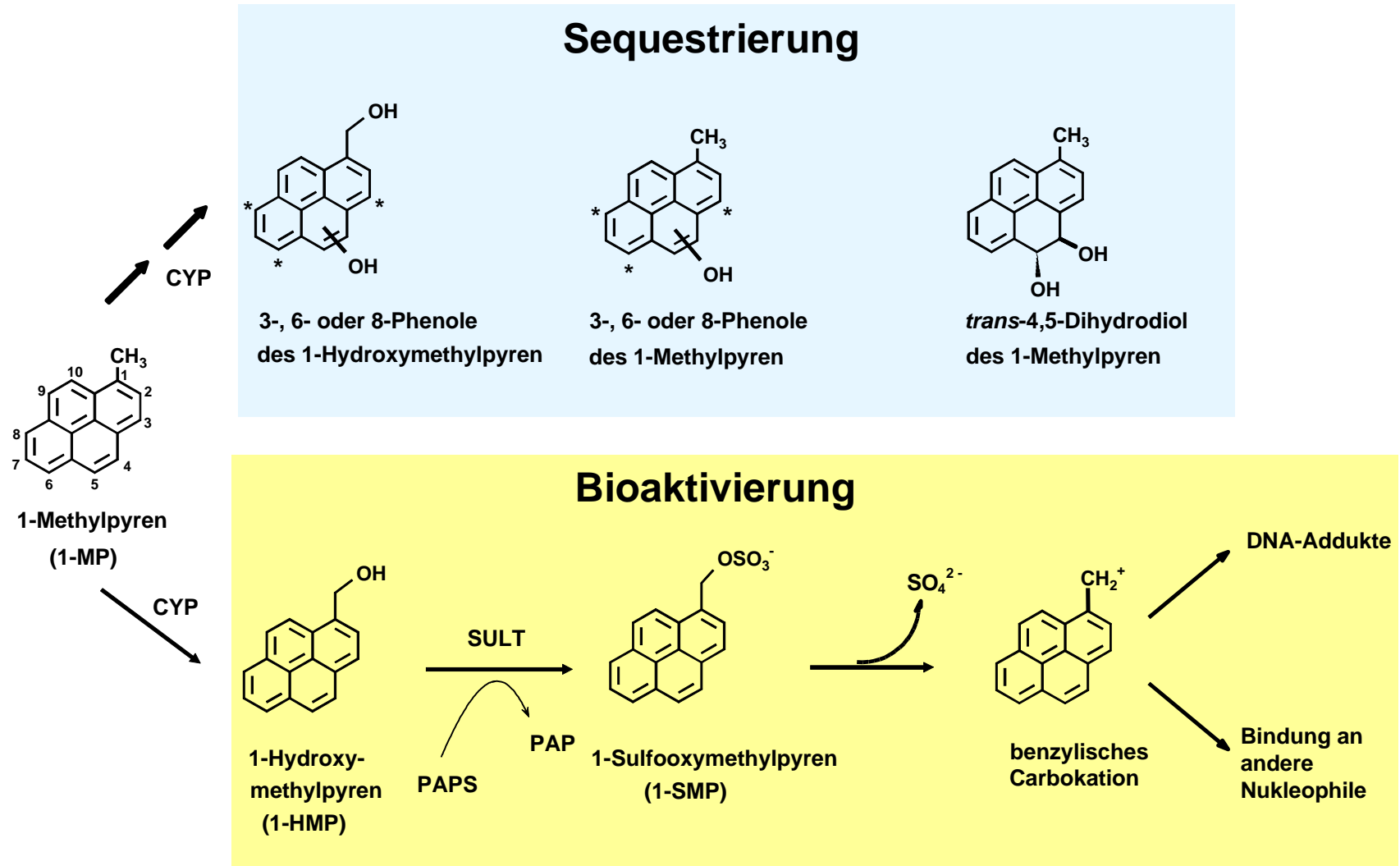


Abbildung 1.4 Die Sequestrierung und Bioaktivierung von 1-Methylpyren. *: mögliche Position der Hydroxylgruppe am Pyrenring. (In Anlehnung an Rice *et al.* (1988). CYP: Cytochrom P450; PAPS: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat; PAP: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat, SULT: Sulfotransferase)

1.4 Fragestellung

Chemisch spezifische Biomarker wie Mercaptursäuren und Nucleobasen- bzw. Nucleosidaddukte können helfen, das toxische Potenzial von Substanzen zu erkennen. Während Mercaptursäuren die Detoxifizierung durch Glutathion repräsentieren, dokumentieren Nucleobasen- und Nucleosidaddukte parallel dazu das Auftreten eines Primärschadens in der DNA.

Im Hinblick auf die übergeordnete Fragestellung, ob sich Mercaptursäuren und Nucleobasen- bzw. Nucleosidaddukte als Biomarker für MP eignen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Ausscheidung von *N*-Acetyl-S-(1-methylpyrenyl)-L-cystein, der Mercaptursäure des SMP, und die Ausscheidung des *N*²-(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosins, eines möglichen Abbauproduktes des DNA-Adduktes von SMP, in der Ratte nach Applikation von HMP und MP untersucht werden.

Ideale Biomarker reagieren empfindlich auf Veränderungen der toxifizierenden bzw. detoxifizierenden Systeme. Ob die zu untersuchende Mercaptursäure und das Nucleosidaddukt diese Eigenschaft besitzen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Dazu war es notwendig, zu erkennen, welche Stoffwechselforgänge maßgeblich an der Detoxifizierung und Elimination des HMP beteiligt sind. Das erforderte umfassende Untersuchungen zum Metabolismus von HMP. Basierend auf den Ergebnissen der Metabolismusuntersuchungen können die detoxifizierenden Stoffwechselforgänge moduliert werden (z.B. durch Nahrungs- bzw. Genussmittel oder Medikamente), um herauszufinden, ob a) die Störung der Detoxifizierung die Bildung von Primärschäden begünstigt und b) ob die oben beschriebenen Biomarker die Änderung widerspiegeln.

2. Experimenteller Teil

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tandem-Massenspektrometer mit Atmosphärendruck-Ionisation: Triple Quadrupol Quattro II mit Elektrosprayionisation (ESI) und chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI), Steuerprogramm Masslynx Version 2.2-3.1 (Micromass, Altonham, UK), Infusionspumpe Harvard 22 (Harvard, South Natic, USA)

Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor: Gaschromatograph 5890 Series, massenselektiver Detektor 5972 Series, Autosampler 7673, Steuerprogramm MS Chemstation Version C.01.05 (Hewlett Packard, Palo Alto, USA)

HPLC-Anlage I: Waters Alliance separation module 2690, Photodiodenarray (PDA)-Detektor Waters 996, Fluoreszenzdetektor Waters 474, Steuerprogramm Millennium Version 3.10 / Millennium 32 (Waters, Eschborn)

HPLC-Anlage II: Hochdruckpumpe PU 980, Niederdruckmischer LG980-04, Autosampler 851AS, Photodiodenarray-Detektor MD-910, Steuerprogramm Borwin PDA Version 1.50 (Build 12) (Jasco, Groß-Umstadt), Radiodurchflussdetektor A-500, Durchflusszelle 0,5 ml, Steuerprogramm FLO-ONE für Windows Version 3.61 (Canberra-Packard, Dreieich)

HPLC-Anlage III: Waters Alliance separation module 2690, Photodiodenarray Detektor Waters 996, Interface zum Massenspektrometer (Quattro II), Steuerprogramm Masslynx Version 3.10 build 004 (1998) (Waters, Eschborn)

Präparative HPLC Anlage: Hochdruckpumpe HD200, UV-Detektor Labcord-200, Schreiber Labomatic BR-200 (Labomatic, Schönbuch, Schweiz)

Szintillationszähler: LS 6500 (Beckman, Fullerton, USA)

Spektralphotometer Ultrospec Plus (LKB Biochrom, England)

Zentrifuge Eppendorf 5402 (Eppendorf, München)

Zentrifuge SIGMA 4K10 (Braun Biotech, Eschwege)

Ultrazentrifuge J2-MI Beckman (Coulter Electronics, Krefeld)

Vakuumpkonzentrator: Speed Vac Concentrator SC 110 mit Kühlfalle RVT 100 (Savant Instruments, Holbrook NY, USA) und Vakuumpumpe RS15 (Brand, Wertheim)

Vakuumpkonzentrator: Speed Vac Plus Concentrator SC 210A mit Kühlfalle *RVT 4104*

Vakuumpumpe VLP200 (Savant Instruments, Holbrook NY, USA)

Ultra-Turax T25 (IKA Labortechnik, Staufen)

Inkubationsblock: Thermomixer 5436 (Eppendorf, München)

Thermostat: Eppendorf 5320 (Eppendorf, München)

Instantlmager (Canberra Packard, Meriden, USA)

2.1.2 Chemikalien

Für die Analytik wurden ausschließlich Lösungsmittel mit HPLC-Qualität von Riedel de Haën (Seelze) und Merck (Darmstadt) verwendet.

Für die LC-MS-Analyse wurden die Reinstgase Stickstoff und Argon verwendet. Hoch reines Helium kam in der GC-MS-Analyse zum Einsatz und wurde auch zur Entgasung von Lösungsmitteln für die HPLC benutzt. Das Spülgas für den Instantlmager setzte sich aus 96,5 % Argon, 1 % Isobutan und 2,5 % CO₂ zusammen. Alle Gase wurden von der Firma Linde (München) geliefert.

Alle anorganischen Säuren, Laugen und Salze im Gebrauch waren mindestens von *p.a.* Qualität und wurden von Merck (Darmstadt), Fluka (Deisenhofen) oder Sigma Chemie (Deisenhofen) bezogen.

N-Acetylcystein (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Ammoniumhydroxid, volumetrischer Standard 5,02 M (Sigma Chemie, Deisenhofen)

ATP-Dinatriumsalz (Sigma Chemie, Deisenhofen)

γ -³²P-ATP, End Labeling Grade, >7000 Ci / mmol (ICN Biomedicals, Eschwege)

1-Formylpyren (Sigma Chemie, Deisenhofen)

¹⁴C-1-Formylpyren, 2,1 GBq/mmol (NEN, Boston, USA)

Glutathion (red.) (Merck, Darmstadt)

Gewebelöser Solvable (Canberra Packard, Dreieich)

1-Hydroxymethylpyren (Sigma Chemie, Deisenhofen)

N^2 -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG) wurde von Herrn Dr. Seidel

(Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf) zur Verfügung gestellt.

Methylierungsreagenz: TMSH (Trimethylsulfoniumhydroxid, 0,2 M in Methanol)

(Machery-Nagel, Düren)

Natriummethylat (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Protein-Bestimmungskit (Pierce, Rockford, USA)

Pyrencarbonsäure (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Roti-Phenol (Roth, Karlsruhe)

Roti-Phenol/Chloroform (Roth, Karlsruhe)

Silylierungsreagenz: SIL 991 (*N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid + Trimethylchlor-silan 99 + 1 v/v) (Machery-Nagel, Düren)

Szintillationscocktail Hionik-Fluor (Canberra Packard, Dreieich)

Szintillationscocktail für Radiodurchflussdetektoren Ultima Flo AF (Canberra Packard, Dreieich)

Thionylchlorid zur Synthese (Fluka, Deisenhofen)

Trinatrium UDP-Glucuronsäure (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Dinatrium UDP-*N*-Acetylglucosamin (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Es wurde Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit $< 1 \mu\text{S cm}^{-1}$ benutzt.

Des Weiteren wurden folgende Lösungen verwendet:

AF-Puffer, pH 3,5: 50 mM Ammoniumformiat, mit Ameisensäure auf pH 3,5 eingestellt.

Citratpuffer, pH 1,9: 8,43 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,58 g NaCl und 8,2 ml 1 M Salzsäure je Liter

Homogenisierungspuffer: 0,25 M Saccharose, 0,3 M EDTA, pH 7,5

PBS-Puffer: 80 g NaCl, 29 g Na_2HPO_4 , 2 g KCl und 2 g KH_2PO_4 je Liter

Phosphatpuffer: 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,4

Saccharose-PE-Puffer: 20 % Saccharose, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5

1,5 M Saccharoselösung: 1,5 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7,5

1 M Saccharoselösung: 1,0 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl, 6 mM EDTA, pH 7,5

2.1.3 Enzyme

Apyrase aus Kartoffeln, Grade I (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Micrococcus Endonuklease aus *Staphylococcus aureus* (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Phosphodiesterase II aus Kalbsmilz (Boehringer, Mannheim)

Proteinase K aus *Tritirachium album* (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Nuklease P1 aus *Penicillium citrinum* (Sigma Chemie, Deisenhofen)

T4 Polynukleotid Kinase (Stratagene Europe, Amsterdam, NL)

Sulfatase Typ H-2 mit Glucuronidaseaktivität 0,4 U/µl Sulfatase, 1 U/µl Glucuronidase (Sigma Chemie, Deisenhofen)

2.1.4 Biologisches Material: Cytosol, Mikrosomen und Mitochondrien aus Geweben

Cytosole wurden durch Homogenisierung und Zentrifugieren nach der von Glatt *et al.* (1994a) beschriebenen Methode gewonnen. Das Pellet des letzten Zentrifugierens der Cytosolgewinnung ist die Mikrosomenfraktion. Es wurde einmal mit Phosphatpuffer gewaschen. Zur Entfernung von niedermolekularen Substanzen (Cofaktoren) wurden Cytosole 3 x 2 h gegen Phosphatpuffer dialysiert (4 °C). Anschließend wurden sie portioniert und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Mitochondriengewinnung wurden nach Dekapitation und Entblutung der Ratten die Lebern entnommen, mit physiologischer NaCl-Lösung (0,9 %) ab gespült, auf Filterpapier abgetupft und gewogen. Die weitere Verarbeitung erfolgte unter Eiskühlung bzw. bei 4 °C in Zentrifugen. Portionen von 2 g Leber wurden mit 6 ml Homogenisierungspuffer mit einem Glashomogenisator mit Teflon-Stempel manuell homogenisiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation (700 x g, 4 °C, Sigma 4K10) des Homogenats wurde der Überstand entnommen und bei 9000 x g für weitere 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und bei 11180 x g für 25 min zentrifugiert (Sigma 4K10). Dieser Vorgang wurde noch ein Mal wiederholt. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 2 Volumen Saccharose-PE-Puffer suspendiert. 1,5 ml der Suspension wurden vorsichtig auf 5 ml einer 1,5 M Saccharoselösung gegeben und mit 5 ml einer 1 M Saccharoselösung überschichtet. Die Gewinnung der Mitochondrienfraktion erfolgte über Zentrifugation

bei 100000 x *g* (Beckman L60-Ultrazentrifuge, Rotor SW41-Ti) für 30 min. Die Mitochondrienfraktion sammelte sich zwischen den beiden Saccharoselösungen. Die Mitochondrien wurden abgenommen und einem Waschvorgang unterzogen. Dazu wurden die Pellets im 6-fachen Volumen Homogenisierungspuffer resuspendiert und bei 11180 x *g* (Sigma 4K10) für 20 min zentrifugiert. Die so gereinigten Mitochondrien wurden mit etwa 2,5 ml Homogenisierungspuffer verdünnt und in 250 µl Portionen in 0,5 ml-Reaktionsgefäße portioniert. Diese wurden sofort bei -80° C eingefroren und aufbewahrt.

2.2 Gewinnung von Standardsubstanzen

2.2.1 Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA)

245 mg HMP (1,056 mmol) wurden in 10 ml Chloroform gelöst und auf Eis gekühlt. Die Lösung wurde unter Rühren mit 1 ml Thionylchlorid (13,7 mmol) in 10 ml Chloroform versetzt. Dabei entstand 1-Chlormethylpyren (CMP). Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 2 ml Chloroform aufgenommen (CMP-Lösung).

400 mg *N*-Acetylcystein, gelöst in 5 ml Methanol, wurden zu einer Natriummethylat-Lösung (220 mg in 5 ml Methanol) zugegeben und bei Raumtemperatur für 15 min gerührt. CMP-Lösung wurde unter Rühren langsam zugetropft. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Dafür wurden Kieselgel 60 Platten (10 x 10 cm, Merck) verwendet. Das Laufmittel bestand aus Dichlormethan, Methanol und Eisessig (40 + 4 + 1, v/v/v). Die Detektion erfolgte nach Knight & Young (1958). Dazu wurden die Platten nacheinander mit einer 0,1 M K₂Cr₂O₇-Eisessig-Lösung (1 + 1, v/v) und einer 0,1 M AgNO₃-Lösung besprüht und anschließend für 10 min bei 80 °C belassen. Das Produkt erschien als gelber Fleck auf rotbraunem Hintergrund.

Zur Reinigung des Produktes wurden 7 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben. Zu der sich bildenden Emulsion wurde so lange Wasser zugegeben, bis eine Phasentrennung erfolgte. Die Chloroformphase wurde mittels eines Scheidetrichters abgetrennt. Die Wasserphase wurde noch zweimal mit 25 ml Chloroform gewaschen. Die vereinigten Chloroformphasen wurden über MgSO₄ getrocknet und bis zur Trockene eingengt. Die Kristallisation erfolgte aus Chloroform / Ether. Es wurden 28

mg MPMA erhalten. Die Ausbeute betrug somit 7 % bezogen auf das eingesetzte HMP. Der Strukturnachweis sowie die Reinheit der Substanz sind im Abschnitt 3.1.1 beschrieben.

2.2.2 Glutathion-S-Konjugat des 1-Sulfooxymethylpyren (MPSG)

11,9 g L-(-)-Glutathion (reduzierte Form, Merck) wurden in 110 ml Methanol/Wasser (1 + 1) gelöst und mit KOH auf pH 10 eingestellt. Zu der auf 55 °C erwärmten Lösung wurden unter Argon und Rühren 4 mmol SMP, gelöst in 10 ml Acetonitril, tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h unter Argon und Rückfluss erhitzt (88°C) und dann bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Produkt wurde nach Filtration des Ansatzes massenspektrometrisch identifiziert. Zur Entfernung der organischen Lösungsmittel (Methanol und Acetonitril) wurde das Filtrat am Rotationsverdampfer bei 50 °C und 250 mbar eingengt. Die wässrige Suspension wurde anschließend mit 20 ml Wasser verdünnt und mit Essigsäure auf pH 7 neutralisiert. Die neutrale Suspension wurde mit 20% Methanol (v/v) versetzt und zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Chromatographische Bedingungen:

Säule: 2 x Waters NovaPak C₁₈ Katusche 25 x 100 mm (10 µm)

Mobile Phase: Wasser + Methanol (70 + 30, v/v)

Flow: 22 ml / min

Druck: 31 bar

Detektionswellenlänge: 344 nm

Die Fraktion zwischen 6 und 15 min wurde gesammelt. Es war eine einmalige Rechromatographie erforderlich. Die gesammelten Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingengt. Die Kristallisation erfolgt aus Wasser/Aceton. Es wurden 212 mg MPSG erhalten. Die Ausbeute betrug somit etwa 10 % bezogen auf das eingesetzte SMP. Der Strukturnachweis sowie die Reinheit der Substanz sind im Abschnitt 3.1.1 beschrieben.

2.2.3 ¹⁴C-Hydroxymethylpyren (¹⁴C-HMP)

¹⁴C-Formylpyren wurde nach der beschriebenen Methode (Autorenkollektiv 1988; Ashby *et al.* 1990) mit Natriumborhydrid reduziert. Die Fällung des Produktes erfolgte durch Zugabe von Wasser. Das Produkt ¹⁴C-HMP wurde durch zweimaliges

Umkristallisieren mit Ethanol gereinigt. Die Ausbeute betrug 50 % bezogen auf das eingesetzte ¹⁴C-Formylpyren. Die Reinheit wurde mittels HPLC und Radiodetektion (System 4) mit größer als 99,9 % bestimmt.

2.2.4 1-Methylpyren (MP)

Pyrencarboxaldehyd (PCA) wurde nach Wolff-Kižner-Huang-Minlon (Autorenkollektiv 1988) reduziert. Das Produkt wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel 60 (230-400 mesh, Merck, Darmstadt) gereinigt. Das Fließmittel war Petrolether (Merck). Die Identität und die Reinheit des Produktes wurden mittels GC-MS und HPLC-Fluoreszenz-Detektion (System 1, Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1) überprüft. Die Ausbeute betrug mehr als 80 % bezogen auf das eingesetzte PCA.

2.2.5 1-Sulfooxymethylpyren (SMP)

HMP wurde nach der beschriebenen Methode mit konzentrierter Schwefelsäure zu SMP umgesetzt (Enders *et al.* 1991). Als Kondensationsmittel diente Dicyclohexylcarbodiimid. Das Produkt wurde gemäß Landsiedel (1998) als Natriumsalz gefällt und mit Diethylether gewaschen. Die Ausbeute betrug 50 % bezogen auf das eingesetzte HMP.

2.2.6 Biosynthese von Glucuronsäurekonjugaten

Glucuronsäure-Konjugate von HMP und Pyrencarbonsäure (PCS) wurden enzymatisch durch Inkubation der entsprechenden Substrate und UDP-Glucuronsäure mit Rattenlebermikrosomen sowie UDP-*N*-Acetylglucosamin als Aktivator hergestellt. Es wurden ausschließlich Lebermikrosomen von Ratten verwendet, die mit dem Enzyminduktor Aroclor 1254 vorbehandelt worden waren. Dazu wurden Aroclor 1254 in Sonnenblumenöl gelöst (200 mg/ml) und den Ratten intraperitoneal (i.p.) verabreicht (500 mg/kg Körpermasse). 5 Tage nach der Aroclor-Applikation wurden die Tiere getötet und Lebermikrosomen gemäß 2.1.4 hergestellt. Ein Inkubationsansatz enthielt 2,325 ml Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), 1 ml UDP-Glucuronsäure (10 mM), 1 ml UDP-*N*-Acetylglucosamin (10 mM), 50 µl Magnesiumchlorid (500 mM), und 600 µl Rattenlebermikrosomen. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 25 µl Substrat (10 mM HMP bzw. PCS in DMSO) gestartet. Nach 2

Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Protein durch Zusatz von 2 ml eiskaltem Methanol gefällt und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4500 x g, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde auf eine vorkonditionierte Festphasen-Säule (Bakerbond 7020-03) gegeben und mit einem Gemisch aus Wasser/Methanol (8 + 2) gewaschen. Das Produkt wurde mit Wasser/Methanol (1 + 1) eluiert. Das Eluat wurde direkt mittels LC-MS-MS charakterisiert (System 5). Die erhaltenen Spektren dienten als Basis bei der Identifizierung der renal ausgeschiedenen Metaboliten. Es wurde zusätzlich ein entsprechender paralleler Ansatz mit ¹⁴C-HMP durchgeführt. Das gewonnene ¹⁴C-Methylpyrenylglucuronid wurde als Referenzsubstanz zur Identifizierung der nach 48 h in der Leber verbliebenen Metaboliten herangezogen.

2.3 Inkubationen

2.3.1 Bestimmung der GST-Aktivität gegenüber 1-Sulfooxymethylpyren (SMP) in cytosolischen Präparationen von Leber, Niere, Lunge und Colon der Ratte

SMP reagiert mit Glutathion, wobei das Glutathionkonjugat MPSG entsteht. Die Reaktion wird durch GST katalysiert. Zur Bestimmung der GST-Aktivität in der Ratte wurde SMP mit GSH in Gegenwart von cytosolischen Präparationen der Leber, Niere, Lunge bzw. Colon inkubiert. Bei allen Inkubationen wurde das gebildete MPSG mittels HPLC mit UV-Detektion quantifiziert (System 1, Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1).

2.3.1.1 Bestimmung der optimalen Inkubationszeit

Es wurden 50 µl GSH (10 mM in Kaliumphosphatpuffer 50 mM, pH 7,4) sowie eine 0,5 mg Protein entsprechende Menge an Cytosol mit Phosphatpuffer auf 495 µl aufgefüllt und 1 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl SMP (10 mM in DMSO) gestartet. Nach jeweils 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 und 120 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 60 µl 20 %iger Trichloressigsäure gestoppt. Nach Entfernung des Proteins durch Zentrifugation (3000 x g, 4 °C, 10 min) wurden die Metaboliten im Überstand mit System 1 analysiert (Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1). Zur Bestimmung der Leerwerte wurde SMP mit

dem Cofaktor GSH inkubiert (ohne Cytosol) und auf gleiche Art untersucht. Es konnte hierbei kein MPSG identifiziert werden.

2.3.1.2 Bestimmung des Linearitätsbereiches in Abhängigkeit von der Proteinmenge

Die oben beschriebenen Bedingungen wurden beibehalten und bei 10-minütiger Inkubationszeit die eingesetzte Proteinmenge (Abb. 7.1 im Anhang) variiert. Das Gesamtvolumen eines Inkubationsansatzes wurde durch Zugabe von Phosphatpuffer auf 500 µl konstant gehalten.

2.3.1.3 Bestimmung der Umsatzraten

Die Umsatzraten wurden im nahezu linearen Bereich bei Lungencytosol zwischen 0,01 mg und 0,05 mg Protein/ml und bei Leber-, Nieren- und Colonicytosol zwischen 0,05 und 0,2 mg Protein/ml ermittelt. Des Weiteren wurde für alle Bestimmungen der Umsatzraten eine Substratkonzentration von 100 µM und eine Inkubationszeit von 10 min festgelegt.

2.3.2 NAD⁺-abhängige enzymatische Oxidation von 1-Hydroxymethylpyren (HMP) und Pyrencyrcarboxaldehyd (PCA)

HMP wird in Anwesenheit von NAD⁺ enzymatisch zu Pyrencyrcarbonsäure (PCS) oxidiert, während die Umsetzung von PCA sowohl in An- als auch in Abwesenheit von NAD⁺ stattfindet. Bei den Untersuchungen wurde die Bildung von PCS gemessen. Dazu wurden Lebercytosol, Mikrosomen und Mitochondrien weiblicher Ratten mit HMP bzw. PCA in An- oder/und Abwesenheit von NAD⁺ inkubiert.

Zur Eingrenzung der Enzyme, die für die Oxidation von HMP bzw. PCA verantwortlich sind, wurden die diagnostischen Inhibitoren Disulfiram (Aldehyddehydrogenase), 4-Methylpyrazol (Alkoholdehydrogenase) und Ethanol (Alkoholdehydrogenase) eingesetzt.

Zur Feststellung des Zeitfensters, in dem die PCS-Bildung mit der Inkubationszeit linear anstieg, wurden (jeweils mit oder ohne Zusatz von 20 µl NAD⁺ (0,2 M)) 60 µl MgCl₂ (0,2 M) und 2,25 mg Protein entsprechende Mengen Cytosol bzw. Mitochondrien vorgelegt und mit Phosphatpuffer auf 1990 µl ergänzt. Nach

einminütiger Vorinkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 10 µl HMP oder PCA (1 mM in DMSO) gestartet und nach 0, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 min mit 250 µl 20 %iger Trichloressigsäure gestoppt. Das ausgefallene Protein wurde durch Zentrifugation (3000 x g, 4 °C, 10 min) entfernt. Der Überstand wurde zur Analyse der gebildeten PCS (System 1, Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1) eingesetzt. Zur Bestimmung der Leerwerte wurde bei HMP Cytosol ohne Cofaktor NAD⁺ inkubiert, bei PCA wurde ohne Cytosol oder mit denaturiertem Cytosol inkubiert.

Zur Bestimmung des linearen Bereiches der PCS-Bildung in Abhängigkeit von der Proteinmenge wurde unter Beibehaltung der sonstigen Bedingungen und einer zehninütigen Inkubationszeit die eingesetzte Menge an Cytosol bzw. Mitochondrien so variiert, dass die Proteinkonzentration in den Ansätzen jeweils 0, 0,2, 0,5, 0,7, 1 und 2 mg/ml betrug. Der Unterschied in den Proteinkonzentrationen zwischen den Inkubationsansätzen wurde durch Zugabe von Rinderserumalbumin (10 mg/ml in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4) auf 2 mg/ml ausgeglichen.

Zur Bestimmung der optimalen Substratkonzentration wurde diese (HMP oder PCA) bei einer Inkubationszeit von 10 min und einer Proteinmenge von 0,5 mg/ml variiert. Die gebildete PCS-Menge erreichte ab einer Substratkonzentration von 5 µM in Cytosol bzw. 1 µM in Mitochondrien ein Plateau (Substratsättigung).

Aufgrund der oben beschriebenen Untersuchungen wurden alle Bestimmungen der Umsatzrate in einer Zeitspanne von 10 min gemessen. Dabei betrug die Substratkonzentration 20 µM. Die Proteinmengen wurden so gewählt, dass sie im linearen Bereich lagen (Tab. 3.5)

2.4 Tierexperimente

2.4.1 Allgemeine Bedingungen

Als Versuchstiere wurden Ratten des Auszuchtstammes Shoe:WIST im Alter von 6-7 Wochen von der Tierzucht GmbH (Berlin-Schönwalde) bezogen und nach einer Adaptationszeit von 7 d in den Versuchen eingesetzt. Alle Versuchstiere wurden unter konventionellen Bedingungen bei einem Tag- und Nachtrhythmus von 12 h (6 Uhr/18 Uhr) gehalten. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2 °C und die

Luftfeuchtigkeit 55 %. Die Tiere bekamen die Standarddiät Altromin 1326 und Trinkwasser *ad libitum*.

2.4.2 Bestimmung von Methylpyrenyl-Mercaptursäure (MPMA) in Plasma, Urin und Faeces nach Applikation von 1-Hydroxymethylpyren (HMP)

2.4.2.1 MPMA-Plasmakonzentration

Weibliche Ratten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5, 0,75, 3, 12 und 24 h) nach Verabreichung des HMP (einmalig i.p., 0,25 mmol/kg KM) durch Dekapitation getötet. Die Tiere wogen zum Zeitpunkt des Versuchs zwischen 170 und 200 g und wurden zufällig in Gruppen zu je 3 Tieren eingeteilt. Plasmaproben un behandelter Tiere dienten als Blindwert und auch als Matrix für die Methodenentwicklung.

2.4.2.2 MPMA-Ausscheidung in Urin und Faeces

Je drei männliche und weibliche Ratten wurden in der gleichen Art und Weise behandelt, wie oben beschrieben. 16 h vor dem Versuchsbeginn wurden die un behandelten Tiere in Stoffwechselkäfige eingesetzt. Urin und Faeces, die in diesem Zeitraum gesammelt wurden, dienten als Nullproben. Für jedes Tier wurde 1 ml der Nullprobe als Negativkontrolle für die quantitative Analyse aufbewahrt. Die restlichen Nullproben wurden vereinigt und vorab für die Erarbeitung einer analytischen Methode eingesetzt. Nach der Applikation wurden Urin und Faeces nach 1,5, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 h aus den Stoffwechselkäfigen entnommen und bis zur Analyse bei -40 °C aufbewahrt.

2.4.3 Bestimmung von Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) in Rattenurin nach Applikation von 1-Methylpyren (MP)

Drei männliche Ratten wurde mit MP (0,25 mmol/kg KM, 0,5 M gelöst in DMSO) behandelt. Die Applikation erfolgt einmalig intraperitoneal (i.p.). Nach der Behandlung wurden die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten. Der Urin wurde über 24 h gesammelt und auf MPMA untersucht (System 2; Abschnitt 2.5.1).

2.4.4 Bestimmung von Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) und N²-(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG) in Urin nach Applikation von 1-Sulfooxymethylpyren (SMP)

Um die Ausscheidung der Mercaptursäure und des Desoxyguanosinadduktes von MP zu untersuchen wurden zwei weibliche Ratten mit SMP (0,25 mmol/kg KM, 0,5M gelöst in DMSO) mittels i.p. Injektion behandelt. Blindproben wurden vor der Applikation entnommen. Nach Verabreichung der Substanz wurden die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten. Urin und Faeces wurden auf MPMA (System 2) und MPdG (System 3) untersucht (Abschnitt 2.5.1).

Die Tiere vertrugen die Substanz nicht. Sie hatten eine tägliche Gewichtsabnahme von etwa 10 g. Beide Tiere starben nach 3 d bzw. 6 d an einer hämorrhagischen Entzündung des gesamten Verdauungstraktes.

2.4.5 Erfassung der Eliminationskinetik und Bestimmung des Metabolitenmusters

Zur Erfassung der Eliminationskinetik wurde ¹⁴C-markiertes HMP eingesetzt. Die Dosis betrug 40 µmol/kg KM. Die applizierte Radioaktivität betrug 93,3 µCi/kg KM. In einem Vorversuch wurde eine männliche Ratte mit ¹⁴C-HMP in der oben angegebenen Dosis behandelt und 7 d in einem Stoffwechselkäfig gehalten. Urin und Faeces wurden in definierten Zeitabständen über den gesamten Zeitraum gesammelt und auf Radioaktivität geprüft. Nach dem Töten durch Dekapitation wurden Fettgewebe, Muskel, Leber, Niere, Lunge, Herz, Magen, verschiedene Dünndarmabschnitte, Colon, Caecum, Hoden, Milz, Gehirn und Vollblut entnommen und auf die verbliebene Radioaktivität untersucht. Anschließend wurde der Hauptversuch mit zwei männlichen und drei weiblichen Ratten mit der gleichen Dosis ¹⁴C-HMP durchgeführt. Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen wurden die Tiere nur zwei Tage nach der Applikation in Stoffwechselkäfigen gehalten. Urin- und Faecesproben wurden analog zum Vorversuch gesammelt und auf Radioaktivität untersucht. Anschließend wurden die Tieren durch Dekapitation getötet. Die oben genannten Organe wurden entnommen und nach Abschnitt 2.5.2 auf die verbliebene Radioaktivität untersucht. Urin und Faeces wurden außerdem zur Bestimmung des Metabolitenverhältnisses mittels HPLC-Radiodurchflussdetektion herangezogen (System 4; Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1).

2.4.6 Beeinflussung der Toxifizierung / Detoxifizierung durch Vorbehandlung mit Disulfiram und Ethanol

Die Tiere wurden in gleicher Weise wie in 2.4.3 beschrieben mit HMP behandelt. Abweichend wurde zwei Gruppen 12 h bzw. 10 min vor der eigentlichen Behandlung Disulfiram (75 mg/kg KM) bzw. Ethanol (0,2 g/kg KM) verabreicht (i.p.). Die Kontrollgruppe erhielt nur einmalig HMP (0,25 mmol/kg KM). Alle Tiere wurden nach der Behandlung einzeln in Stoffwechsellkäfigen gehalten. Nach 3 und 24 h wurden Tiere durch Dekapitation getötet. Die Leber wurde unmittelbar nach der Tötung entnommen. Die DNA-Addukthäufigkeit in der Leber wurde mittels ³²P-Postlabelling bestimmt. Urin und Faeces wurden auf Unterschiede im Metabolitenmuster untersucht (System 5; Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1). Es wurden pro Gruppe je vier Männchen und Weibchen untersucht. Abweichend davon bestand die Gruppe der mit Disulfiram behandelten Männchen, die nach 3 h getötet wurden, aus acht Tieren.

2.5 Analytik

2.5.1 Allgemeines

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivitäten verschiedener Enzyme wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur quantitativen Messung entsprechender Metaboliten in Urin und Faeces wurde auf eine Doppelbestimmung verzichtet, weil die interindividuellen Unterschiede der Tiere wesentlich größer waren als die Streuung bei der Messung derselben Probe. An jedem Messtag wurden Standardreihen mitgeführt und neu kalibriert. Es wurden mindestens Vierpunkt-Kalibrationen verwendet, deren linearer Korrelations-Koeffizient größer als 0,98 war.

Aufgrund der Heterogenität der analytischen Problemstellungen wurden verschiedene chromatographische Trennsysteme, kombiniert mit unterschiedlichen Detektionsmethoden, angewendet. In Tabelle 2.1 sind die verwendeten HPLC-Trennsysteme dargestellt. Die Säulenofentemperatur betrug einheitlich 30 °C. Alle verwendeten Laufmittel wurden filtriert. Die Entgasung der Lösungsmittel lief entweder über interne Entgasungssysteme ab oder durch Einleitung von Helium.

In Tabelle 2.2 sind die spezifischen Bedingungen für die Identifizierung und Quantifizierung verschiedener Metaboliten dargestellt. Der MS-Analyse war meist eine chromatographische Trennung (Tab. 2.1) vorgeschaltet. Des Weiteren galten folgende allgemeine Bedingungen: Hochreiner Stickstoff diente als Badegas (drying gas), im ESI-Modus betrug die Flussgeschwindigkeit des Badegases 400 l/h, im APci-Modus 200 l/h. Als Sprühgas (nebulizing gas) im ESI-Modus und Scheidegas (sheath gas) im APci-Modus wurde Stickstoff gleicher Qualität verwendet. Die Flussraten betragen 250 l/h bzw. 50 l/h. Für kollisionsinduzierte Fragmentierung bei MS/MS-Experimenten wurde Argon als Kollisionsgas eingesetzt. Das Gas hatte einen Vordruck von 5 bar. Die Menge des Kollisionsgases wurde substanzbezogen manuell reguliert. Als Indikator dafür diente der Gaszellulardruck (Tab. 2.2). Im Übrigen wurden die Ionenvervielfacher 1 und 2 auf 650 V gesetzt.

Tabelle 2.1 HPLC-Systeme

HPLC-System	HPLC Anlage ¹	Säule	Fließmittel	Flussrate	Gradient	Detektion
System 1	Anlage I	HP Spherosorb ODS, 250 x 4 mm, 5 µm	A: Ammoniumacetat 10 mM pH 5,5 + MeOH (9 + 1, v/v) B: Acetonitril	1 ml / min	95 % A → 10 % A in 15 min	UV (Photodiodenarray- Detektor, PDA): 200-400 nm Fluoreszenzdetektor: $\lambda_{Ex} = 273$ nm $\lambda_{Em} = 385$ nm
System 2	Anlage III	ThermoQuest HyPURITY™ Elite C ₁₈ , 50 x 2,1 mm, 5 µm	A: Ammoniumacetat 10 mM pH 5,5 + MeOH (9 + 1, v/v) B: Acetonitril	0,2 ml / min	65 % A → 5 % A in 7 min	UV (PDA): 200-400 nm ESI-MS-MS
System 3	Anlage III	Waters, Symmetrie C ₈ , 150 x 2,1 mm, 5 µm	A: Ammoniumacetat 10 mM pH 5,5 + MeOH (9 + 1, v/v) B: Acetonitril	0,6 ml / min	65 % A → 5 % A in 7 min	APCl-MS-MS oder ESI-MS-MS
System 4	Anlage II	HP Spherosorb ODS, 250 x 4 mm, 5 µm	A: Ammoniumacetat 10 mM pH 5,5 + MeOH (9 + 1, v/v) B: Acetonitril	1 ml / min	95 % A → 10 % A in 15 min	UV (PDA): 200-400 nm Radiodurchflussdetektor
System 5	Anlage III	HP Spherosorb ODS, 250 x 4 mm, 5 µm	A: Ammoniumacetat 10 mM pH 5,5 + MeOH (9 + 1, v/v) B: Acetonitril	1 ml / min	95 % A → 10 % A in 15 min	UV (PDA): 200-400 nm und ESI- bzw. APCl-MS- MS

¹ Die Bezeichnungen entsprechen der im Abschnitt 2.1.1

Tabelle 2.2 Bedingungen für LC-MS-Analysen

Name der Substanz	Ionisation	Cone (V)	Capillary (ESI) oder Corona (APCl) (kV)	Kollisionsenergie (eV)	Gaszellendruck (mbar)	Temperatur (°C) der Ionenquelle (ESI) Ionenquelle/Probe (APCl)
MPMA	ESI-	28	2,9	28	1,0e ⁻³	80
MPSG	ESI+	20	3,5	20	1,5e ⁻³	100
MPGA	ESI-	20	3,0	20	1,5e ⁻³	80
PCSGA	ESI-	30	2,8	40	3,3e ⁻³	80
SMP	ESI-	10	2,8	28	3,0e ⁻³	80
MPdG	APCl-	25	1,8	40	3,0e ⁻³	150/450

2.5.2 Analyse des ¹⁴C-Hydroxymethylpyren-Äquivalentes

Faeces- und Gewebeproben wurden mit fünf- bzw. zweifacher Gewichtsmenge Wasser versetzt und homogenisiert. Aliquote der Faeces- und Gewebehomogenate wurden durch Zugabe von 5 ml Gewebelöser (Solvable, Canberra Packard, Dreieich) und Inkubation bei 50°C (5 h) gelöst. Anschließend wurde 1 ml der Probe mit 1 ml Isopropanol (Lösungsvermittler) für weitere 5 h bei Raumtemperatur belassen. Dieser Vorgang diente zur Vermeidung der Mizellenbildung. Zwecks Entfärbung waren die Proben mit H₂O₂ (30 %) zu versetzen. Zum Abklingen der Chemilumineszenz standen die so vorbereiteten Proben über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 17 ml Szintillationscocktail (Hionik-Fluor, Canberra Packard) wurden die Proben im β-Counter (Beckmann LS 6500) vermessen.

100 µl homogenisiertes Blut wurden mit 1 ml Gewebelöser (Solvable, Canberra Packard)/Isopropanol (1 + 1, v/v) versetzt und bei 50 °C inkubiert (30 min). Des Weiteren wurden die Proben mit 0,3 ml H₂O₂ (30 %ig) entfärbt und mit 5 ml Szintillationscocktail (Hionik-Fluor, Canberra Packard) vermischt. Nach Abklingen der Chemilumineszenz (30 bis 60 min bei Raumtemperatur) wurden die Proben im β-Counter (Beckmann LS 6500) vermessen.

Nach Sedimentierung der festen Begleitstoffe wurden 100 µl Urin direkt mit 6 ml Szintillationscocktail (Hionik-Fluor, Canberra Packard) vermischt und im β-Counter (Beckmann LS 6500) gemessen.

2.5.3 Identifizierung ausgeschiedener Metaboliten

Zur Identifizierung renaler Metaboliten wurden Urinproben semipräparativ fraktioniert (System 1 in Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1). Hierzu wurden Urin und Faeces von Tieren verwendet, die mit nicht markiertem HMP behandelt worden waren. Die Fraktionen wurden mittels Rotationsverdampfer bzw. durch Gefriertrocknung von Lösungsmittel (Acetonitril und Wasser) befreit und zur weiteren Untersuchung in 500 µl Methanol aufgenommen. Die einzelnen Fraktionen wurden nochmals mittels HPLC (System 1, Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1) auf ihre Reinheit überprüft. LC-MS und GC-MS wurden zur Identifizierung der in den Fraktionen enthaltenen Metaboliten angewandt (System 5).

2.5.3.1 GC-MS-Analysen

Parallel zur LC-MS-MS wurde auch GC-MS (siehe 2.1.1) eingesetzt. Die gaschromatographische Trennung erfolgte auf einer Kapillar-Säule (Ultra 2, 5 % Phenylmethyl Siloxan, Filmdicke 0,11 µm, 25 m x 0,20 mm, Hewlett Packard, Palo Alto, USA). Hochreines Helium diente als Trägergas (1 ml/min). Der Säulenofen wurde mit einer Geschwindigkeit von 8 °C/min von 100 °C bis 280 °C erhitzt. Die Injektortemperatur betrug 250 °C. Die eluierten Analyten wurden mittels MS (Quadrupol, Elektronenstoßionisation bei 70 eV) detektiert. Für die GC-MS Analyse war es notwendig, jeweils derivatisierte (silyliert oder methyliert) und underivatisierte Proben einzusetzen.

Zur Silylierung wurde der Extrakt getrocknet und mit 20 µl DMSO, 180 µl Acetonitril (getrocknet) und 100 µl Sil 991 versetzt. Nach 1 h bei 60 °C wurde erneut bis zur Trockene eingedampft und in Methanol aufgenommen. Die Probe konnte so für die GC-MS-Analyse eingesetzt werden.

Zur Methylierung wurde 100 µl des in Methanol gelösten Extrakts mit 50 µl TMSH versetzt und direkt bei einer Injektortemperatur von 250 °C injiziert.

2.5.3.2 LC-MS-Analysen

Der zentrifugierte Urin bzw. seine Fraktionen wurden mittels HPLC getrennt und mit PDA und MS detektiert (System 5). ESI und APcl jeweils in positivem und negativem Modus wurden als Ionisationsmethoden angewendet. Für ESI war ein Splitting des Flusses nach der chromatographischen Trennung notwendig. Das Splitverhältnis betrug 5 + 1 (PDA/MS). Bei APcl wurde der Fluss direkt in die Ionenquelle geleitet und ionisiert (Tab. 2.2).

2.5.3.3 Nachweis von Konjugaten

Die entsprechende Fraktion wurde wie beschrieben vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 500 µl Phosphatpuffer gelöst (50 mM, pH 7,4) und mit 100 µl Sulfatase/Glucuronidase (Enzym-Suspension mit 400 U/100 µl Sulfatase, 1000 U/100 µl Glucuronidase) bei 37 °C 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 500 µl kaltem Methanol gestoppt. Das Protein wurde durch Zentrifugation

(3000 x g, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Der klare Überstand wurde zur LC-MS-MS-Analyse eingesetzt. Bei Verdacht auf eine phenolische Struktur des Aglykons wurde der so gewonnene Überstand zwecks Entfernung unverdauten Konjugates mittels HPLC semipräparativ fraktioniert. Die vereinigten Fraktionen wurden wie beschrieben getrocknet und in 500 µl Ammoniumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,5) aufgenommen. Von dieser Lösung wurde ein UV-Spektrum von 190 bis 400 nm gegen Ammoniumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,5) aufgenommen. Die Lösung wurde anschließend durch Zugabe von 0,1 N NaOH auf pH 9 bis 10 eingestellt. Ein weiteres UV-Spektrum (190 bis 400 nm) wurde gegen ebenfalls alkalisierten Ammoniumacetat-Puffer aufgenommen. Nach Rück-Einstellung des pH-Wertes auf 5,5 (Salzsäure, 0,1 N) wurde ein drittes UV-Spektrum gegen ebenso behandelten Ammoniumacetat-Puffer aufgenommen. Die Absorptionsmaxima der Spektren wurden verglichen. Reversible Rotverschiebung von 20 bis 30 nm in alkalischem Milieu gilt als starker Hinweis auf phenolische Strukturen. Der Test wird im Weiteren als Phenol-Test bezeichnet.

2.5.4 Quantitativer Vergleich ausgeschiedener Metaboliten

Zum quantitativen Vergleich wurden die Urin- und Faecesproben von ¹⁴C-HMP-behandelten Ratten verwendet. Urin und Faecesextrakt wurden chromatographisch getrennt, die Radioaktivität einzelner Substanzen wurde am Radioaktivitätsdetektor angezeigt (System 4 in Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1). Anhand der Radioaktivität des Peaks und der spezifischen Aktivität des applizierten ¹⁴C-HMP war eine semiquantitative Aussage über die Menge des Metaboliten möglich. Darüber hinaus ergab der prozentuale Vergleich der Radioaktivität des einzelnen Peaks mit der Gesamtradioaktivität Auskunft über die Hauptstoffwechselwege des HMP.

Die Urinproben waren nach Zentrifugation direkt zu verwenden. Zur Extraktion der in Faeces eingeschlossenen Metaboliten wurde die MSPD-Technik (Matrix Solid Phase Dispersion) angewandt. Dazu wurden 0,25 g Faeces mit 1 g losem Silicagel (Isolute MSPD C18, Separatis, Grenzach) und 50 µl Citratpuffer (pH 1,9) in einem Mörser homogenisiert, bis ein halbtrockenes, frei fließendes, homogenes Gemisch aus Probe und Sorbens entstand. Das Gemisch wurde dann in eine mit einer Fritte ausgestattete SPE-Säule gefüllt. Nachdem die gefüllte Säule durch leichten Aufschlag auf eine Oberfläche kompaktiert worden war, wurde noch eine zweite

Fritte sanft auf das Säulenbett gedrückt. Nach Waschen mit 5 ml Wasser wurden das Substrat mit 3 ml Methanol von der Säule eluiert. Das Waschwasser und das Eluat wurden jeweils mittels Szintillationszählung auf die enthaltene Radioaktivität überprüft. Die Extraktionseffizienz war größer als 95 %. Das Eluat wurde in einem Vakuumkonzentrator getrocknet und anschließend in 500 µl Methanol aufgenommen. Die klare Lösung wurde direkt für die HPLC-Analyse mit UV- und Riodurchflussdetektion (System 4 in Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1) eingesetzt. Für die chromatographische Trennung wurden jeweils 50 µl Urin bzw. 100 µl Faecesextrakt injiziert. Der Analyt erreichte zuerst den PDA-Detektor und dann den Riodurchflussdetektor, so dass ein UV-Signal und ein Radioaktivitätssignal in einem Zeitabstand von 0,5 min erzeugt werden konnten. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde die Szintillationslösung (Ultima-Flo AF) mit einer Flussgeschwindigkeit von 6 ml/min zugemischt. Die Daten wurden über 13 s akkumuliert und aktualisiert. Alle Angaben erfolgten in dpm (decays per minute).

2.5.5 Extraktion und Identifizierung akkumulierter Metaboliten der Fettgewebe

Das homogenisierte Gewebe wurde zweimal mit je 6 ml Dichlormethan 30 min geschüttelt und zur Phasentrennung anschließend zentrifugiert (4 °C, 4000 x g, 20 min). Die organische Phase wurde mittels Vakuumkonzentrator eingeeengt und in 1 ml Methanol aufgenommen. Das Fett wurde durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand wurde direkt zur HPLC-Analyse (System 4, Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1) eingesetzt. Die Extraktionseffizienz war größer als 95 %.

2.5.6 Extraktion und Identifizierung von Metaboliten in der Leber

Zur Extraktion der im Gewebe eingeschlossenen Metaboliten wurde die MSPD-Technik angewandt. Die Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben (2.5.4). Das Eluat und das Waschwasser wurden jeweils mittels Szintillationszählung auf die enthaltene Radioaktivität überprüft. Die Extraktionseffizienz war größer als 80 %. Das Eluat wurde in einem Vakuumkonzentrator getrocknet und anschließend in 500 µl Methanol aufgenommen. Die klare Lösung wurde direkt für die HPLC-Analyse (System 4, Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1) eingesetzt.

2.5.7 Extraktion, Identifizierung und Quantifizierung von Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) in Urin, Faeces und Blut

Zur Extraktion von MPMA wurden Urinproben (200-1000 µl) mit Citratpuffer auf pH 2,5 angesäuert und anschließend auf Extrelut-Säulen gegeben. Nach 10-minütiger Einwirkzeit wurden die Analyten dreimal mit 5 ml Ethylacetat eluiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurde im Vakuumkonzentrator bis zur Trockene eingengt und in 200 µl Methanol aufgenommen. Zur Abtrennung von nicht löslichen Bestandteilen wurden die Extrakte 3 min zentrifugiert (3000 x g). Der klare Überstand wurde zur LC-MS-Analyse eingesetzt (System 2 in Tab. 2.1, Tab. 2.2, Abschnitt 2.5.1).

Plasmaproben (0,25 ml) wurden mit 2 ml gesättigter Na₂SO₄-Lösung versetzt und anschließend viermal mit 2 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Ansäuerung mit Salzsäure (1 N) auf pH 1,7 bis 1,9 wurden die Proben erneut viermal mit 2 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt und in 500 µl Methanol gelöst. Diese Lösung konnte direkt zur LC-MS-Analyse eingesetzt werden (System 2 in Tab. 2.1, Tab. 2.2).

Faecesproben wurden mit einem Ultraturax in Wasser (3 ml / g) homogenisiert. 0,25 g des Homogenates wurden mit 1 M HCl (50 µl) angesäuert. Des Weiteren wurde die MSPD-Technik analog den in 2.5.4 beschriebenen Arbeitsschritten angewandt. Abweichend davon wurden die mit Proben bepackten Säulen an NH₂-Festphasensäulen (Separatis, Grenzach) gekoppelt. Die Säule wurde mit 5 ml Citratpuffer (pH 1,9) gewaschen und anschließend durch Zentrifugation bei 3000 x g (10 min) vom Waschwasser befreit. Der Analyt wurde mit 5 ml Methanol eluiert. Der Methanolextrakt wurde mittels Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt und in 200 µl Methanol aufgenommen. Die Proben wurden direkt zur LC-MS-Analyse verwendet (System 2 in Tab. 2.1, Tab. 2.2).

2.5.8 Extraktion und Identifizierung von N²-(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG) im Urin von Ratten

1 ml Urin wurde mit 4 ml 50 mM Ammoniumformiat-Puffer (AF-Puffer, pH 3,5) verdünnt und auf eine Waters Sep-Pak-Kartusche (vorkonditioniert mit 10 ml

Methanol und 10 ml AF-Puffer) gegeben. Die Kartusche wurde mit 3 ml 10 %igem Acetonitril in AF-Puffer gewaschen und mit 5 ml 80 %igem Acetonitril in AF-Puffer eluiert. Das Eluat wurde im Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingeeengt und in 200 µl Methanol gelöst. Der Extrakt wurde mittels HPLC (System 3 in Tab. 2.1) gereinigt. Die Fraktion zwischen 4 und 5 min wurde gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden erneut im Vakuumkonzentrator eingeeengt, in 50 µl Methanol gelöst und mittels LC-MS-MS untersucht (System 3 in Tab. 2.1 und Tab. 2.2).

1 g homogenisierte Faecesprobe (3 ml H₂O/g) wurde mit 8 ml Dimethylformamid-Lösung (75 %ig, in AF-Puffer) extrahiert. Nach Sedimentation der Feststoffe durch Zentrifugation (10 min, 9000 x g) wurde der Überstand entnommen. Der Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt. Der vereinigte Überstand wurde in einen Messkolben überführt und mit AF-Puffer auf 25 ml aufgefüllt. 4 ml der Lösung wurden mit 16 ml AF-Puffer versetzt und wie bei den Urinproben auf eine Waters Sep-Pak Kartusche geladen, gewaschen und eluiert. Das Eluat wurde gemäß dem Verfahren für Urinproben angereichert und analysiert.

2.5.9 Bestimmung der DNA-Addukt-Häufigkeit mittels ³²P-Postlabelling

Kovalente Modifikationen der DNA können mittels ³²P-Postlabelling untersucht werden. Die Methode basiert auf der spezifischen Markierung adduktierter Nukleotide durch eine ³²P-Phosphatgruppe an der 5'-Position, der Trennung durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie und anschließender Detektion der β-Strahlung.

2.5.9.1 DNA-Isolierung

Gewebe der zu untersuchenden Organe wurde homogenisiert. Ein Aliquot des Gewebehomogenates wurde zur DNA-Gewinnung eingesetzt. Die Isolierung der DNA wurde in Anlehnung an das Standard-Phenol-Extraktions-Verfahren (Marmur 1961) mit einigen Modifikationen durchgeführt (Gupta 1984). Zur Konzentrationsermittlung der DNA-Lösung wurde die Extinktion bei 260 nm bestimmt ($E_{260\text{nm}} = 1$ entspricht 50 µg/ml DNA). Der Quotient $E_{260\text{nm}} / E_{280\text{nm}}$ erlaubt Aussagen über die Reinheit der DNA-Lösung. Ein Wert von 1,8 zeigt RNA- und Proteinfreiheit an. Werte außerhalb dieses Bereiches sprechen für eine RNA- (> 1,8) bzw.

Proteinkontamination ($< 1,8$). Bei sehr kleinen DNA Konzentrationen ($E_{260\text{nm}} < 0,02$) wurde die DNA-Extraktion erneut durchgeführt, da niedrige Extinktionen keine verlässlichen Aussagen über die Qualität der DNA erlauben.

2.5.9.2 ^{32}P -Postlabelling

1 μg DNA wurden 1 h mit den Enzymen Micrococcus Endonuklease und Kalbsmilz-Phosphodiesterase bei 37°C zu Mononukleotiden verdaut. Die Zusammensetzung des Verdaumixes ist im nächsten Abschnitt beschrieben. Des Weiteren wurden die adduktierten Mononukleotide angereichert, indem die Normalnukleotide durch Nuklease P1 zu Nukleosiden abgebaut wurden. Dem Nuklease P1-Verdau folgte die selektive Markierung mit $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP. Dabei wurde das ^{32}P -Phosphat des ATP an die 5'-Hydroxylgruppe der adduktierten 3'-Phosphomononukleotide überführt. Das Enzym T4 Polynukleotidkinase katalysierte die Reaktion. Überschüssiges $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP wurde durch anschließende Apyrase-Behandlung abgebaut. Die detaillierten Bedingungen der Inkubationsansätze sind hier zusammengefasst:

DNA-Verdau:	1 h, 37°C
1,2 μl	Micrococcus Nuklease (120 μU) + Kalbsmilz-Phosphodiesterase II (4 mU)
0,8 μl	CaCl_2 (8 mM) / Natriumsuccinat Puffer (17 mM, pH 6,0)
2,8 μl	H_2O
NP1-Verdau:	1 h, 37°C
0,96 μl	Nuklease P1 (1,2 μg)
1,44 μl	ZnCl_2 (0,1 mM)
2,4 μl	Natriumacetat-Puffer (125 mM, pH 5,0)
Enzymstopp:	10 min, Raumtemperatur
1,9 μl	Tris (0,92 M)
Postlabelling:	30 min, 37°C
1 μl	Kinase-Puffer bestehend aus 100 mM Bicin, 50 mM MgCl_2 , 50 mM Dithiothreitol, 5 mM Spermidin, pH 8,5
0,6 μl	T4-Polynukleotidkinase (6 U)
50 μCi	$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP
Abbau ATP:	30 min, 37°C
2 μl	Apyrase (40 mU)

Das enzymatische Postlabelling-Protokoll entspricht weitgehend der aktuellen Empfehlung von Phillips & Castegnaro (1999). Die adduktierten Nukleotide wurden mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie an Polyethylenimin-imprägnierten Celluloseplatten (0,1 mm Schichtdicke, Machery-Nagel, Düren) getrennt (Kuhlow 2001). Folgende Chromatographiesysteme wurden benutzt: (D1) 1,0 M Natriumphosphat pH 6,0; (D3) 3,5 M Lithiumformiat; 8,5 M Harnstoff pH 3,5; (D4) 0,8 M Lithiumchlorid; 0,5 M Tris/HCl; 8,5 M Harnstoff pH 8,0; (D4+) 1 M Ammoniumhydroxid.

Die Adduktstellen wurden mit Hilfe des Instantmager visualisiert und quantifiziert. Die Addukt-Häufigkeit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{fmol Addukte} / \mu\text{g DNA} = \frac{\text{Addukt Radioaktivität (dpm} / \mu\text{g DNA)}}{\text{Spezifische Aktivität des } \gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP (dpm} / \text{fmol)}}$$

1 fmol / $\mu\text{g DNA}$ entspricht 33 Addukten pro 10^8 Nukleotide.

3. Ergebnisse

3.1 Mercaptursäure- und Nukleosidaddukt-Ausscheidung als Resultat der Bioaktivierung von 1-Hydroxymethylpyren (HMP) zu 1-Sulfooxymethylpyren (SMP)

Die Modifikation der DNA ist das Schlüsselprinzip der Kanzerogenese. SMP bildet mit der DNA vor allem Addukte an der exozyklischen Aminogruppe des Guanins, in geringerem Ausmaß auch an der exozyklischen Aminogruppe des Adenins (Monnerjahn *et al.* 1993). Die biologische Konsequenz der DNA-Bindung können Mutationen sein (Kokontis *et al.* 1993). Adduktierte DNA kann durch Reparaturmechanismen oder Zelltod zu Nukleosid- bzw. Nukleobasenaddukten abgebaut und ausgeschieden werden. Bei Substanzen wie Benzo[a]pyren und Aflatoxin B1 konnten Basenaddukte im Urin exponierter Personen identifiziert werden (Qian *et al.* 1994, Casale *et al.* 2001). Reaktive Sulfatester reagieren nicht nur mit der DNA, sondern in viel stärkerem Maß mit anderen zellulären Nukleophilen wie GSH, das in hoher Konzentration (1 bis 10 mM) in der Zelle vorhanden ist. Einige benzyllische Sulfatester werden z.B. durch die GST Yrs'-Yrs' und Yrs-Yrs' der Ratte, Enzyme der GST T Familie, besonders effizient zu entsprechenden GSH-Konjugaten metabolisiert (Hiratsuka *et al.* 1994). GSH-Konjugate werden von der Ratte im Allgemeinen zur entsprechenden Mercaptursäure abgebaut und ausgeschieden.

Auf diesen Kenntnissen basierend lässt sich postulieren (Abb. 3.1), dass die Ausscheidung der Mercaptursäure des 1-Methylpyrens (MPMA) und des Guanosin-Adduktes N^2 -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG) das Ausmaß der Bioaktivierung (die Bildung des reaktiven Sulfatesters) reflektiert. Dabei stellt die Menge an MPMA den Anteil der Detoxifizierung des SMP dar, während MPdG im Wesentlichen den Umfang der DNA-Schädigung widerspiegelt. Vorausgesetzt wird hier die effektive Konjugation des SMP mit GSH und die effektive Ausscheidung des MPdG.

Es sollte daher zunächst untersucht werden, ob eine enzymatische GSH-Konjugation des SMP in der Ratte stattfindet und wie hoch der Anteil ist, der zum Glutathion-S-Konjugat des 1-Methylpyrens (MPSG) umgesetzt wird. Die GST-Aktivität gegenüber

SMP in cytosolischen Präparationen von Leber, Lunge, Niere und Colon beider Geschlechter wurde bestimmt. In anschließenden Tierversuchen wurden Ratten mit SMP, HMP und schließlich MP behandelt. In Urin und Faeces der behandelten Tiere wurde die Ausscheidung des MPdG und der MPMA hinsichtlich Menge und Ausscheidungszeitraum untersucht. Die Ergebnisse sollten einen Einblick in Art und Umfang der Bioaktivierung geben. Dazu wurden Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung der entsprechenden Metaboliten mittels LC-MS-MS entwickelt.

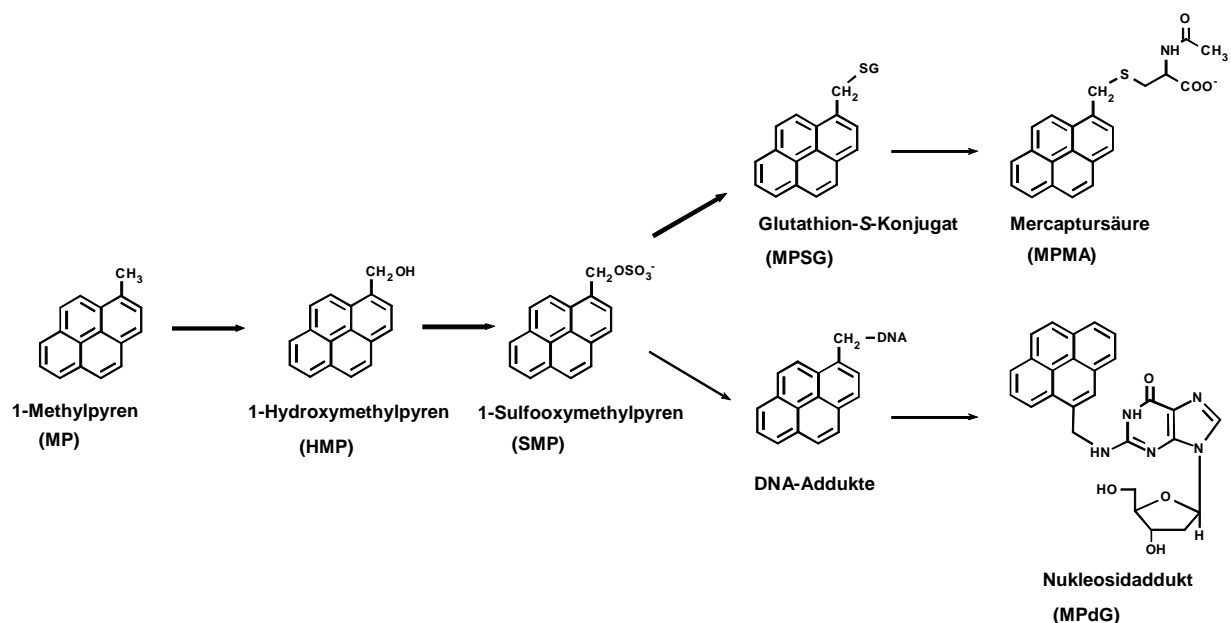


Abbildung 3.1 Hypothetischer Bioaktivierungsweg des MP über HMP und SMP.

3.1.1 Nachweis des Glutathion-S-Konjugates (MPSG), der Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) und des N^2 -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosins (MPdG)

MPSG wurde gemäß 2.2.2 synthetisch hergestellt. Das gereinigte Produkt wurde im MS-MS-Experiment untersucht. Dazu wurde die gelöste Substanz (1 ng/ μ l in Wasser-Acetonitril 1+1 (v/v) mit 0,1 % Ameisensäure) mittels ESI im positiven Modus ionisiert. Bei einer Ionisierungsenergie (Cone) von 30 V wurde die Substanz nur wenig fragmentiert. Sie zeigte im ersten Massendetektor ein Molekülion m/z 523. Durch kollisionsinduzierte Fragmentierung wurde ein Tochterionenspektrum des Molekülions m/z 523 im zweiten Massendetektor erhalten (Abb. 3.2). Die Entstehung

der Tochterionen m/z 148, m/z 215, m/z 486, m/z 504 und schließlich m/z 523 werden im dort gezeigten Fragmentierungsschema erläutert. Die Identität des MSPG gilt hiermit als bestätigt. Die Reinheit des MSPG wurde mittels HPLC mit UV-Detektion überprüft. Die Reinheit der Substanz war bei den Wellenlängen 254 nm und 340 nm größer als 99,5 %. Sie wurde im Folgenden als Referenz bei der Quantifizierung mittels HPLC mit UV-Detektion verwendet.

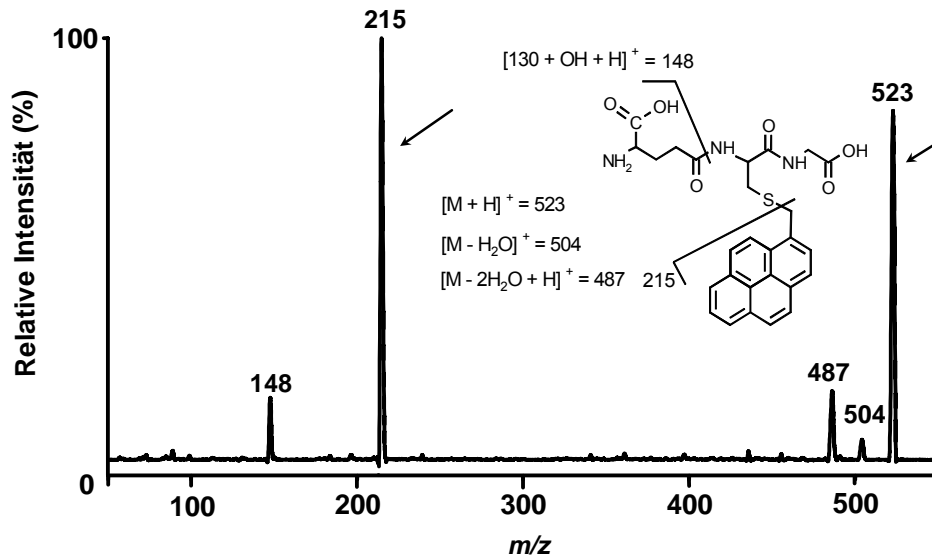


Abbildung 3.2 Tochterionenspektrum und Fragmentierungsschema von MSPG. Die Pfeile deuten auf die Signale der Ionen m/z 523 und m/z 215, welche zur Quantifizierung mittels MRM (Multiple Reaction Monitoring) herangezogen werden können.

Die gemäß 2.2.1 hergestellte MPMA wurde mittels MS-MS auf ihre Identität untersucht. Die Ionisation der MPMA (1 ng/ μl , gelöst in Wasser/Acetonitril 1+1 v/v) erfolgte im negativen ESI-Modus. Ein Gesamtionenspektrum von MPMA (Abb. 3.3) zeigt das Molekülion m/z 376 und zwei Tochterionen bei m/z 247 und m/z 162. Hierbei ist m/z 162 charakteristisch für das Fragment *N*-Acetylcystein. Das Fragment m/z 247 wird durch den Verlust der *N*-Acetyl-2-aminopropionsäure verursacht. Der Befund wurde durch weitere MS-MS-Experimente mit Tochterionenscan und Mutterionenscan bestätigt. Die Identität der synthetisch hergestellten MPMA galt damit als bestätigt. Die Reinheit wurde mittels HPLC mit UV-Detektion überprüft. Sie war bei beiden Wellenlängen ($\lambda = 254$ nm; 340 nm) größer als 99,5 %. Die Substanz wurde als Referenz zur Quantifizierung von MPMA herangezogen, dabei wurde der Verlust des *N*-Acetyl-2-aminopropionsäure-Fragmentes zur Quantifizierung mittels LC-MS-MS im MRM-Modus herangezogen (Pfeile in der Abbildung).

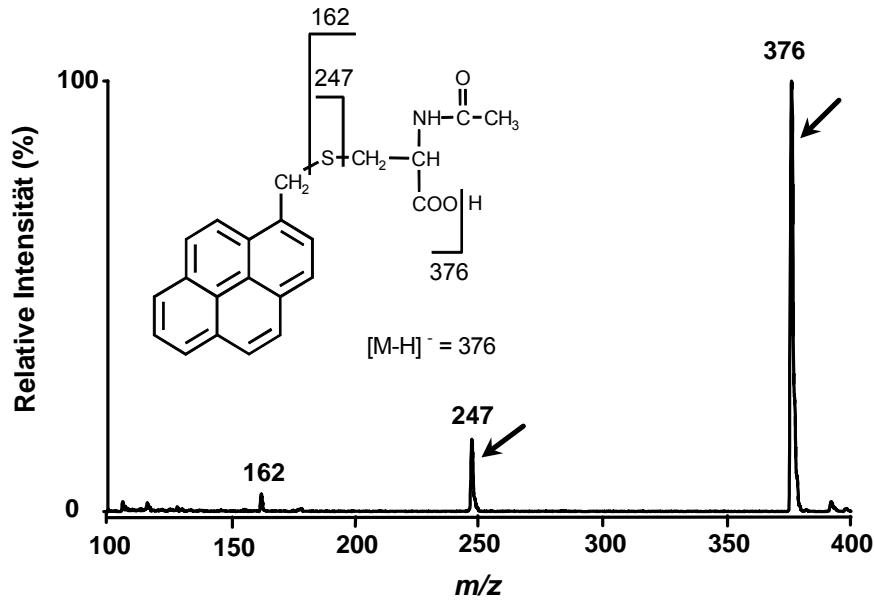


Abbildung 3.3 Massenspektrum und Fragmentierungsschema der MPMA.

Die Substanz MPdG wurde uns von Herrn Dr. Seidel zur Verfügung gestellt. Die Reinheit der Substanz wurde mittels HPLC mit UV-Detektion überprüft. Bei einer Wellenlänge von 340 nm betrug sie mehr als 95 %. Da die Substanz als Referenz zur Bestimmung von MPdG in Urin und Faeces mittels LC-MS-MS dienen sollte, wurden im Folgenden die Bedingungen zur MS-MS-Detektion etabliert. Das Molekül MPdG ist nicht-ionisch. Die Ionisierung wurde durch negative APcl herbeigeführt. Das Gesamtionenspektrum unter den angegebenen Bedingungen zeigte überwiegend das Molekülion bei m/z 480 (nicht abgebildet). Die kollisionsinduzierte Fragmentierung des Molekülions lieferte die Tochterionen m/z 149, m/z 255, m/z 364 (Abb. 3.4). Das erstere deutet auf ein intaktes Guanin-Fragment hin. Das letztere entsteht aus dem MPdG-Molekül nach der Abspaltung der Desoxyribose. Zur Quantifizierung wurden die Ionen m/z 480 und m/z 149 herangezogen. Die technischen Details sind in Tabelle 2.2 (Abschnitt 2.5.1) dargelegt.

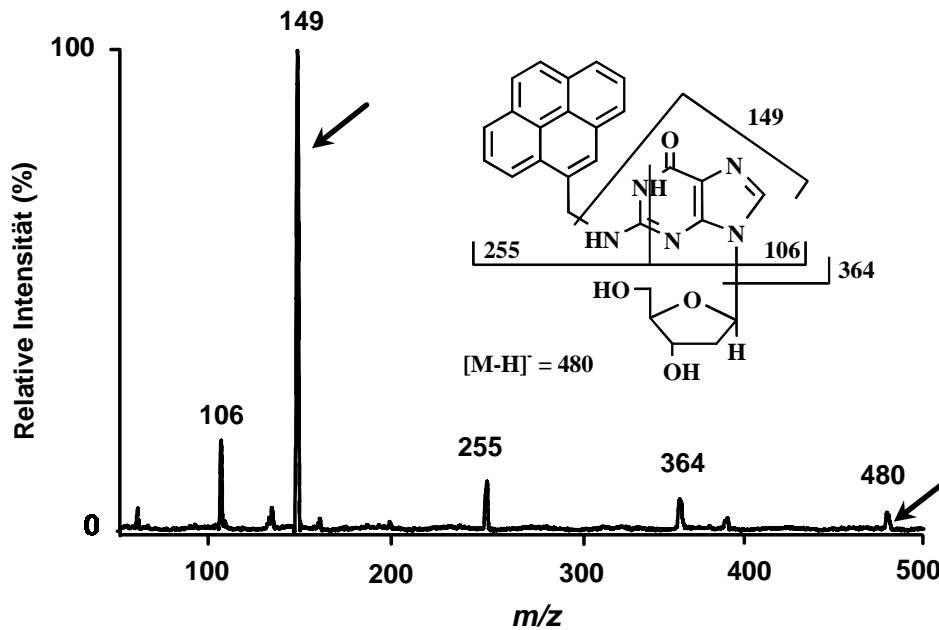


Abbildung 3.4 Tochterionenspektrum und Fragmentierungsschema von MPdG.

3.1.2 *In vitro* Bestimmung der GST-Aktivität gegenüber 1-Sulfooxymethylpyren (SMP)

Zur Bestimmung der GST-Aktivität *in vitro* wurde SMP in Anwesenheit von GSH mit Cytosolpräparationen der Ratte inkubiert (Abschnitt 2.3.1). Durch Messung des entstandenen Glutathionkonjugates (MPSG) im Inkubationsansatz mittels HPLC mit UV-Detektion wurde die Umsatzrate von SMP zu MPSG bestimmt (Abschnitt 2.5).

SMP wurde in Anwesenheit von GSH und Cytosolen verschiedener Organe der Ratte zu MPSG umgesetzt. In einem Parallelansatz wurde an Stelle von Cytosol eine entsprechende Menge an Rinderserumalbumin eingesetzt. Dabei konnte keine MPSG-Bildung beobachtet werden. Bis zu einer Konzentration von 1 μM wurde SMP durch Rattenlebercytosol nahezu quantitativ zu MPSG umgesetzt. Bei einer Konzentration von 100 μM wurden 8 % des Substrates umgesetzt.

Cytosolpräparationen von Leber, Niere, Lunge und Colon einer männlichen und einer weiblichen Ratte wurden auf ihre GST-Aktivität gegenüber SMP untersucht. Zur Bestimmung der Umsatzrate wurden zunächst jeweils die Linearitätsbereiche der entsprechenden Cytosole ermittelt, in denen die Menge des gebildeten MPSG linear mit der Zeit und Proteinmenge zunahm. Innerhalb eines Inkubationszeitfensters von

10 min wurde bei allen Organen eine lineare Zunahme der MPSG-Bildung beobachtet. Es wurde daher in nachfolgenden Untersuchungen eine Inkubationszeit von 10 min gewählt. Es konnte jedoch kein Bereich festgestellt werden, in dem die gebildete MPSG-Menge wirklich mit der Proteinkonzentration linear zunahm (Abb. 7.1 im Anhang). Um trotzdem einen Einblick in die GST-Aktivität der Cytosolpräparationen gegenüber SMP zu erlangen, wurde zur Ermittlung der Umsatzrate bei einer Proteinmenge von bis zu 0,2 mg/ml und einer Substratkonzentration von 100 μ M inkubiert (Abschnitt 2.3.1).

Die Cytosolpräparationen aller untersuchten Organe (Leber, Niere, Lunge und Colon) wiesen GST-Aktivität gegenüber SMP auf (Tab. 3.1). Die Umsatzraten der Leber- und Colocytole bei beiden Geschlechtern einschließlich der des Nierencytosols des Männchens waren mit Werten zwischen 2200 bis 2700 pmol/mg Protein/min ähnlich. Die Umsatzrate des Nierencytosols der weiblichen Ratte betrug dagegen nur etwa 30 % der des Männchens. Cytosolpräparationen der Lungen wiesen höhere Aktivitäten auf. Die Umsatzrate des Lungencytosols des Männchens war um 25 % höher als die der Leber, während die des Weibchen 50 % höher war als die der Leber und des Colons. Die Niere des Männchens schien aktiver (um 200 %) zu sein als die des Weibchen, während die Lunge beim Weibchen die Aktivere war (um 25 %). Obwohl sich die Umsatzraten (pmol MPSG/mg Protein/min) unter den angegebenen Bedingungen (< 0,2 mg Protein/ml) bei den untersuchten Organen nicht zu unterscheiden schienen, wurden bei höheren Proteinkonzentrationen (1 mg/ml) unterschiedliche Gesamtumsätze (pmol MPSG im Ansatz) erreicht. Diese betrugen bei Leber und Niere bis zu 2000 pmol, während bei der Lunge und Colon weniger als 1000 pmol MPSG im Gesamtansatz gefunden wurden (Abb. 7.1 im Anhang).

Tabelle 3.1 Umsatzrate der Glutathionkonjugation von SMP. SMP (100 μ M im Inkubationsansatz) wurde in Anwesenheit von Glutathion (1 mM) mit Cytosolpräparationen (0,2 mg/ml im Inkubationsansatz) verschiedener Organe bei 37 °C 10 min inkubiert. Die Bildung von MPSG wurde mittels HPLC mit UV-Detektion bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Vierfachbestimmungen mit der gleichen Cytosolpräparation.

Cytosol	Umsatzrate, pmol / mg Protein / min	
	Männlich	Weiblich
Leber	2420 \pm 180	2490 \pm 50
Niere	2420 \pm 930	780 \pm 90
Lunge	4270 \pm 140	5970 \pm 190
Colon	2600 \pm 80	2400 \pm 120

3.1.3 *In vivo* Untersuchungen zur Ausscheidung von N^2 -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG) und Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA)

3.1.3.1 *Evaluierung der Probenvorbereitung*

MPMA aus Urinproben wurde mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion auf Extrelut-Säulen angereichert. Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden Urinproben von unbehandelten Tieren mit MPMA dotiert. Die Dotierung erfolgte in zwei Konzentrationen, da die Konzentrationen in authentischen Proben über einen weiten Bereich streuten. Die Wiederfindungsrate für beide Konzentrationen, 240 und 740 pmol / ml Urin, unterschieden sich statistisch nicht. Daher wurden die Daten zusammengefasst. Die Wiederfindung für Urin betrug 54 ± 3 % ($n = 25$). Plasmaproben (400 pmol/ml) ergaben mit 48 ± 7 % ($n = 6$) eine ähnliche Wiederfindung. Bei Faecesproben (150 pmol/g Homogenat) betrug sie hingegen 81 ± 11 % ($n = 5$). Zur Quantifizierung in biologischen Proben wurden die Daten mittels einer externen Kalibrierkurve ausgewertet, welche im Bereich von 80 bis 8000 fmol / Injektion linear war.

Für die MPdG-Bestimmung wurden Urin- und Faecesproben gemäß Abschnitt 2.5.8 aufgearbeitet. Die Wiederfindungsraten wurden durch Zugabe von MPdG-Standardsubstanz zu den Nullproben (40 pmol/ml Urin, 120-4000 pmol/g Faeceshomogenat) bestimmt. Sie betragen 95 ± 2 % ($n = 3$) im Urin und waren größer als 95 % in

Faeces. Die Quantifizierung der Probe erfolgte gegen eine externe Kalibrierkurve (300 bis 2300 fmol / Injektion).

3.1.3.2 *Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) und N²-(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG) in Körperflüssigkeiten und Faeces nach Applikation von 1-Hydroxymethylpyren (HMP)*

Die Ausscheidung von MPMA und MPdG wurde als Parameter der Aktivierung von HMP zu reaktivem SMP postuliert. Die Hypothese sollte durch Bestimmung der MPMA- und MPdG-Ausscheidung nach Behandlung von Ratten mit HMP bestätigt werden. In vorangegangenen Versuchen wurde eine Konjugation des SMP mit GSH *in vitro* nachgewiesen. Des Weiteren wurden geeignete Methoden zur Untersuchung von MPMA und MPdG erarbeitet. Die Voraussetzungen für einen Tierversuch waren somit geschaffen. Dazu wurden Ratten gemäß Abschnitt 2.4.2 mit HMP behandelt. Urin-, Faeces- und Plasmaproben wurden entnommen und auf MPMA und MPdG untersucht.

MPdG konnte weder im Urin noch in Faeces der HMP-behandelten Tiere nachgewiesen werden. MPMA hingegen war in allen untersuchten Körperflüssigkeiten und auch in Faeces enthalten.

Quantifizierung von MPMA im Plasma

HMP behandelte weibliche Ratten (pro Gruppe 3 Tiere) wurden zu den gezeigten Zeitpunkten nach der Applikation durch Dekapitation getötet (Tab. 3.2). Bereits 30 min nach der HMP-Behandlung konnte MPMA im Plasma aller Tiere der Gruppe identifiziert werden. Die interindividuelle Variabilität der MPMA-Konzentration im Plasma ist groß. Die Daten deuten auf einen Anstieg in einem Zeitraum von 0,5 h bis 3 h nach der Behandlung hin. Bereits 12 h nach der Applikation sanken die Plasmakonzentrationen bei zwei von drei Proben unter das Detektionslimit. Bei einem Tier konnte jedoch nach 24 h immer noch eine erhebliche MPMA-Plasmakonzentration (350 nM) nachgewiesen werden (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2 MPMA-Konzentration in Plasma von mit HMP behandelten weiblichen Ratten (250 µmol/kg KM, i.p.). Die Tiere wurden nach der angegebenen Zeit durch Dekapitation getötet. Jeder Wert repräsentiert ein anderes Tier. Zum Zeitpunkt 0 h gezeigte Werte stammen von unbehandelten Tieren. Die Detektionsgrenze beträgt 30 nM.

Zeit (h)	MPMA-Konzentration in Plasma (nM)
0	< 30, < 30, < 30
0,5	40, 128, 135
0,75	310, 940, – ^a
3	790, 1290, 5780
12	< 30, < 30, 510
24	< 30, < 30, 350

^a Probenverlust bei der Aufarbeitung

Quantifizierung von MPMA in Urin und Faeces

Drei männlichen (M1, M2 und M3) und drei weiblichen (F1, F2 und F3) Ratten wurde einmalig eine Dosis HMP (250 µmol/kg KM, i.p.) appliziert. Die renale Ausscheidung von MPMA wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen verfolgt. Im gesamten Beobachtungszeitraum von 7 Tagen wurden weniger als 1 % der Dosis als MPMA renal ausgeschieden, mehr als 80 % davon in den ersten 48 h. Der Zeitverlauf der renalen MPMA-Ausscheidung ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Die Originaldaten sind der Tabelle 7.2 des Anhangs zu entnehmen. Ein starker Anstieg und Abfall der MPMA-Exkretion war bei den Weibchen zu erkennen. Ein Ausscheidungsmaximum lag zwischen 6 und 9 h nach der Applikation. Die Daten der Männchen unterlagen starken Schwankungen. Es war nicht möglich, das Ausscheidungsmaximum bei den männlichen Ratten festzulegen.

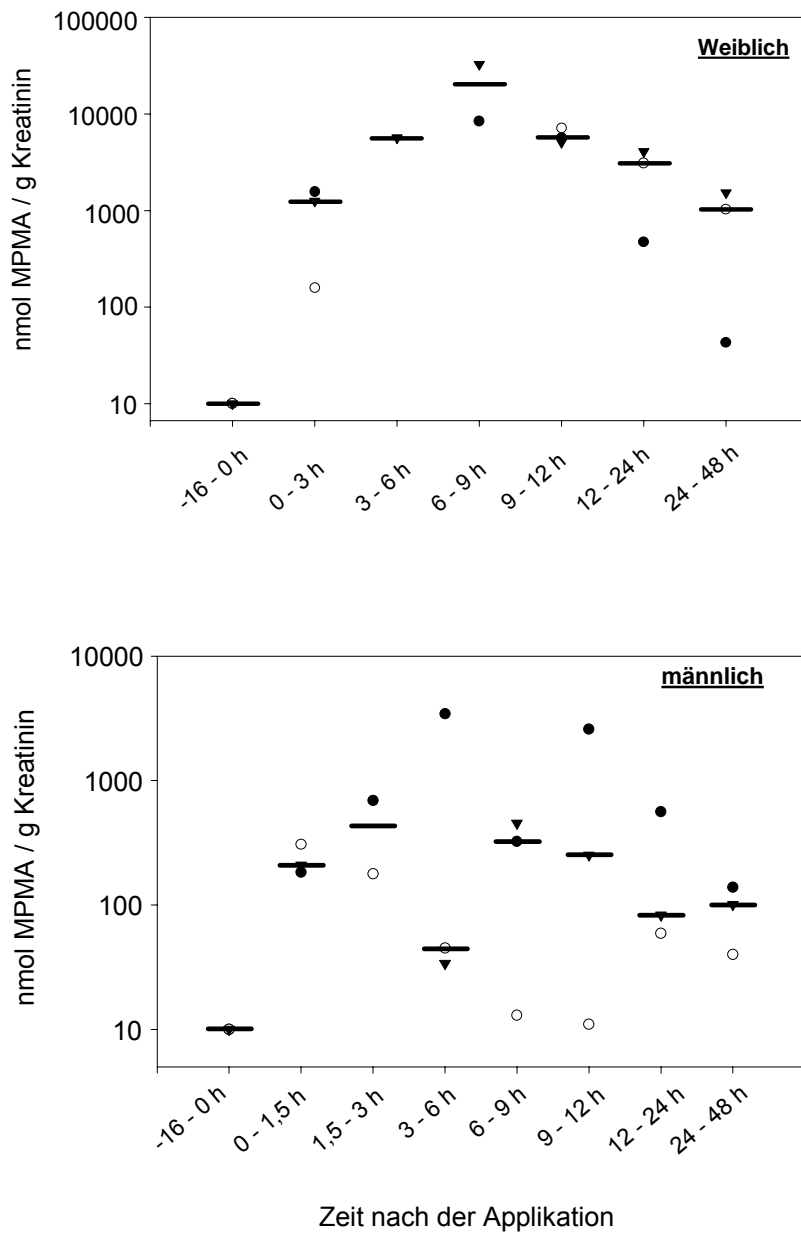


Abbildung 3.5 Die renale MPMA-Ausscheidung bei weiblichen und männlichen Ratten nach einmaliger i.p. Applikation von HMP (250 $\mu\text{mol/kg KM}$). Es wurden je Geschlecht drei Tiere verwendet. Die durchgezogenen Linien stellen die Mediane dar. Die Werte der einzelnen Tiere sind durch Punkte, Kreise und Dreiecke gekennzeichnet. Fehlende Datenpunkte beruhen auf fehlenden Urin-Ausscheidungen in entsprechenden Zeiträumen. Für die Periode vor der Applikation ist die Detektionsgrenze von 10 nmol MPMA / g Kreatinin angegeben.

Faeces wurden parallel zur Urinentnahme alle 24 h gesammelt und wie beschrieben (Abschnitt 2.5.7) auf MPMA untersucht. MPMA wurde, mit einer Ausnahme, in allen

Proben der ersten 48 h identifiziert (Abb. 3.6). Ein Geschlechtsunterschied hinsichtlich der Menge der über Faeces ausgeschiedenen MPMA war nicht erkennbar.

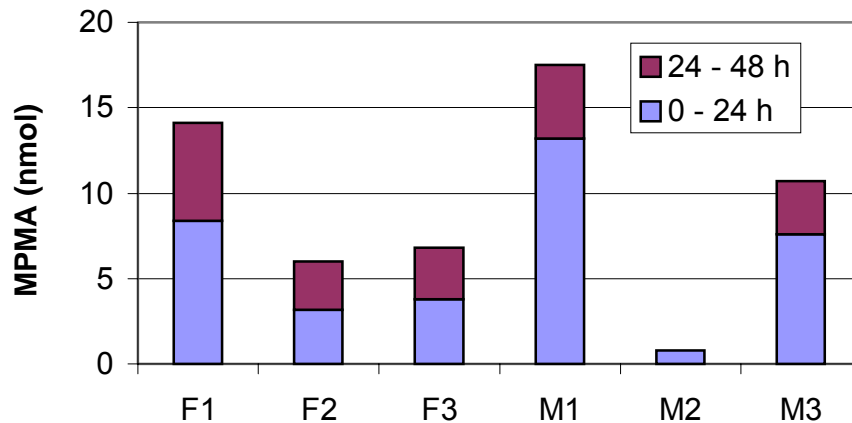


Abbildung 3.6 Ausscheidung von MPMA in Faeces von weiblichen (F1 - 3) und männlichen (M1 - 3) Ratten nach einmaliger i.p. Applikation von HMP (250 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ KM). Die Daten beziehen sich auf dieselben Tiere wie in Abbildung 3.5. Die Originaldaten sind der Tabelle 7.2 des Anhangs zu entnehmen.

Bei Betrachtung der gesamten MPMA-Exkretion (48 h, in Urin und Faeces) ist ein Geschlechtsunterschied hinsichtlich der ausgeschiedenen Menge zu verzeichnen. Weibliche Ratten schieden ca. 7-fach mehr MPMA aus als die männlichen Tiere. In Bezug auf den Ausscheidungsweg überwiegt bei weiblichen Ratten die renale Exkretion (68 – 88%) und bei den Männchen der biliäre Weg (49 – 78 % der Gesamtausscheidung in 48 h). Die Originaldaten sind in Tabelle 7.4 des Anhangs zusammengefasst.

3.1.3.3 Mercaptursäure des 1-Methylpyren (MPMA) im Urin nach Applikation von 1-Methylpyren (MP)

Drei männliche Ratten bekamen einmalig eine Dosis MP (250 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ KM, i.p.) appliziert. Die Zeitkurve der MPMA-Ausscheidung nach der Applikation wird in Abbildung 3.7 aufgezeigt (Originaldaten siehe Tabelle 7.5 des Anhangs). Es ist eine langsame Zunahme der renalen MPMA-Konzentration bis 6 h nach der Applikation zu erkennen, gefolgt von einem Plateau zwischen 6 und 12 h. 12 h nach der Applikation fiel die MPMA-Konzentration im Urin langsam ab. Innerhalb der ersten

48 h wurde insgesamt 0,02 bis 0,11 % des applizierten MP renal als MPMA ausgeschieden. Diese Werte bewegen sich in der selben Größenordnung wie bei den mit HMP behandelten männlichen Ratten (0,02 bis 0,2 % der Dosis, Daten siehe Tabelle 7.2 im Anhang).

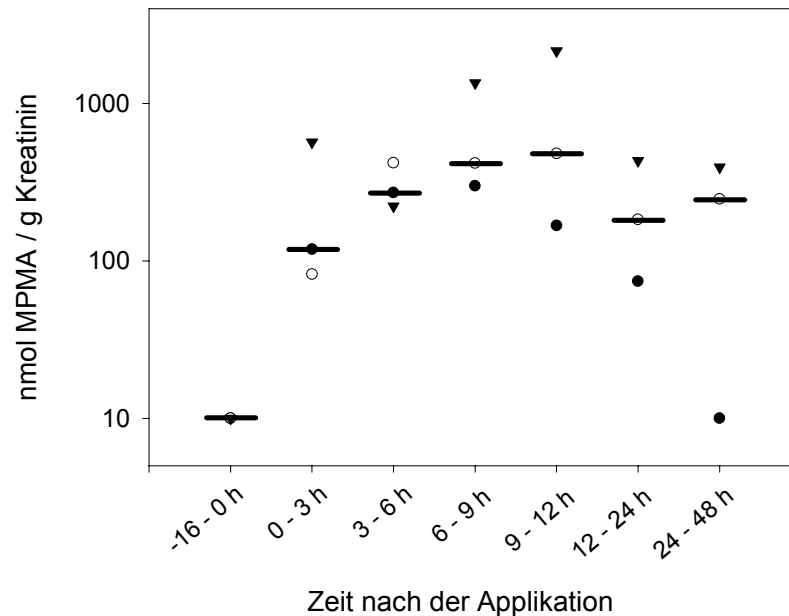


Abbildung 3.7 Die renale MPMA-Ausscheidung bei männlichen Ratten ($n = 3$) nach einmaliger Applikation von MP ($250 \mu\text{mol} / \text{kg KM}$, i.p.). Die durchgezogenen Linien stellen die Mediane dar. Die Werte der einzelnen Tiere sind durch Punkte, Kreise und Dreiecke gekennzeichnet. Für die Periode vor der Applikation ist die Detektionsgrenze von $10 \text{ nmol MPMA} / \text{g Kreatinin}$ angegeben.

3.1.3.4 Quantifizierung von der Methylpyrenyl-Mercaptursäure (MPMA) und dem N^2 -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG) im Urin von Ratten nach Applikation von 1-Sulfooxymethylpyren (SMP)

Die Bestimmung von MPMA und MPdG bei mit HMP bzw. MP behandelten Tieren hat gezeigt, dass weit weniger als 1 % der applizierten Dosis als MPMA ausgeschieden wurde. Dies wirft die Frage auf, ob HMP bzw. MP tatsächlich in so geringer Menge zu SMP aktiviert werden. Um die Möglichkeit der ineffektiven MPMA-Ausscheidung auszuschließen, wurden exemplarisch zwei weibliche Ratten mit dem reaktiven Metaboliten SMP ($250 \mu\text{mol} / \text{kg KM}$) behandelt (Abschnitt 2.4.4). Dieser Teilversuch sollte klären, a) in welcher Größenordnung und in welchem Zeitraum SMP als Mercaptursäure ausgeschieden wird und b) ob die starke DNA-Adduktbildung des SMP zur Ausscheidung von MPdG führt.

Die Tiere wurden nach der Behandlung in Stoffwechselläufigen gehalten. Da innerhalb der ersten 24 h nach der Behandlung im Allgemeinen der größte Teil der Metaboliten ausgeschieden wird, wurden in diesem Zeitraum kurze Zeitabstände bei der Probenentnahme gewählt (Abb. 3.6). Danach wurden die Proben über 24 h gesammelt, bis die Tiere unerwartet an einer hämorrhagischen Entzündung des Dünn- und Dickdarms starben. Der Todeszeitpunkt war 3 Tage (Tier 1) bzw. 6 Tage (Tier 2) nach der Applikation. Entzündete Darmwände und blutiges Gewebswasser im Bauchraum wurden vorgefunden. Leber, Niere und Lunge waren morphologisch intakt.

Ein Maximum der MPMA-Exkretion war bei beiden Tieren zwischen 3 und 9 h nach der Applikation zu beobachten (Abb. 3.8). Die renale Ausscheidung an MPMA innerhalb der ersten 48 h betrug in beiden Fällen mehr als 90 % (99,9 % und 92,8 %) der Ausscheidung im gesamten Beobachtungszeitraum. Es wurde jedoch insgesamt weniger als 1 % der Gesamt SMP-Dosis als MPMA renal ausgeschieden (0,61 % bei Tier 1 und 0,14 % bei Tier 2). Im Urin von Tier 1 wurde eine insgesamt etwa 4-fach höhere Menge an MPMA (0,61 % der Dosis) gefunden als im Urin von Tier 2 (0,14 %). Die Originaldaten sind der Tabelle 7.6 des Anhangs zu entnehmen.

MPdG konnte im Urin beider SMP-behandelten Tiere identifiziert werden. Abbildung 3.9 zeigt ein typisches Chromatogramm der Urinanalyse mittels LC-MS-MS. Urinproben der ersten 12 h nach der Applikation, welche für eine Einschätzung der MPdG wichtig waren, wurden zunächst für MPMA-Bestimmungen verwendet. Die verbliebene Probenmenge wurde auf MPdG untersucht, es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine kleine Menge an MPdG wurde im Urin zwischen 12 und 24 h gefunden. Die Ausscheidung der beiden Tiere betrug jeweils 47 pmol und 14 pmol MPdG. Dies ist weniger als 0,9 ppm der Dosis. Unter der Detektionsgrenze lag auch die MPdG-Menge der gepoolten Urinproben von 24 bis 48 h, von 48 bis 72 h, sowie der Faecesproben vom Zeitpunkt der Applikation bis 48 h.

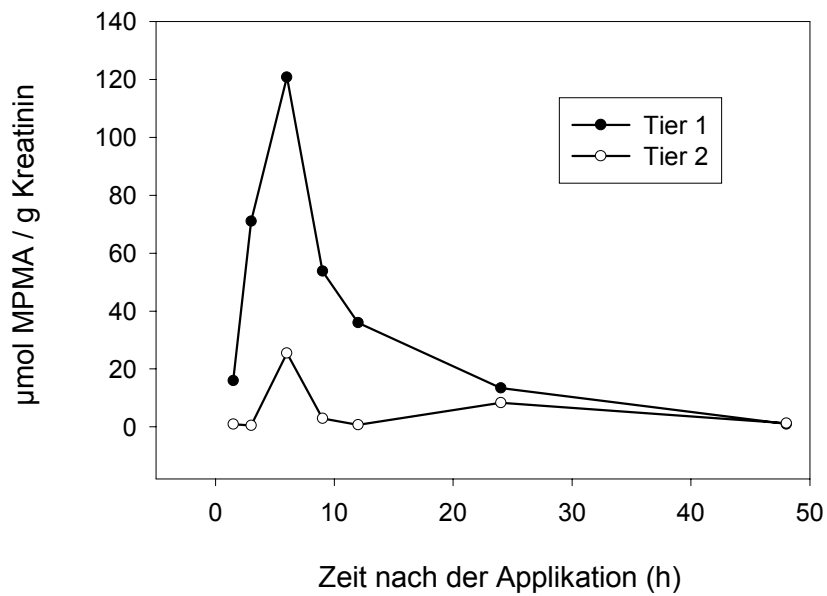


Abbildung 3.8 Verlauf der renalen Ausscheidung von MPMA in weiblichen Ratten nach einmaliger Applikation von SMP (250 µmol / kg KM, i.p.).

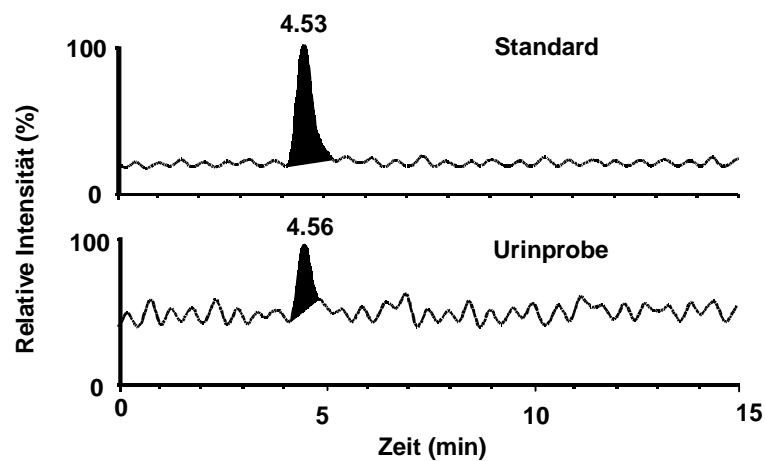


Abbildung 3.9 Identifizierung von MPdG im Rattenurin nach Applikation von SMP (250 µmol / kg KM, i.p.). Die Analyse erfolgte mittels HPLC mit MS-MS-Detektion im MRM-Modus ($m/z = 480 \rightarrow 149$).

3.2 Untersuchung zum Metabolismus von 1-Hydroxymethylpyren (HMP)

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass weniger als 1 % des applizierten HMP als Mercaptursäure MPMA ausgeschieden wurde. Dieser Befund führt zu einer für die Risikoabschätzung des benzylichen Alkohols HMP bzw. seiner metabolischen Muttersubstanz MP wichtigen Frage: Welche sind die alternativen Metabolismuswege?

3.2.1 Ausscheidung und Gewebeverteilung der Radioaktivität nach ^{14}C -Hydroxymethylpyren-Applikation

^{14}C -markierte Substanz verhält sich metabolisch wie die nicht markierte. Ihre Metaboliten sind aufgrund der Radioaktivität leicht zu erkennen und die spezifische Radioaktivität ändert sich während der Absorption, Verteilung und Ausscheidung nicht. Diese Eigenschaften wurden zur Untersuchung des Ausscheidungsverhaltens und der Identifizierung von Metaboliten von HMP ausgenutzt. Mit ^{14}C -HMP behandelte Ratten wurden in Stoffwechselläufigen gehalten und Faeces- und Urinproben wurden gesammelt (Abschnitt 2.4). Urin, Faeces und diverse Gewebeproben wurden mittels Szintillationszählung auf ihre Gesamtradioaktivität untersucht und bilanziert. Die Erkennung der Metaboliten erfolgte nach chromatographischer Trennung mit UV (PDA 200 bis 400 nm) und Radioflussdetektion (System 4, Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1). Die UV-Spektren wurden den Peaks der Radiodetektion zugeordnet. Die Strukturvorschläge basieren auf LC-MS-MS-Experimenten, wobei Proben von Tieren verwendet wurden, die nicht radioaktives HMP in gleicher Dosis erhalten hatten (Tierexperiment siehe Abschnitt 2.4.2).

3.2.1.1 *Ausscheidung und Verteilung der Radioaktivität nach der Applikation von ^{14}C -Hydroxymethylpyren*

Zur Untersuchung der Ausscheidung und Verteilung von HMP und seiner Metaboliten wurde in einem Vorversuch eine männliche Ratte mit ^{14}C -HMP behandelt (Abschnitt 2.4.5) und Urin sowie Faeces über 7 d gesammelt. Die Aufarbeitung der Urin- und Faecesproben entsprach der im Abschnitt 2.5.2 beschriebenen Methode. Über 7 d wurden im Urin und Faeces 38,9 % bzw. 31,9 % der Gesamtdosis gefunden, davon mehr als 95 % in den ersten 48 h, weniger als

5 % vom Tag drei zu Tag sieben. Aus diesem Grund wurde der Hauptversuch auf 48 h beschränkt. In Tabelle 3.3 ist die Gesamtexkretion der Radioaktivität (% Dosis) zusammengefasst.

Tabelle 3.3 Exkretion von Radioaktivität (% Dosis) über 48 h nach Behandlung von Ratten mit ^{14}C -HMP. Die Angaben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Messungen von je Gruppe drei Tieren.

		% Dosis		
		Urin	Faeces	Gesamt
Weibchen	0 - 24 h	18,1 ± 1,5	30,8 ± 1,9	
	24 - 48 h	2,7 ± 0,6	9,1 ± 1,9	
	0 - 48 h			60,8 ± 3,9
Männchen	0 - 24 h	30,1 ± 4,1	14,2 ± 12,7	
	24 - 48 h	7,4 ± 5,3	12,2 ± 9,1	
	0 - 48 h			63,9 ± 3,6

Bezüglich der Gesamtausscheidung der Radioaktivität ließ sich kein Geschlechtsunterschied feststellen. Der Hauptanteil wurde binnen 24 h ausgeschieden. Bei den männlichen Ratten überwog die renale Ausscheidung in den ersten 24 h die Ausscheidung über Faeces, während bei den weiblichen Tieren die über Faeces ausgeschiedene Radioaktivität prozentual höher war. Ob ein Stoff bevorzugt über Galle oder Harn ausgeschieden wird, hängt von vielen Parametern ab. Dabei spielt die Molekülgröße eine wichtige Rolle. Die Konjugationsreaktionen fügen nicht nur geladene Gruppe ein, sondern erhöhen gleichzeitig auch das Molekulargewicht der Metaboliten. Hochmolekulare Konjugate werden bevorzugt über die Galle und intestinale Mucosa eliminiert. Bei Ratten liegt die Grenze bei etwa 325 Da. Der Unterschied im renalen und biliären Anteil deutet auf Geschlechtsunterschiede in den metabolischen Aktivitäten und/oder Transportsystemen hin.

Die Gesamtausscheidung (Urin und Faeces) in 48 h betrug maximal 70 % der Dosis. Die Ergebnisse des Vorversuchs gaben Grund zu der Annahme, dass eine längere Beobachtungsperiode die Wiederfindung nicht wesentlich erhöhen würde. Das warf die Frage auf, wodurch diese Differenz verursacht wurde. Wie bereits erwähnt, wurden Urin- und Faecesproben in Markuran Stoffwechselläufigen gesammelt.

Aufgrund der Lipophilie des Pyrenkörpers ist es denkbar, dass ein Teil der ausgeschiedenen Metaboliten an die Kunststoffoberfläche adsorbierte. Diese Vermutung wurde dadurch bestätigt, dass etwa 8 % der applizierten Dosis durch intensives Spülen der Käfige wieder gefunden wurde. Ein erheblicher Teil der Radioaktivität blieb trotz des Spülens an der Gefäßwand haften, welcher durch einen Wischtest des Gefäßes nachgewiesen wurde. Dessen prozentualer Anteil war aus technischen Gründen nicht zu ermitteln. Eine andere Fehlerquelle könnte in der Applikation bestehen. Die Lesegenauigkeit der Injektionsspritze z.B. betrug $\pm 10 \mu\text{l}$. Bei Applikationsvolumen zwischen 80 und 120 μl belief sich der Applikationsfehler auf etwa 10 %.

3.2.1.2 Gewebeverteilung der Radioaktivität nach 48 h

Die Tiere wurden 48 h nach der Applikation durch Dekapitation getötet. Die Organe wurden entnommen und wie beschrieben behandelt (Abschnitt 2.5.2). Die Gesamtradioaktivität, die noch in den Geweben verblieben war, betrug bei den Weibchen jeweils 2,3 %, 2,5 %, und 3,1 % der Dosis und bei den Männchen jeweils 2,8 %, 3,3 % und 3,1 % der Dosis. Ein Großteil der im Körper verbliebenen Radioaktivität (> 80%) wurde im Fettgewebe wiedergefunden. In Abbildung 3.10 ist die Verteilung der Radioaktivität in unterschiedlichen Geweben von einem Männchen und einem Weibchen dargestellt. Weitere zwei Männchen und zwei Weibchen wurden auf die im Körper verbliebene Radioaktivität untersucht. Dabei wurden Mukosa und glatte Muskulatur verschiedener Darmabschnitte getrennt betrachtet. Die Gewebeverteilung der Radioaktivität war in allen untersuchten Tieren ähnlich. Die Darstellung in Abbildung 3.10 ist repräsentativ für alle Tiere. Ein Geschlechtsunterschied konnte nicht festgestellt werden.

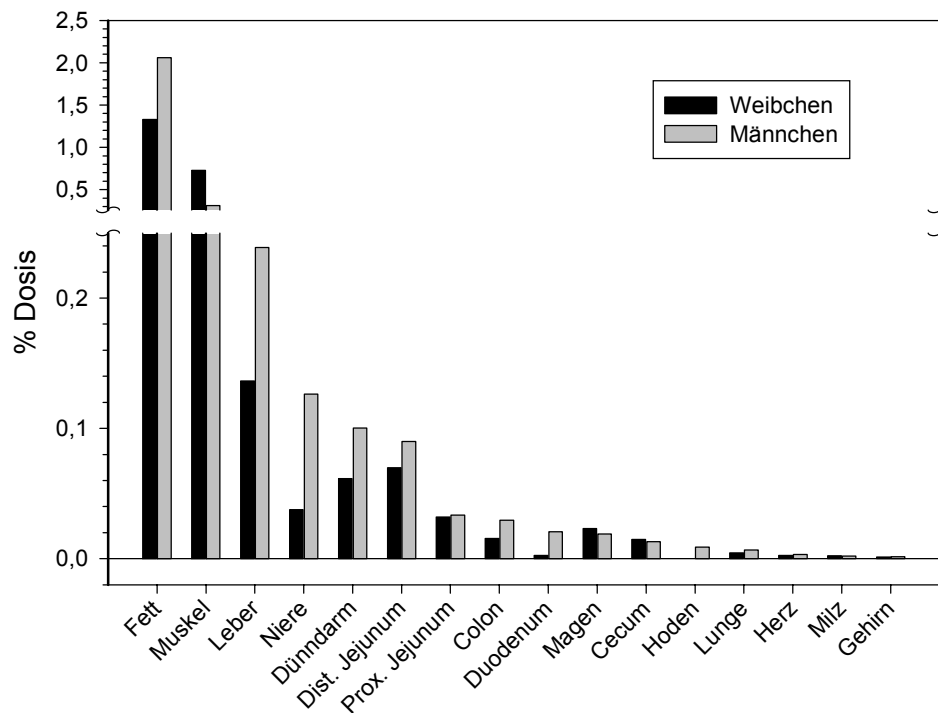


Abbildung 3.10 Verteilung der Radioaktivität in Geweben einer männlichen und einer weiblichen Ratte nach Behandlung mit ^{14}C -HMP. Die Angabe (% Dosis) wurde errechnet aus dem Quotienten der Radioaktivität (dpm) entsprechender Gewebe und der applizierten Dosis (dpm).

3.2.2 Metabolitenidentifizierung im Urin nach Applikation von 1-Hydroxymethylpyrene (HMP)

3.2.2.1 Untersuchungsstrategie

Der Metabolismus der Pyrenderivate führt weitgehend zu Konjugaten mit intaktem Pyrensystem. Dihydrodirole, bei denen die Pyrenstruktur und mit ihr das pyrentypische UV-Spektrum verloren gingen, wurden nur in geringer Menge gebildet. Darum galt das Interesse vorerst Metaboliten mit pyrenspezifischen UV-Spektren. Um diese selektiv aufzuspüren wurden Chromatogramme bei 340 nm aufgezeichnet.

Die weitere Metabolitenidentifizierung erfolgte weitgehend über LC-MS-Analyse (System 5, Abschnitt 2.5). Durch Splitten des Flusses nach der HPLC-Trennung wurde zu der Gesamtionenstromspur gleichzeitig auch ein UV-Chromatogramm erhalten. Als Ionisationsmethoden wurden ESI und APCl jeweils in positivem und negativem Modus getestet. ESI- wurde als geeignete Ionisationsmethode für weitere

Untersuchungen angewendet, da sie eindeutige Massenspektren zu den entsprechenden UV-Signalen lieferte. Die Untersuchungsstrategie ist in Abbildung 3.11 vereinfacht dargestellt.

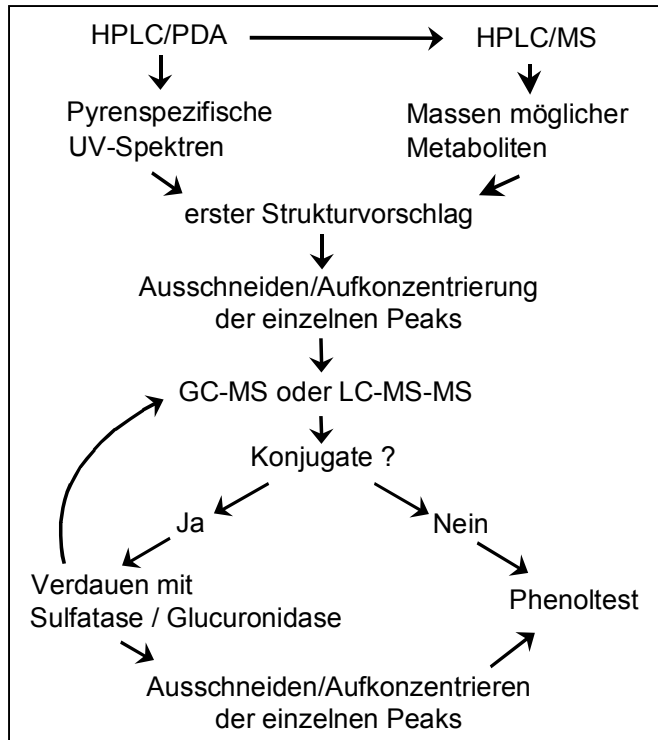


Abbildung 3.11 Strategie zur Metabolitenidentifizierung.

Viele Metaboliten werden konjugiert ausgeschieden. Sulfo- und Glucuronsäure-Konjugate können enzymatisch durch Sulfatase bzw. Glucuronidase gespalten werden. Dabei wird das Aglykon freigesetzt. Der Schwund vorhandener Metaboliten und das Herausbilden neuer Substanzen nach enzymatischer Spaltung sollten als zusätzlicher Nachweis für Sulfo- und Glucuronsäuren-Konjugate dienen. Die kommerziell erhältlichen Sulfatasen und Glucuronidasen sind leider nicht näher charakterisiert oder mit gewisser Glucuronidase- bzw. Sulfatase-Aktivität kontaminiert. So wurde eine bakterielle Sulfatase mit bekannter Glucuronidase-aktivität verwendet.

Cytochrom P450-Enzyme vermögen das Pyrenringsystem vom HMP zu hydroxylieren, wobei Phenole entstehen (Engst *et al.* 1999). Diese haben die Eigenschaft, bei pH-Änderung ihr Absorptionsmaximum reversibel zu verändern. Die Hydroxygruppe wird im alkalischen Milieu deprotoniert. Das konjugierte System, das für das UV-Spektrum entscheidend ist, wird durch die Ionisierung der Hydroxygruppe erweitert. So unterscheiden sich die Absorptionsmaxima von Phenolen

polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe um etwa 20-30 nm je nach dem, ob der pH-Wert unter oder über ihrem pK_a -Wert liegt. Diese Eigenschaft wurde als ein weiterer Nachweis für phenolische Strukturen nach der massenspektrometrischen Identifizierung genutzt. Dieses Verfahren wird in Abschnitt 2.5.3 detailliert beschrieben und in dieser Arbeit allgemein als Phenol-Test bezeichnet.

Anhand der UV-Spektren, der massenspektrometrischen Experimente, der enzymatischen Verdaus zur Erkennung von Sulfo- bzw. Glucuronsäuren-Konjugaten und schließlich des Phenol-Tests wurde eine Reihe von Einzelinformationen zusammengetragen, die schließlich ein Gesamtbild des jeweiligen Metaboliten liefern. In den folgenden Abschnitten werden die Informationen detailliert dargestellt und zusammengesetzt. Die Strukturvorschläge sind aus der zusammengetragenen Informationen abgeleitet.

3.2.2.2 Metabolitenidentifizierung im Urin

Die renale Ausscheidung stellt einen wichtigen Eliminationsmechanismus des Organismus dar. Bei den renalen Metaboliten handelt es sich meist um niedermolekulare, leicht wasserlösliche Substanzen. Abbildung 3.12 zeigt ein Chromatogramm der Urinprobe einer männlichen Ratte. Mindestens zehn Substanzen weisen pyrenähnliche UV-Spektren (Abb. 3.13) auf und stellen daher potenzielle Metaboliten des HMP dar. Hierbei handelt es sich bei der Substanz Nr. 10 um das applizierte HMP, welches durch Kochromatographie mit der kommerziell verfügbaren Referenzsubstanz identifiziert wurde.

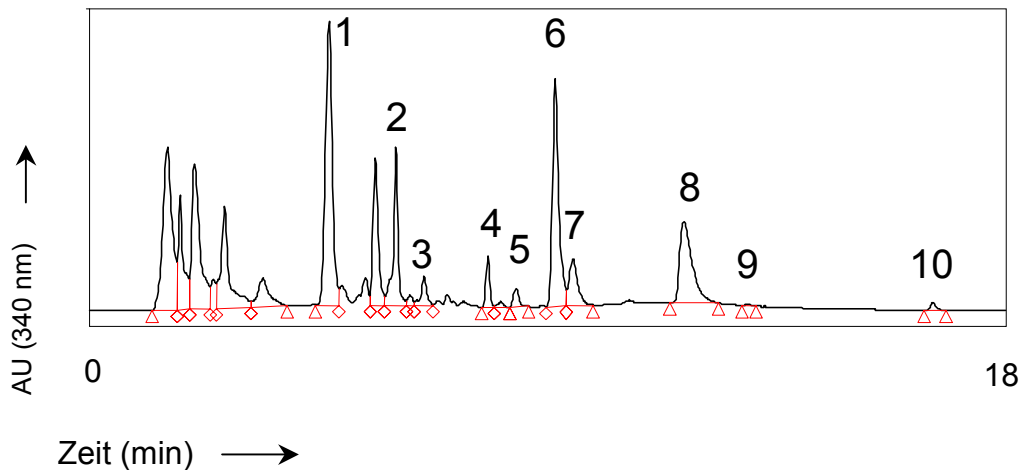


Abbildung 3.12 Chromatogramm der Urinproben einer männlichen Ratte (gesammelt von 0-3 h nach der Applikation). Die chromatographischen Bedingungen entsprachen dem im Abschnitt 2.5.1 dargestellten System 1. Die Detektion erfolgte mit UV bei 340 nm. Die nummerierten Signale weisen pyrenähnliche UV-Spektren auf und sind im Urin un behandelter Tier nicht zu finden.

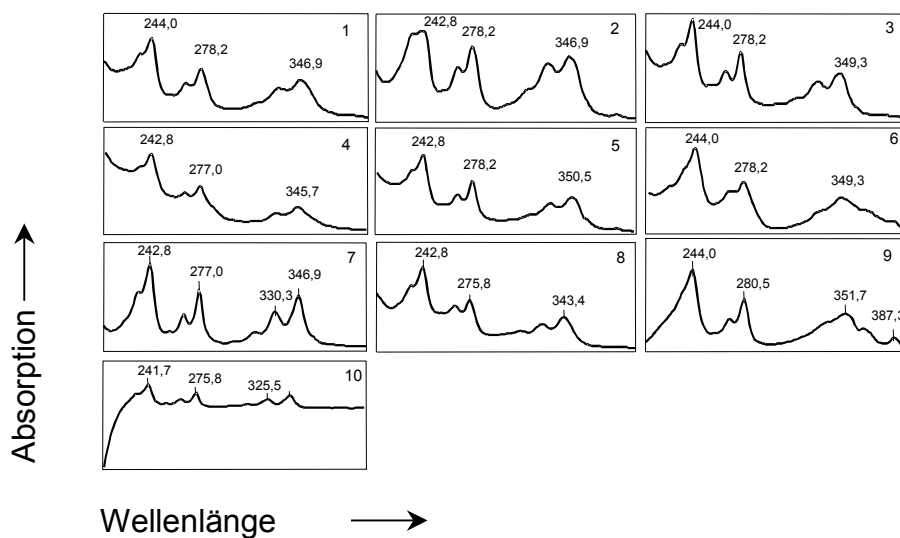


Abbildung 3.13 UV-Spektren der renal ausgeschiedenen Metaboliten von HMP. Die Spektren der Peaks aus der Abbildung 3.12 wurden im Bereich von 210 bis 400 nm mit einem PDA aufgenommen.

Identifizierung von Peak 1 und 2

Aufgrund der starken Ähnlichkeit der UV- und MS-Spektren werden die Metaboliten 1 und 2 hier zusammen bearbeitet. Das Signal bei m/z 341 spielt eine dominante Rolle bei beiden Substanzen.

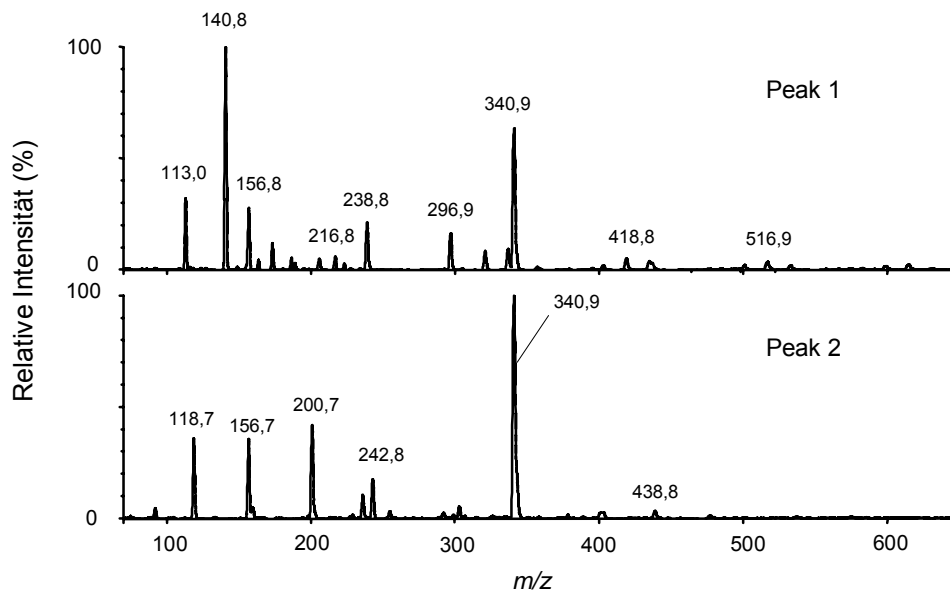


Abbildung 3.14 Massenspektren der Metaboliten 1 (oben) und 2 (unten).

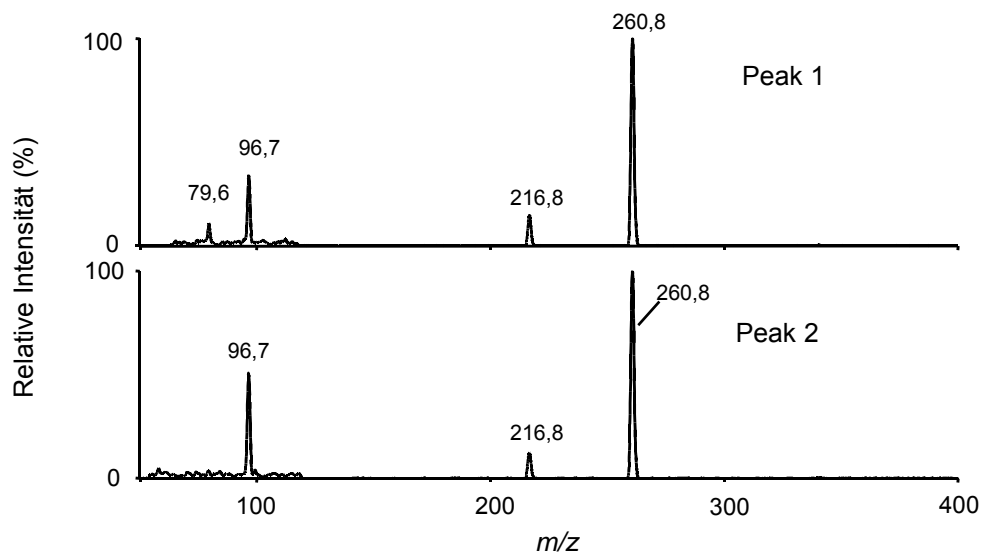


Abbildung 3.15 Tochterionenspektren vom Ion m/z 341 zu den Metaboliten 1 (oben) und 2 (unten).

Durch Vereinigung mehrerer entsprechender HPLC-Fractionen konnte genug Material gesammelt werden, um MS/MS-Experimente durchzuführen. So ergaben sich für das Ion m/z 341 die Tochterionen m/z 261, m/z 217 und m/z 97 (Abb. 3.15). Die Tochterionenspektren des Ions m/z 341 für die Metaboliten 1 und 2 sind nahezu identisch. Dies deutet auf eine Stellungsisomerie hin. Dem Fragmentierungsmuster im MS/MS-Experiment zufolge könnte es sich um den phenolischen Sulfat-Ester des Ringhydroxylierungsproduktes von PCS, einem Oxidationsprodukt des HMP, handeln (Abb. 3.16).

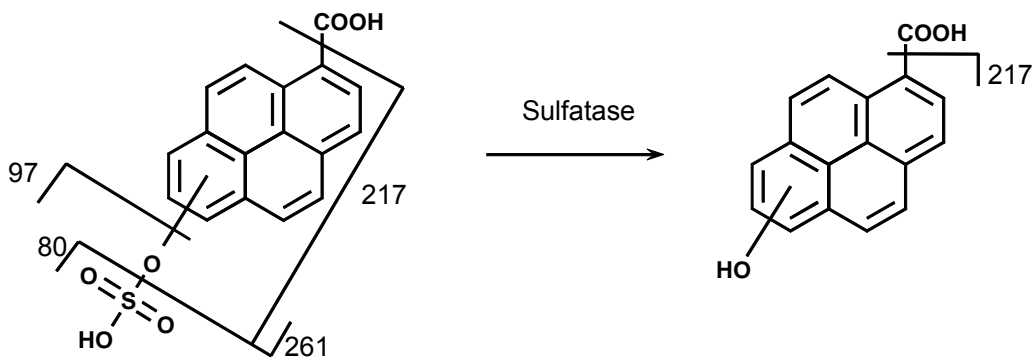


Abbildung 3.16 Strukturvorschlag und Fragmentierungsmuster der Metaboliten 1 und 2 (links). Die phenolische OH-Gruppe kann verschiedene Stellungen am Ring annehmen, das Molekölion der Substanz ist m/z 341. Die möglichen Strukturen der Substanzen nach einem Sulfatase-Verdau und deren Fragmentierungsmuster sind rechts abgebildet. Das Molekölion dieser Struktur ist m/z 261.

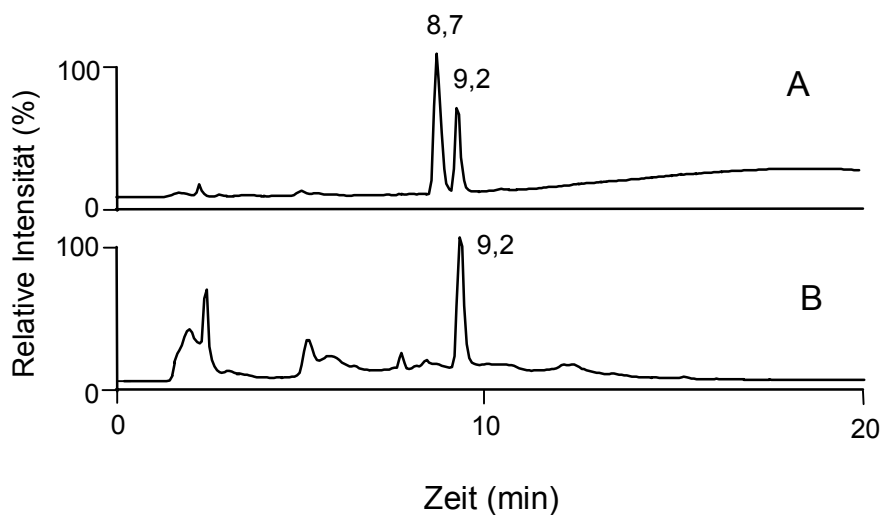


Abbildung 3.17 HPLC-Analyse von Metabolit 1 (A) und 2 (B) nach Behandlung mit Sulfatase/Glucuronidase. Die HPLC-Chromatogramme wurden mit System 5 (Abschnitt 2.5, Tab. 2) bei 340 nm aufgenommen.

Der Nachweis, ob es sich um Sulfo-Konjugate handelte, sollte durch eine Behandlung der Fraktionen mit Sulfatase erbracht werden. Nach der Behandlung verschwand der Metabolit 1 (R_t 4,0 min), es entstanden zwei neue Substanzen mit R_t 8,7 und 9,2 min (Abb. 3.17 oben). Die Peakfläche der Substanz 1 (R_t 8,7 min) überwog die der Substanz 2 (R_t 9,2 min). Metabolit 2 verschwand ebenfalls nach der enzymatischen Behandlung, eine neue Substanz wurde gebildet (Abb. 3.17 unten), die mit dem Produkt (R_t 9,2 min) des Metaboliten 1 nach der Behandlung koeluierte.

Metabolit 1 könnte daher ein Gemisch aus Sulfatestern zweier Stellungisomere bestehen, die lediglich in der Position der Ringhydroxylierung sich unterscheidet. Dabei koeluiert eine der Isomere zufällig in angewendeten Trennsystem zufällig mit dem Abbauprodukt des Metaboliten 2. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das zweite Verdauprodukt des Metaboliten 1 durch ungenau geschnittene Fraktionen entstand. Das Ergebnis des enzymatischen Verdaus und das Fragmentierungsmuster in den MS-MS-Experimenten lassen darauf schließen, dass hier Sulfo-Konjugate vorliegen dürften.

Die Struktur des Aglykons wurde nach dem Verdaus durch LC-MS-Analyse ermittelt. MS-Spektren der beiden Abbauprodukte des Metaboliten 1 (Abb. 3.18 oben links) zeigen das Molekülion m/z 261. Die Tochterionenspektren des Molekülions (Abb. 3.18 oben rechts) weisen die bekannten Fragmente m/z 261 und m/z 217 auf. Das Fragment m/z 97, das für Sulfo-Konjugate charakterisch ist, erscheint nicht. Die Differenz zwischen m/z 261 und m/z 217 beträgt 44, was den typischen Massenverlust bei einer Decarboxylierung darstellt. Die entsprechenden Massen- und Tochterionenspektren vom Abbauprodukt des Metaboliten 2 gleichen denen des zweiten Produktes vom Metaboliten 1 (Abb. 3.18 unten). Alle diese Ergebnisse stützen den Strukturvorschlag für die Metaboliten 1 und 2 in Abbildung 3.16.

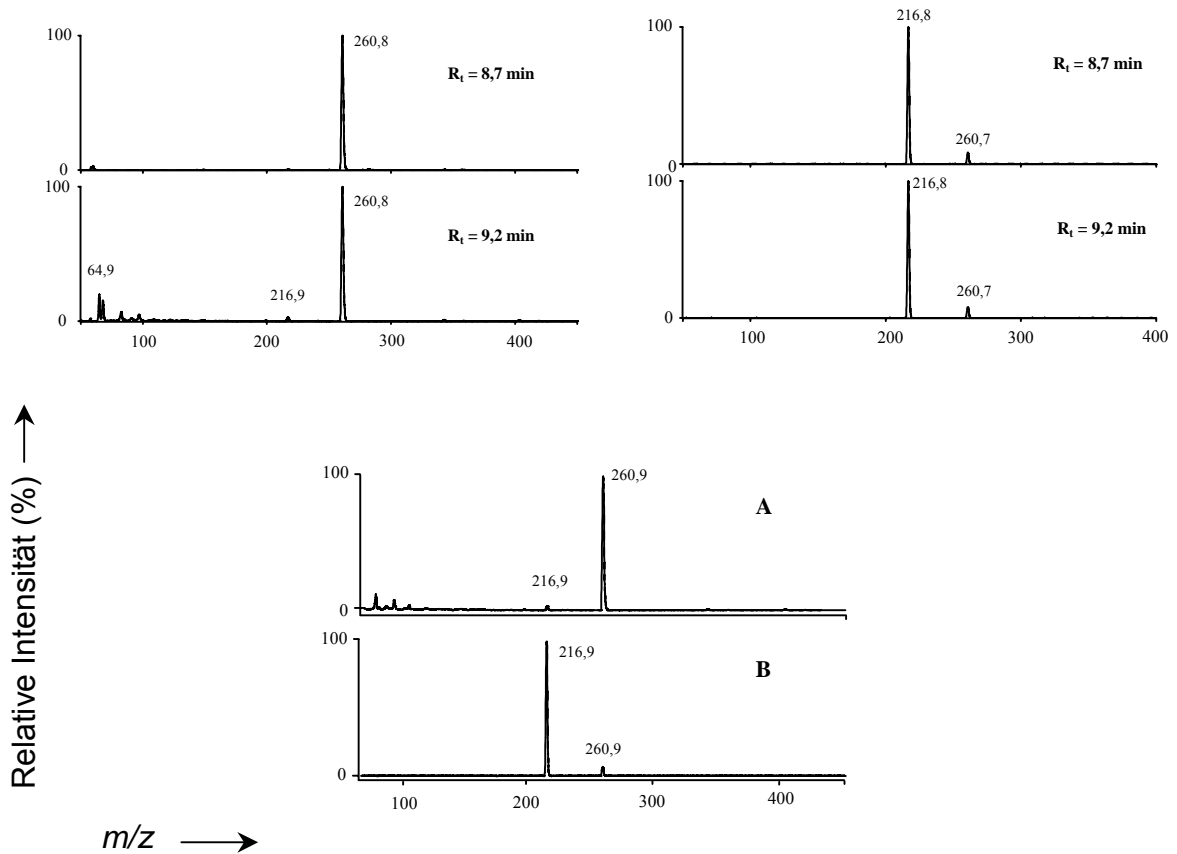


Abbildung 3.18 LC-MS-MS-Analyse der Metaboliten 1 bzw. 2 nach der Behandlung mit Sulfatase/Glucuronidase. Das Bild oben links zeigt die Massenspektren der beiden Abbauprodukte von Metabolit 1. Das Bild oben rechts zeigt die Tochterionenspektren des Iones m/z 261. Das untere Bild zeigt das Massenspektrum (A) und Tochterionenspektrum des Molekülions 261 (B) vom Abbauprodukt des Metaboliten 2. Die chromatographische Trennung war auf System 5 durchgeführt worden. Die Bedingungen der Massenspektrometrie sind in Tab. 2.2, Abschnitt 2.5.1 beschrieben.

Die phenolische Struktur wurde durch den Phenol-Test (Abschnitt 2.5.3) bestätigt. Abbildung 3.19 zeigt die UV-Spektren der Verdauprodukte von Metabolit 1 und 2 bei unterschiedlichen pH-Werten. Es zeigte sich eine deutliche Verschiebung der Absorptionsmaxima zum Bereich längerer Wellenlänge bei pH 9,5 im Vergleich zu pH 5,5. Nach der Wiederherstellung des sauren Milieus (pH 5,5) wurden die ursprünglichen Absorptionsspektren wieder hergestellt. Eine falsche Aussage aufgrund der ebenfalls im Molekül vorhandenen Carbonyl-Gruppe wurde durch Vergleich mit den UV-Spektren von PCS unter sauren und basischen Bedingungen ausgeschlossen (nicht abgebildet).

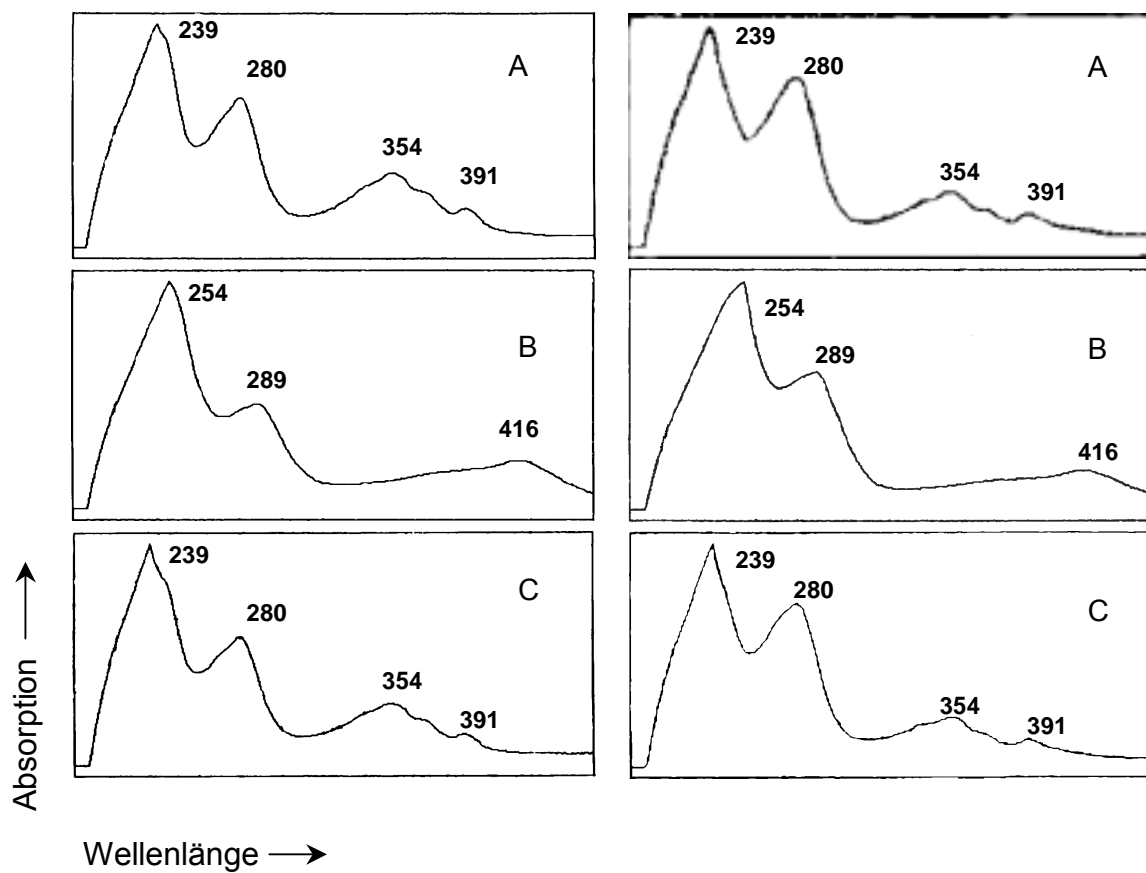


Abbildung 3.19 UV-Spektren der Verdauprodukte bei R_t 8,7 (links) und 9,2 min (rechts) im sauren und alkalischen Milieu. A: pH 5,5 in Phosphatpuffer (10 mM); B: pH 9,5 Lösung von A mit NaOH (1 N) behandelt; C: pH 5,5 Lösung B mit HCl (1 N) neutralisiert.

Der Metabolit 3 weist ein gleiches Molekölion auf wie die Metaboliten 1 und 2. Es wurde daher angenommen, dass es sich bei Metabolit 3 um ein Positionsisomer des Sulfatesters von PCS handelt. Aufgrund der geringen Mengen an Substanz waren weitere Experimente jedoch nicht durchführbar.

Identifizierung von Metabolit 4

Der Metabolit 4 eluierte im System 5 (Abschnitt 2.5) bei 7,9 min. Das Massenspektrum zeigt ein Molekölion von m/z 327 (Abb. 3.20). Zu den Tochterionen des Molekölions m/z 327 gehören die Fragmente m/z 97, m/z 229 und m/z 247 (Abb. 3.20). Hierbei ist das Fragment m/z 97 charakteristisch für Sulfat-Ester. Aufgrund der vorliegenden Massenspektren wird die in Abbildung 3.21 dargestellte Struktur vorgeschlagen. Es handelt sich um den phenolischen Sulfat-Ester des HMP.

Das Fragment m/z 229 ist durch Subtraktion eines Wassermoleküls aus m/z 247 zu erklären.

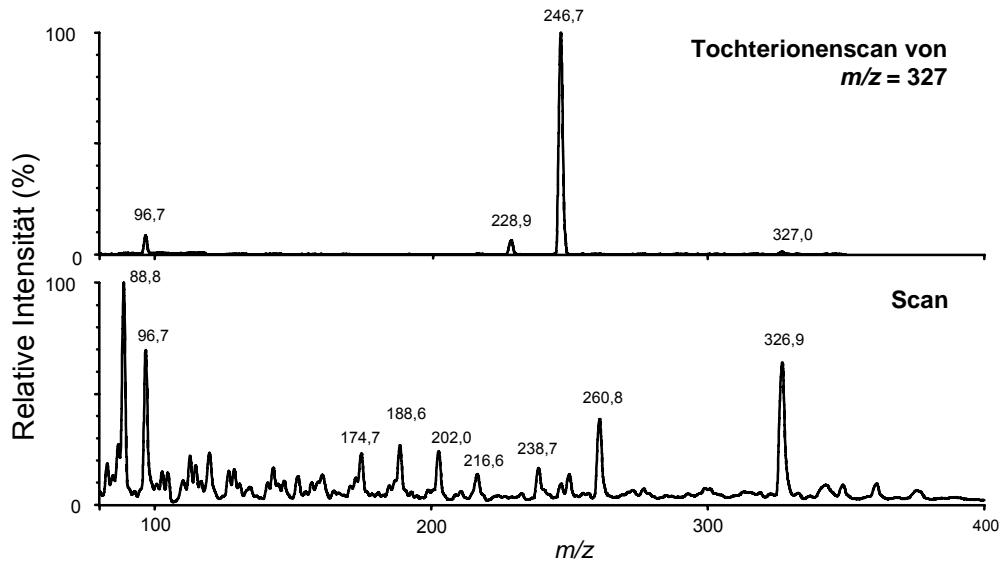


Abbildung 3.20 Massenspektrum des Metaboliten 4 (unten) und Tochterionenspektrum des Moleküliions m/z 327 (oben).

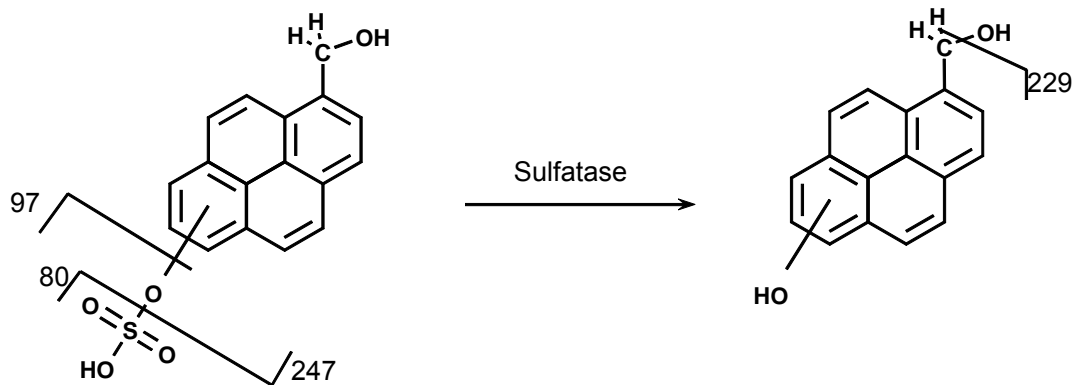


Abbildung 3.21 Strukturvorschlag und Fragmentierungsmuster des Metaboliten 4. Die phenolische OH-Gruppe kann verschiedene Stellungen am Ring annehmen. Das Moleküliion der Substanz ist m/z 327. Die vermutete Struktur der Substanz nach einem Sulfatase-Verdau und deren Fragmentierungsmuster sind rechts abgebildet. Das Moleküliion dieser Struktur ist m/z 247.

Die Behandlung des Metaboliten 4 mit Sulfatase/Glucuronidase untermauerte diesen Strukturvorschlag. Der Metabolit 4 verschwand nach dem Verdau, es entstand ein neues Produkt mit einer Retentionszeit von 12,5 min (Abb. 3.22). Das

Massenspektrum zeigt, wie erwartet, das Molekülion m/z 247, zu dessen Tochterionen das Fragment m/z 229 gehört (Abb. 3.22).

Es gibt Hinweise dafür, dass das Verdauprodukt und Metabolit 9 identisch sind. Sie koeluierten unter den verwendeten HPLC-Bedingungen und hatten identische Massen- und UV-Spektren. Der Phenoltest wurde ebenfalls durchgeführt. Es wurde eine reversible Veränderung des UV-Spektrums vom sauren ins basische Milieu festgestellt. Diese Veränderung ist jedoch nicht phenoltypisch (nicht dargestellt). Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen lassen jedoch keine anderen Strukturvorschläge zu. Ob die für Phenole unspezifischen UV-Spektren lediglich auf der geringen Konzentration der Testsubstanz beruhen, lässt sich hier nicht klären.

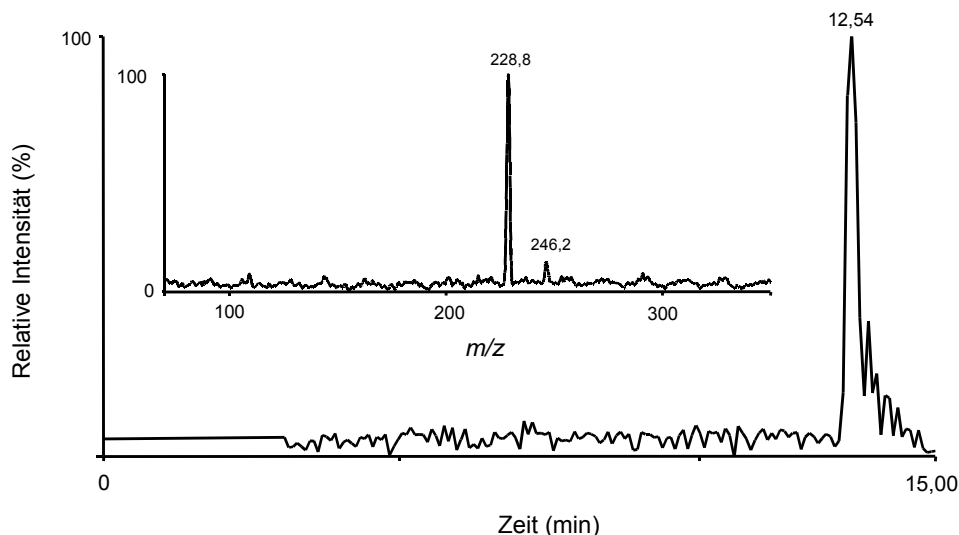


Abbildung 3.22 Totalionenstrom des Verdauproduktes von Metabolit 4 und Tochterionenspektrum des Molekülions m/z 247

Identifizierung der Metaboliten 5 und 7

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Metaboliten 5 und 7 wird die Erläuterung zur Identifizierung beider Substanzen zusammengefasst. Der Metabolit 7 eluierte im System 5 (Tab. 2.1; Abschnitt 2.5.1) mit einer Retentionszeit von 9,6 min. Das Massenspektrum zeigt neben dem Molekülion m/z 421 (Abb. 3.23) die Ionen m/z 113 und 175, welche für Glucuronsäure-Konjugate charakteristisch sind. Demzufolge müsste es sich hierbei um das Glucuronsäure-Konjugat der PCS handeln. Um diese Schlussfolgerung zu bestätigen, wurde PCS mit UDP-Glucuronsäure in Gegenwart

von Rattenlebermikrosomen inkubiert (Abschnitt 2.2.6). Das primäre Produkt der Inkubation ist das Glucuronsäure-Konjugat der PCS. Erwartungsgemäß koeluierte das Produkt mit dem Metaboliten 7 und zeigte ein identisches Massenspektrum. Bei dem Ion m/z 217 könnte es sich um ein Fragment einer ringhydroxylierten PCS handeln, die mit dem Metaboliten 7 koeluierte.

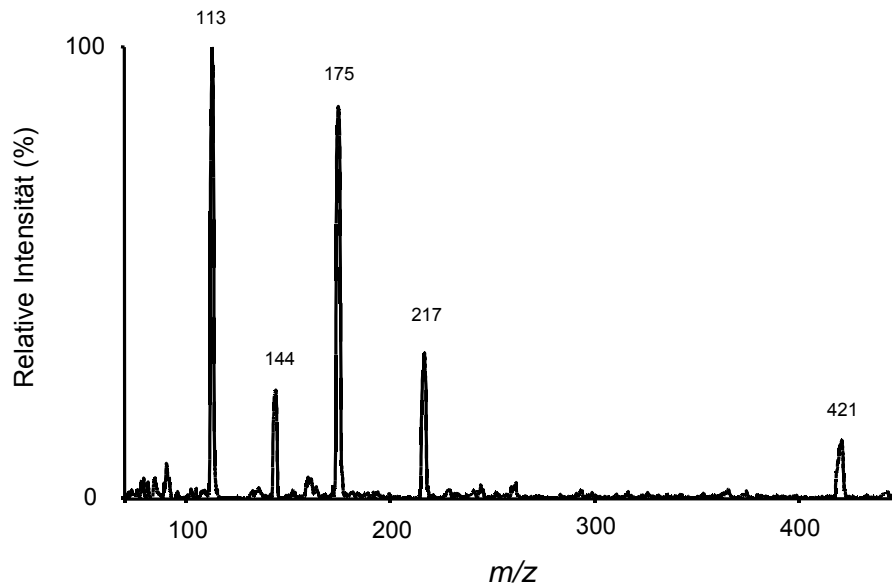


Abbildung 3.23 Massenspektrum des Metaboliten 7. Die Bedingungen der HPLC sind im System 5 (Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1) beschrieben. Die massenspektrometrischen Messungen wurden unter den in Tabelle 2.1 (Abschnitt 2.5.1) dargestellten Bedingungen durchgeführt.

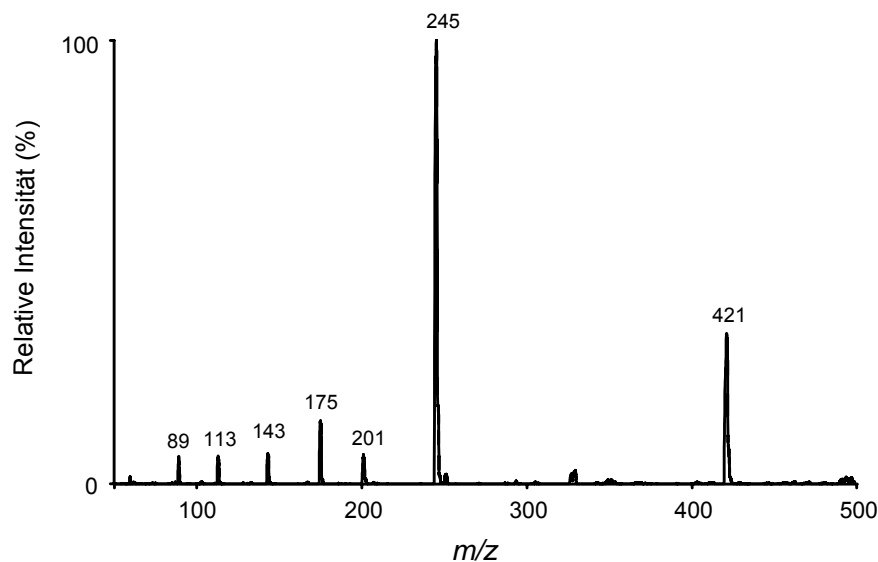


Abbildung 3.24 Massenspektrum des Metaboliten 5. Die Bedingungen der HPLC sind im System 5 (Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1) beschrieben. Die massenspektrometrischen Messungen wurden unter den in Tabelle 2.1 (Abschnitt 2.5.1) dargestellten Bedingungen durchgeführt.

Metabolit 5 eluierte im System 5 (Abschnitt 2.5.1) mit einer Retentionszeit von 8,5 min. Das Massenspektrum zeigt ein Molekölion von m/z 421 (Abb. 3.24). Zu den Tochterionen des Molekölions m/z 421 gehören die Fragmente m/z 113, m/z 174, m/z 201 und m/z 245 (Daten nicht gezeigt). Hierbei sind die Fragmente m/z 113 und m/z 174 charakteristisch für ein Glucuronsäure-Konjugat. Demnach könnte Metabolit 5 ein durch Acylwanderung (Abb. 3.25) entstandenes Stellungsisomer des Glucuronsäure-Konjugates von PCS darstellen. Wie Metabolit 7 war der Metabolit 5 instabil im basischen Milieu. Während Metabolit 7 nach einer Behandlung der Urinproben mit Sulfatase/Glucuronidase nicht mehr detektierbar war, zeigte sich Metabolit 5 resistent gegenüber Glucuronidase. Diese Befunde unterstreichen den Strukturvorschlag, dass es sich bei Metabolit 5 um ein Stellungsisomer des glycosidisch gebundenen Pyrencarbonsäure-Glucuronids handelt. Das Phänomen der Acylwanderung wurde durch Faed (1984) zusammenfassend erläutert.

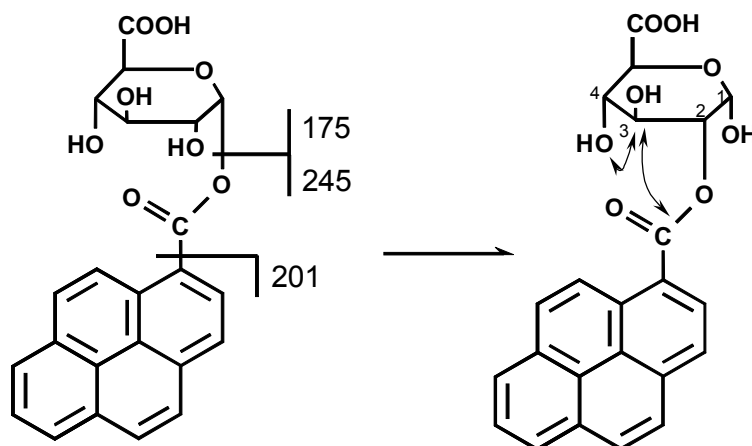


Abbildung 3.25 Strukturvorschlag der Metaboliten 5 (rechts) und 7 (links). Das gezeigte Fragmentierungsmuster basiert auf MS-MS-Experimenten mit dem durch *in vitro* Inkubation hergestelltem Pyrencarbonsäure-Glucuronid und gilt sowohl für den Metaboliten 5 als auch für den Metaboliten 7. Drei Positionsisomere können durch intramolekulare Acylwanderung entstehen, wobei das Aglycon an der 2-, 3- und 4-Position der Glucuronsäure gebunden ist. Der Isomerisierung vom 1-O-Acyl-Glucuronid (glycosidisch) zum 2-O-Acyl-glucuronid ist irreversibel. Die 2-, 3- und 4-Positionsisomere können sich reversibel ineinander umwandeln (Faed 1984).

Identifizierung des Metaboliten 6

Der Metabolit 6 eluierte im System 5 (Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1) mit einer Retentionszeit von 9,2 min. Das Massenspektrum zeigt ein Molekölion von m/z 407 (Abb. 3.26). Zu den Tochterionen des Molekölions m/z 407 gehören die Fragmente

m/z 113, m/z 175, m/z 201, m/z 215 und m/z 231. Hierbei sind die Fragmente m/z 113 und m/z 175 charakteristisch für Glucuronsäure-Konjugate.

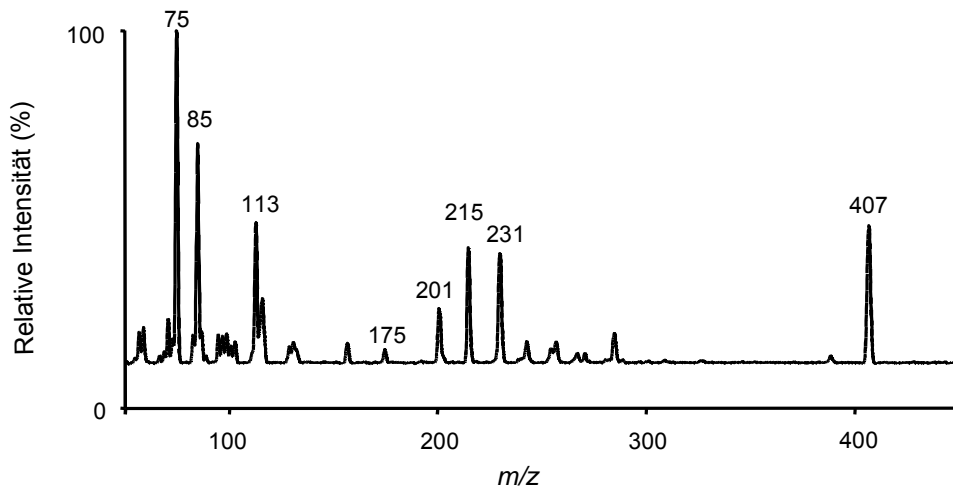


Abbildung 3.26 Massenspektrum des Metaboliten 6. Die HPLC-Bedingung ist im System 5 (Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1) beschrieben. Die massenspektrometrischen Messungen wurden unter den in Tab. 2.2, Abschnitt 2.5.1 dargestellten Bedingungen durchgeführt.

Aufgrund der vorliegenden Daten wird die in Abbildung 3.27 dargestellte Struktur vorgeschlagen. Es handelt sich um das Glucuronsäure-Konjugat des HMP. Die Identität des Metaboliten 6 wurde durch *in vitro* Inkubation von HMP mit UDP-Glucuronsäure in Gegenwart von Rattenlebermikrosomen (Abschnitt 2.2.6) bestätigt.

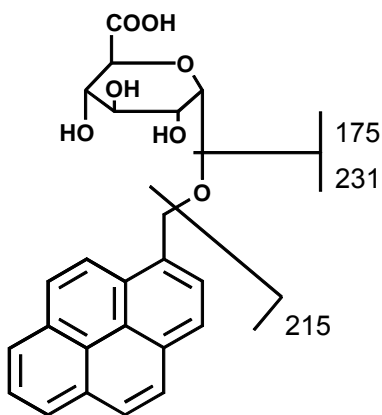


Abbildung 3.27 Strukturvorschlag und Fragmentierungsmuster des Metaboliten 6.

Identifizierung des Metaboliten 8

Der Metabolit 8 eluierte im System 5 mit einer Retentionszeit von 11,7 min. Er koeluierte mit kommerziell erhältlicher PCS. Die UV-Spektren der beiden Substanzen waren identisch. Die geschnittene Fraktionen der Urinprobe wurde gefriergetrocknet und mit TMSH methyliert (Abschnitt 2.5.3) und mittels GC-MS untersucht. Die

Abbildung 3.28 zeigt das MS-Spektrum und Chromatogramm der Analyse. Metabolit 8 ist hiermit als PCS identifiziert.

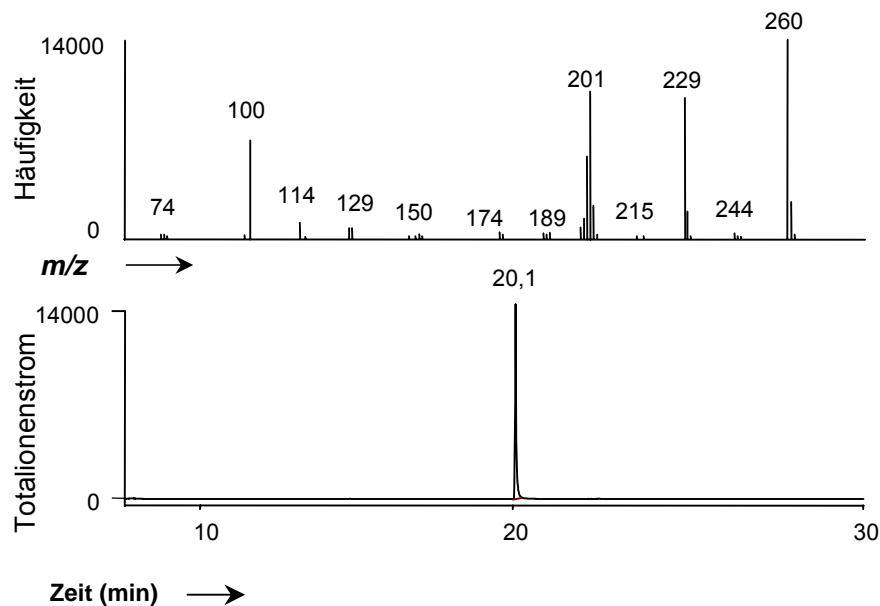


Abbildung 3.28 Massenspektrum und Chromatogramm des methylierten Metaboliten 8.

3.2.3 Bestimmung des relativen Verhältnisses der Metaboliten in Urin und Faeces mittels Radiochromatographie

Urin und Faeces sind Proben mit sehr komplexer Matrix. Hier wurden Urin- und Faecesproben der mit ^{14}C -HMP behandelten Tieren zur HPLC-Analyse mit Radioflussdetektion eingesetzt (System 4 in Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1). Dadurch wurden Matrixeffekte weitgehend eliminiert. UV-Spektren (200-400 nm) wurden zusätzlich durch einen vorgeschalteten PDA-Detektor erhalten. Anhand der Retentionszeit, der Retentionsreihenfolge und der UV-Spektren konnten die Radiosignale den identifizierten Metaboliten zugeordnet werden.

Abbildung 3.29 zeigt exemplarisch die Analyse einer ^{14}C -Urinprobe mittels HPLC mit UV- bzw. Radioflussdetektion. Die Reihenschaltung der Detektoren verursachte eine Retentionszeitverschiebung von ca. 0,5 min zwischen beiden Detektoren. Im UV-Chromatogramm wurden 8 Peaks erkannt, wobei Peak Nr. 4 und 5 bzw. 6 und 7 des UV-Chromatogramms (Abb. 3.29 B) im Radiochromatogramm (Abb. 3.29 A) nicht aufgelöst waren und jeweils als ein Peak in Erscheinung traten. Die Nummerierung der Peaks entspricht der in Abbildung 3.12. Die schlechtere Auflösung des

Radiochromatogramms kann dadurch erklärt werden, dass der Radiodetektor über 13 s akkumulierte Daten als Datenpunkt erzeugt, eine Maßnahme, um die Empfindlichkeit zu steigern.

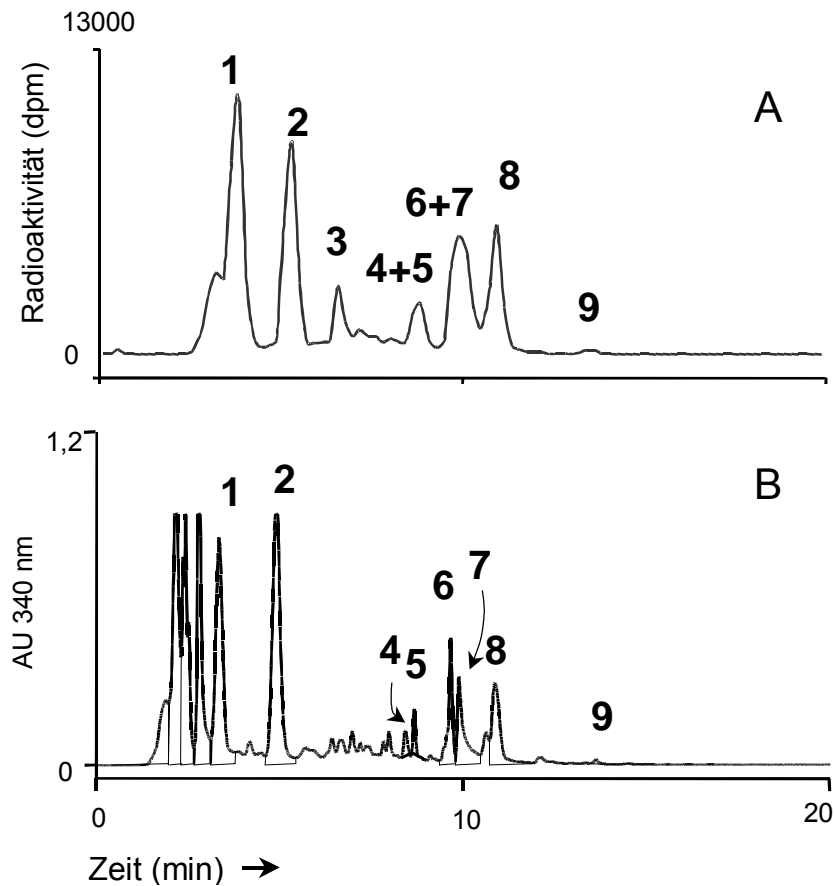


Abbildung 3.29 Chromatogramm einer Urinprobe nach HPLC-Trennung. A: das Chromatogramm im Radiodetektor, B: das Chromatogramm im UV-Detektor. Anhand der Retentionszeiten wurden die Peaks so gekennzeichnet, dass sie der Nummerierung der Abbildung 3.12 entsprechen.

Das in Abbildung 3.29 dargestellte Metabolitenmuster ist allerdings nicht als allgemeingültig zu betrachten. So konnten manche Metaboliten, z.B. Metabolit 3, nur in einigen Proben identifiziert werden. Die Metaboliten 6 und 7, die hier im Radiochromatogramm als ein Signal zu erkennen ist, konnten bei einigen Proben aufgrund einer geringeren Quantität als zwei Signale aufgelöst werden.

Faecesproben wurden gemäß 2.3.2 extrahiert und anschließend analysiert. Vier Metaboliten konnten identifiziert werden (Abb. 3.30). Die Metaboliten wurden anhand der Retentionszeiten und der UV-Spektren den bereits identifizierten Metaboliten zugeordnet. Die Bezeichnung entspricht der in Abbildung 3.12. Zudem wurden nicht-

radioaktive Faecesproben auf gleicher Art und Weise aufgearbeitet und einer LC-MS-MS-Analyse unterzogen. Die Identität der im Faeces als Metaboliten 7 und 8 gekennzeichneten Substanzen konnte hierdurch bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Metaboliten 1 und 10 konnten nicht in allen Faecesproben identifiziert werden.

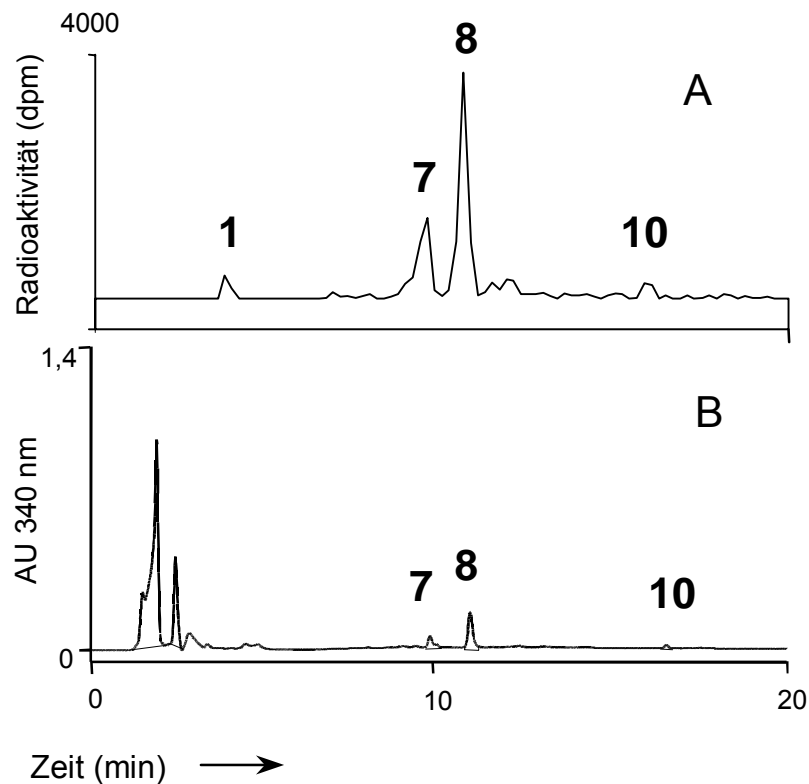


Abbildung 3.30 Chromatogramm einer Faecesprobe nach HPLC-Trennung. A: über den Radioflussdetektor B: über den UV-Detektor. Anhand der Retentionszeiten wurden die Peaks so nummeriert, dass sie der Bezeichnung in Abbildung 3.12 entsprechen.

Um einen Eindruck über die Quantität einzelner Metaboliten im gesamten Metabolitenspektrum zu gewinnen, wurden exemplarisch die in den ersten 24 h nach der Applikation gesammelten ^{14}C -Urin- und Faecesproben einer männlichen und einer weiblichen Ratte gemäß 2.5.4 aufgearbeitet und mittels HPLC mit UV- und Radioflussdetektion untersucht. Die Zuordnung der Metaboliten erfolgte wie beschrieben. Dank der gleichbleibenden spezifischen Radioaktivität sind die Signale im Radiochromatogramm quantitativ untereinander vergleichbar. Diese Eigenschaft wurde zur Berechnung der prozentualen Anteile einzelner Metaboliten an der jeweils im Urin bzw. im Faeces ausgeschiedenen Radioaktivität herangezogen. Auf dieser Datenbasis wurde der Anteil der Metaboliten an der in 24 h insgesamt ausgeschiedenen Radioaktivität berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4

zusammengefasst. Die Rohdaten und die Berechnungen sind in Tabelle 7.1 des Anhangs detailliert dargelegt.

Der quantitative Vergleich der ausgeschiedenen Metaboliten zeigt, dass mehr als 80 % (Männchen) bzw. 90 % (Weibchen) der Metaboliten in seitenketten-oxidierter Form ausgeschieden wurden. Demzufolge spielt die Oxidation an der Seitenkette eine sehr wichtige Rolle bei der Detoxifizierung und Elimination des HMP. Der Befund bildet die Grundlage für die folgenden Untersuchungen.

Tabelle 3.4 Relativer Anteil identifizierter Metaboliten an der Gesamtmenge der in 24 h ausgeschiedenen HMP-Metaboliten (Urin + Faeces). Die Daten beziehen sich auf die Original-Daten in Tabelle 7.1 des Anhangs. Die Bezeichnungen der Metaboliten entsprechen denen in Abbildung 3.12.

Metaboliten	Strukturvorschlag	Anteil einzelner Metaboliten an der Gesamtmenge ausgeschiedener Metaboliten (%)	
		Weibchen (n = 4)	Männchen (n = 4)
1	Phenolischer Sulfatester der ringhydroxylierten PCS	14,8 ± 6,1	22,0 ± 5,0
2	Phenolischer Sulfatester der ringhydroxylierten PCS	11,1 ± 3,6	12,0 ± 5,0
3	Phenolischer Sulfatester der ringhydroxylierten PCS	2,5 ± 2,5	3,0 ± 1,0
4	Phenolischer Sulfatester des ringhydroxylierten HMP	0,9 ± 0,4	2,0 ± 1,0
5	Glucuronsäure-Konjugat der PCS	2,0 ± 1,0	3,0 ± 1,0
6	Glucuronsäure-Konjugat des HMP	7,0 ± 3,0	1,0 ± 1,0
7	Glucuronsäure-Konjugat der PCS	16,0 ± 8,0	13,0 ± 6,0
8	PCS	33,0 ± 8,0	29,0 ± 6,0
9	Ringhydroxyliertes HMP	2,0 ± 2,0	2,0 ± 1,0
10	HMP	3,0 ± 4,0	5,0 ± 6,0

3.2.4 Identifizierung der Metaboliten in Fettgewebe und Leber

3.2.4.1 Metaboliten in Fettgewebe

Das Fettgewebe wurde gemäß Abschnitt 2.5.5 aufgearbeitet. Unter den beschriebenen Bedingungen ließ sich etwa 80 % der im Gewebe vorhandenen Radioaktivität mit Chloroform extrahieren. Der Extrakt wurde mittels HPLC mit PDA- und Radiodetektion analysiert (Abb. 3.31). Ein Vergleich der Retentionszeit sowie des UV-Spektrums vom Analyt mit dem kommerziell verfügbaren HMP ergab, dass nicht metabolisiertes HMP der einzige Bestandteil des Extraktes war.

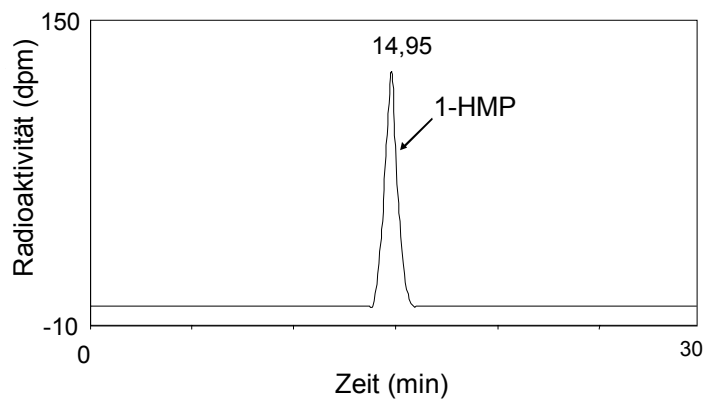


Abbildung 3.31 HPLC-Chromatogramm des Chloroformextraktes vom Fettgewebe mit Radiodetektion (System 4, Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1)

Die Restradioaktivität der Wasserphase war jedoch zu gering (< 20 % in 20 ml), um bei der HPLC-Untersuchung eine Auflösung in diskrete Peaks zu erreichen.

3.2.4.2 Metaboliten in der Leber

Neben dem Fettgewebe enthielt die Leber die meiste Radioaktivität. Zur Identifizierung der Metaboliten in der Leber wurde Leberhomogenat jeweils mit und ohne Glucuronidase/Sulfatase-Behandlung aufgearbeitet (Abschnitt 2.5.6) und mittels HPLC und Radiodetektion untersucht. Ein Metabolit wurde gefunden, der durch die Behandlung mit Glucuronidase/Sulfatase zu HMP abgebaut wurde. Ein Metabolit mit der gleichen Retentionszeit wurde bei der Inkubation von ^{14}C -HMP mit UDP-Glucuronsäure in Gegenwart von Lebermikrosomen (Abschnitt 2.2.6) gefunden (Abb. 3.32). Beim Metaboliten mit der Retentionszeit von 8,6 min dürfte es sich daher

bei beiden Proben um das Glucuronsäure-Konjugat des HMP (MPGA) handeln. Einen zusätzlichen Beweis lieferte die wiederholte Analyse des Leberextraktes nach 14 d. Der als MPGA identifizierte Metabolit zersetzte sich zum Teil in eine Substanz, die mit HMP koeluierte (Daten nicht gezeigt).

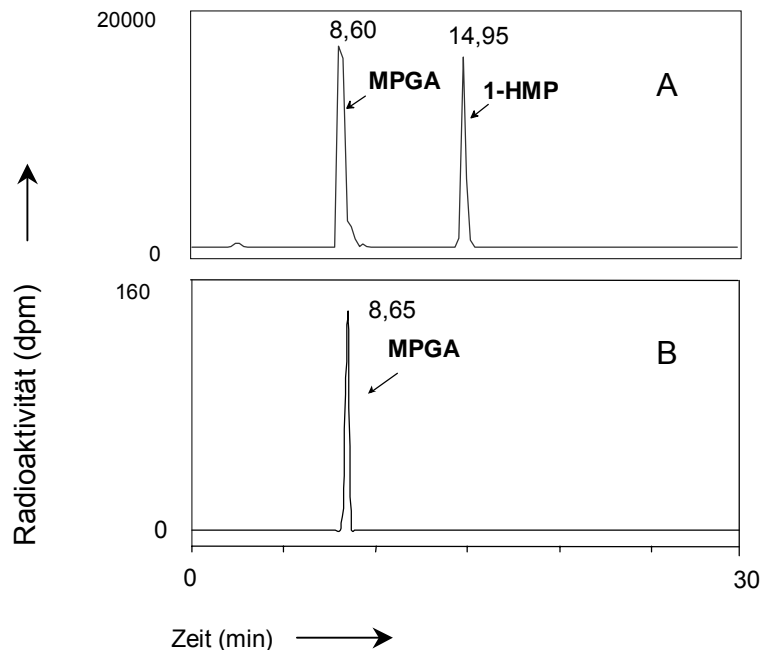


Abbildung 3.32 Identifizierung von MPGA in Leber: (A) Inkubationsansatz von ^{14}C -HMP mit UDP-Glucuronsäure in Gegenwart von Rattenlebermikrosomen (Abschnitt 2.2.6) (B) Leberextrakt.

3.3 Einfluss von Ethanol und Disulfiram auf die Aktivierung von 1-Hydroxymethylpyren (HMP)

Die vorangegangenen Resultate zeigten, dass nur ein kleiner Teil des HMP zu SMP aktiviert wird, während der größte Teil in seitenkette-oxidierte Form ausgeschieden wird. Aus dieser Tatsache ergab sich folgende, für eine Risikobeurteilung relevante Frage: Wird die Bildung des genotoxischen und kanzerogenen SMP durch Unterdrückung des oxidativen Stoffwechselweges begünstigt? Diese Hypothese sollte sich anhand der SMP-Plasmakonzentration, DNA-Addukthäufigkeit und deren Gewebeverteilung nach der Exposition schlüssig überprüfen lassen. Aus einer positiven Antwort ergäbe sich als nächste Frage, ob diese Veränderungen durch die

MPMA-Ausscheidung reflektiert wird. Diese Problemstellung sollte durch Analyse der Urin- und Faecesproben auf MPMA untersucht werden.

Ein Experiment, das diese Fragen beantworten könnte, setzt detaillierte Informationen über den oxidativen Stoffwechselweg voraus. Im ersten Schritt sollten daher die an der Oxidation von HMP beteiligten Enzyme durch Einsatz diagnostischer Inhibitoren bzw. An- oder Abwesenheit bestimmter Kofaktoren eingegrenzt werden. Dabei wurde angenommen, dass die oxidative Elimination von Alkoholen wie HMP oder Ethanol über ein Zwischenprodukt, den Aldehyd, zur entsprechenden Carbonsäure (Abb. 3.33) erfolgt. Es wurde die enzymatische Oxidation des HMP in den subzellulären Fraktionen der Rattenleber untersucht.

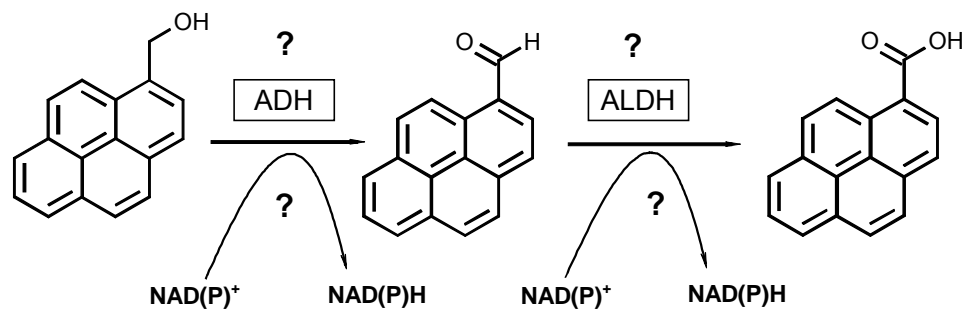


Abbildung 3.33 Vermuteter Weg für die enzymatischen Oxidation von HMP zu PCS.

Es ist naheliegend, dass die Enzyme Alkoholdehydrogenase (ADH) und Aldehyddehydrogenase (ALDH) an der Oxidation von HMP beteiligt sind. Eine Reihe von Substanzen hat eine inhibierende Wirkung auf ADH bzw. ALDH. In diesem Versuch wurden 4-Methylpyrazol als Inhibitor für ADH (Cornell *et al.* 1983) und Disulfiram (Bis-(diethylthiocarbamoyl)-disulfit, Tetraethylthiuramdisulfit, Antabus) als Inhibitor für ALDH verwendet (Peterson 1992). Anschließend wurde die Wirkung von Ethanol als ein nahrungsrelevantes kompetitives Substrat der ADH getestet.

3.3.1 Enzymatische Oxidation von 1-Hydroxymethylpyren (HMP) und Pyren-carboxaldehyd (PCA) *in vitro*

Basierend auf der in Abbildung 3.33 gezeigten Zweistufen-Hypothese wurde die Oxidation von HMP in zwei getrennten Schritten betrachtet: Der Oxidation von HMP zu PCA und der Oxidation von PCA zu PCS. Dazu wurde die enzymatische Aktivität verschiedener subzellulärer Fraktionen der Rattenleber untersucht. Die Bildung der

Endprodukte PCS und PCA wurde durch HPLC-Analyse anhand kommerziell verfügbarer Referenzen nachgewiesen und quantifiziert (System 1, Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1).

HMP wurde durch Lebercytosol, -mitochondrien und -mikrosomen der Ratte in Anwesenheit von NAD^+ und NADP^+ zu PCS oxidiert. Hierbei ist die Anwesenheit der Cofaktoren NAD^+ oder NADP^+ essenziell. NAD^+ scheint jedoch der bevorzugte Cofaktor zu sein. Nachfolgende Untersuchungen wurden deshalb ausschließlich mit NAD^+ durchgeführt. Im Vergleich zu den cytolischen und mitochondrialen Fraktion trugen die Mikrosomen nur unwesentlich zur Oxidation des HMP bei. Bei einer HMP-Menge von 200 nmol im Inkubationsansatz wurde weniger als 5 % des Substrats durch Mikrosomen umgesetzt, während mehr als 30 % des HMP durch Cytosol zu PCS oxidiert wurden. Das vermutliche Zwischenprodukt PCA wurde kaum beobachtet.

Bei Einsatz von PCA als Substrat erfolgte eine rasche Umsetzung zu PCS durch Rattenlebercytosol. Die Oxidation war nicht NAD^+ - oder NADP^+ -abhängig. Die mitochondriale und die mikrosomale Fraktion der Rattenleber zeigten dagegen eine NAD^+ - und NADP^+ -abhängige katalytische Aktivität gegenüber PCA. Auch hier wurde nur eine sehr geringe Beteiligung mikrosomaler Proteine beobachtet. NAD^+ wurde als Cofaktor gegenüber NADP^+ bevorzugt.

Zur Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit wurden zuerst Rahmenbedingungen festgelegt. Es wurde bei einem pH von 7,5 gearbeitet. Die Bestimmung der Umsatzrate erfolgte 10 min bei 37 °C mit einer Proteinmenge, die im Bereich lag, in dem die gebildete PCS-Menge mit der Proteinmenge im Ansatz linear zunahm. Einzelheiten sind dem Abschnitt 2.3.2 zu entnehmen.

Sofern eine nennenswerte Umsetzung stattfand, wurde die Umsatzgeschwindigkeit bestimmt (Tab. 3.5). Sowohl HMP als auch PCA wurden hauptsächlich durch cytosolische Enzyme oxidiert. Die Umsatzrate betrug dabei für HMP 1,48 und für PCA 1,10 nmol/mg Protein/min. Die Aktivität der mitochondrialen Enzyme betrug für HMP etwa ein Drittel und für PCA etwa ein Zwanzigstel der cytosolischen Enzyme (0,48 bzw. 0,06 nmol/mg Protein/min). Die Oxidation von PCA zu PCS scheint durch verschiedene cytosolische Enzyme katalysiert zu werden, die sich in ihrer

Abhängigkeit vom Cofaktor NAD^+ unterscheiden. So betrug die Umsatzrate in Anwesenheit von NAD^+ 1,10 nmol/mg Protein/min, während sie in Abwesenheit des Cofaktors bei nur 0,70 nmol/mg Protein/min lag. Der Befund besagt, dass für die Oxidation von PCA eine andere Substanz als NAD^+ oder NADP^+ hier als Elektronenakzeptor fungiert. Ein denkbare Oxidans könnte z.B. der im Inkubationsansatz gelöste Luftsauerstoff sein. Um dies zu überprüfen, wurden die Inkubationsansätze vor der Zugabe des PCA für 30 min mit Argon begast. Dadurch sollte zumindest ein Teil des gelösten Sauerstoffes aus der Lösung verdrängt worden sein. Durch die Begasung sank die Umsatzrate tatsächlich auf 60 % des ohne Begasung ermittelten Wertes. Der Befund war reproduzierbar. Ferner wäre auch eine Disproportionierung des PCA möglich. Das würde bedeuten, dass PCA selbst als Elektronendonator und -akzeptor diene und mit der PCS gleichzeitig eine äquivalente Menge an HMP entstünde. Zwar wurde HMP im Inkubationsansatz identifiziert, jedoch betrug die Menge des entstandenen HMP weniger als 1 % der gebildeten PCS. Damit dürfte eine Disproportionierung als Redoxmechanismus keine große Rolle gespielt haben.

Tabelle 3.5 Umsatzrate der enzymatischen Oxidation von HMP und PCA zu PCS in Leberzellfraktionen der weiblichen Ratte. Die Umsatzraten (Mittelwert \pm SD aus 4 Inkubationen) wurden durch die Quantifizierung der in 10 min gebildeten 1-PCS mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmt.

Substrat (20 μM)	Cofaktor (1 mM)	Umsatzrate (nmol / mg Protein / min)	
		Cytosol 0,88 mg Protein / ml	Mitochondrien 0,50 mg Protein / ml
HMP	NAD^+	$1,48 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,02$
PCA	NAD^+	$1,05 \pm 0,08$	$0,06 \pm 0,01$
PCA	-	$0,73 \pm 0,03$	keine Umsetzung

Um die Art der Enzyme weiter einzugrenzen, wurden diagnostische Inhibitoren eingesetzt. 4-Methylpyrazol stellt einen spezifischen ADH-Hemmer dar, während Disulfiram ALDH weitgehend inhibiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Die Oxidation von HMP durch cytosolische und mitochondriale Enzyme der Ratte ließ sich durch den Einsatz von 4-Methylpyrazol unterdrücken. In der eingesetzten

Konzentration von 1 mM bewirkte 4-Methylpyrazol eine Senkung der Umsatzrate auf 8 % (in Cytosol) bzw. 15 % (in Mitochondrien) der ohne Inhibitor beobachteten Aktivität (Tab 3.6). Disulfiram konnte die Umsatzrate des HMP durch die mitochondriale Fraktion der Rattenleber auf 9 % herabsetzen, während sein Einfluss auf den Umsatz des HMP durch das Cytosol nicht ausgeprägt war (Reduktion um 32 %). Die Wirkung des Ethanol als kompetitiver Inhibitor der ADH auf die Oxidation von HMP war mäßig. Er reduzierte die Umsatzrate auf 27 % (Cytosol) bzw. 42 % (Mitochondrien). Die Oxidation des PCA durch NAD⁺-unabhängige Enzyme (cytosolisch) wurde durch keinen der Inhibitoren beeinflusst. Die NAD⁺-abhängige Oxidation (sowohl in Cytosol als auch in Mitochondrien) dagegen konnte durch 1 mM Disulfiram auf etwa 70 % der ursprünglichen Umsatzrate reduziert werden. Eine inhibierende Wirkung von Ethanol und 4-Methylpyrazol in den jeweils eingesetzten Konzentrationen auf die NAD⁺-abhängige Oxidation von PCA war hier nicht erkennbar (Tab 3.6).

Tabelle 3.6 Relative Umsatzraten der enzymatischen Oxidation von HMP und PCA zu PCS durch Leberzellfraktionen weiblicher Ratten in Gegenwart verschiedener Inhibitoren. Die relative Geschwindigkeit wurde errechnet aus der Aktivität in Anwesenheit des Inhibitors dividiert durch den Mittelwert der Aktivität in Abwesenheit des Inhibitors. Es wurden jeweils vier Messungen durchgeführt.

		% der Umsatzrate ohne Inhibitor		
		Disulfiram	4-Methylpyrazol	Ethanol
		1 mM	1 mM	43,5 mM
HMP (25 µM)	Cytosol	68 ± 1	8 ± 1	27 ± 3
	Mitochondrien	9 ± 1	15 ± 1	42 ± 1
PCA (25 µM)	Cytosol (ohne NAD ⁺)	109 ± 2	117 ± 14	109 ± 3
	Cytosol (mit NAD ⁺)	77 ± 8	- ^a	- ^a
	Mitochondrien	70 ± 2	94 ± 2	107 ± 7

^a nicht bestimmt

3.3.2 Einfluss von Disulfiram und Ethanol auf die 1-Sulfooxymethylpyren (SMP)-Konzentration im Plasma, die DNA-Addukthäufigkeit in der Leber und die Ausscheidung der Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) *in vivo*

Die Oxidation spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Elimination und Detoxifizierung des HMP in der Ratte. Störungen des oxidierenden Systems könnten dazu führen,

dass HMP im Körper akkumuliert und so die Bildung des reaktiven SMP begünstigt. Diese Hypothese lässt sich durch Inhibition der an der Oxidation beteiligten Enzyme in der Ratte überprüfen. Die Veränderungen in der Umsetzung von HMP zu SMP können hierbei durch die SMP-Konzentration im Plasma, die DNA-Addukthäufigkeit und die MPMA-Ausscheidung erfasst werden. Erstere stellt eine direkte Konsequenz der Toxifizierung dar, während die anderen zwei Parameter als indirekte Folge der Aktivierung einen Biomarker-Charakter besitzen.

Disulfiram, 4-Methylpyrazol und Ethanol konnten *in vitro* die Oxidation von HMP bzw. PCA verringern. Disulfiram als nicht kompetitiver ALDH-Inhibitor und Ethanol als kompetitives Substrat der ADH wurden für die *in vivo* Untersuchungen ausgewählt. Vor der HMP-Applikation wurden die Versuchstiere mit Disulfiram oder Ethanol gemäß Abschnitt 2.4.6 behandelt. Die Plasmakonzentration von SMP, die DNA-Addukthäufigkeit in der Leber und die Ausscheidung von MPMA wurden bestimmt. Angesichts des geringen Probenumfangs ist die Schlüssigkeit einer statistischen Analyse zwar eingeschränkt, um tendenzielle Wirkungen darzustellen, wurde sie dennoch durchgeführt. Aufgrund der geringen Probenzahl waren Tests auf Normalverteilungen nicht angebracht. Daher schied der t-Test, der diese voraussetzt, aus. Als Alternative wurde hier der U-Test von Mann-Whitney, der bei unbekannter Verteilung und stetigem Parameter geeignet ist, eingesetzt (Hartung *et al.* 1999). Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % festgesetzt.

3.3.2.1 Plasmakonzentration von 1-Sulfooxymethylpyren (SMP) nach 1-Hydroxymethylpyren (HMP)-Behandlung

Für die Analytik von SMP wurden Plasmaproben nach zehnminütiger Zentrifugation von Sedimenten befreit und direkt zur LC-MS-MS-Analyse eingesetzt (System 3 in Tab. 2.1, Abschnitt 2.5.1). Die Detektion erfolgte über MS/MS im MRM-Modus (m/z 311 \rightarrow 96, Tab. 2.2, Abschnitt 2.5.1). Die Nachweisgrenze von SMP im Plasma lag bei 0,10 μ M.

Bereits kurze Zeit (15 min) nach der i.p. Applikation von HMP konnte SMP im Plasma der Versuchstiere nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In diesem Versuch wurden Plasmaproben 3 h bzw. 24 h nach der HMP-Applikation auf SMP untersucht. Während SMP 3 h nach der Behandlung im Plasma aller behandelten Tiere

identifiziert werden konnte, lag die Konzentration nach 24 h unter der Nachweisgrenze. Abbildung 3.34 zeigt die Plasmakonzentration des SMP 3 h nach der Applikation. Die Originaldaten sind der Tabelle 7.7 des Anhangs zu entnehmen. Im Allgemeinen war eine große interindividuelle Variabilität der SMP-Konzentration in allen drei Behandlungsgruppen zu beobachten. Die Distanz zwischen dem Median und dem arithmetischen Mittel der SMP-Konzentration beschreibt die Variabilität in der jeweiligen Gruppe, welche in den mit Disulfiram vorbehandelten männlichen Ratten besonders ausgeprägt war.

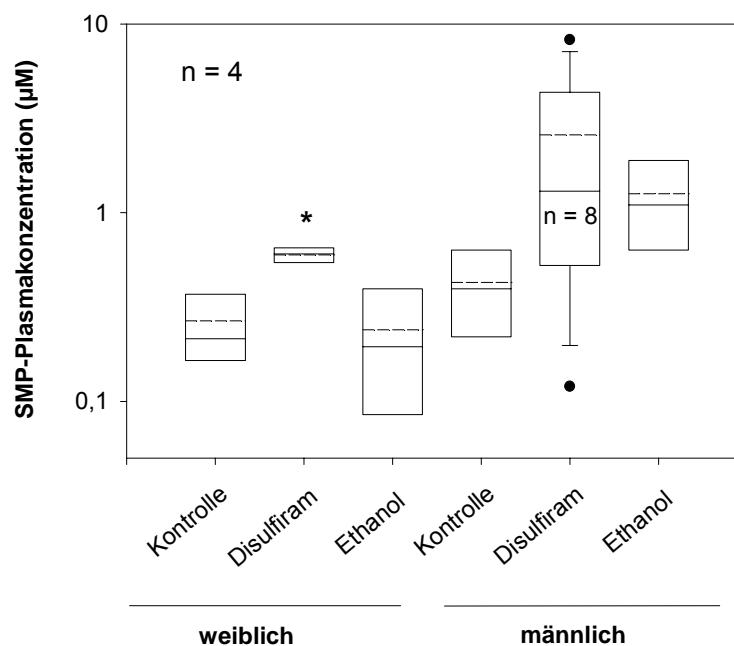


Abbildung 3.34 Box-plot-Diagramm zum Vergleich der SMP-Plasmkonzentration nach Behandlung von Ratten mit HMP in verschiedenen Gruppen. Die Boxen umfassen die 25 bzw. 75%igen Perzentilen. Bei der männlichen Disulfiram-Gruppe wurden die 10 und 90 %igen Perzentilen dargestellt. Die Punkte zeigen die Ausreißer an. Die durchgezogenen Linien in der Box stellen die Mediane dar und die gebrochenen Linien die arithmetischen Mittelwerte. * zeigt die statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle des gleichen Geschlechtes an.

Es wurde zuerst bei jeder Behandlungsgruppe (die Kontrollgruppe, die Disulfiramgruppe und die Ethanolgruppe) auf Geschlechtsunterschiede geprüft. Da bei der mit Disulfiram behandelten Gruppe ein signifikanter Geschlechtsunterschied beobachtet wurde, waren beide Geschlechter einzeln zu betrachten. So wurde ein signifikanter Unterschied des SMP-Plasmalevels der behandelten Weibchen ($P =$

0,029) gegenüber dem der Kontrollgruppe festgestellt, während die Daten der Männchen trotz des deutlich erhöhten Medianwertes gegenüber dem Kontrollwert wegen der äußerst starken Variationen keine Signifikanz ($P = 0,154$) aufwiesen. Der Effekt von Ethanol auf die SMP-Plasmakonzentration ist nicht eindeutig. Während bei den weiblichen Tieren die Werte im Bereich der Kontrolle lagen, wurde bei den Männchen eine leichte Erhöhung festgestellt. Diese Erhöhung ist jedoch mit 4 Tieren je Gruppe statistisch nicht signifikant ($P = 0,114$).

3.3.2.2 DNA-Addukthäufigkeit in der Leber

Die Bestimmung der DNA-Addukthäufigkeit in der Leber erfolgte mittels ^{32}P -Postlabelling. In Tabelle 7.8 des Anhangs sind die Daten für die DNA-Addukthäufigkeit der Leber 3 h und 24 h nach der HMP-Applikation zusammengefasst. Die Abbildungen 3.35 und 3.36 veranschaulichen den Einfluss von Disulfiram und Ethanol auf die DNA-Adduktbildung der Leber 3 h bzw. 24 h nach der HMP-Applikation.

Bei den weiblichen Tieren, die 3 h nach der HMP-Applikation getötet worden waren, konnten nur bei den mit Disulfiram vorbehandelten Ratten signifikante Unterschiede ($P = 0,029$) in der DNA-Addukthäufigkeit festgestellt werden (Abb. 3.35). Die Addukthäufigkeit bei den mit Ethanol vorbehandelten Tieren dagegen unterschied sich kaum von den Kontrollen ($P = 0,686$). Bei den nach 3 h getöteten Männchen erwies sich die leichte Zunahme der DNA-Adduktmenge durch Vorbehandlung mit Disulfiram ($P = 0,570$) bzw. Ethanol ($P = 0,114$) als statistisch nicht signifikant. Eine auffällige Inhomogenität in der Addukthäufigkeit war bei den vorbehandelten männlichen Ratten zu finden, die bei den mit Disulfiram vorbehandelten Tieren besonders ausgeprägt war. Die eine Hälfte der Tiere wies eine 5- bis 10-fache Erhöhung der DNA-Addukthäufigkeit (1800 bis 6100 Addukte/ 10^8 Nukleotide) gegenüber der Kontrollgruppe (150 bis 300 Addukte/ 10^8 Nukleotide) auf, während bei der anderen Hälfte keine Veränderung zu beobachten war.

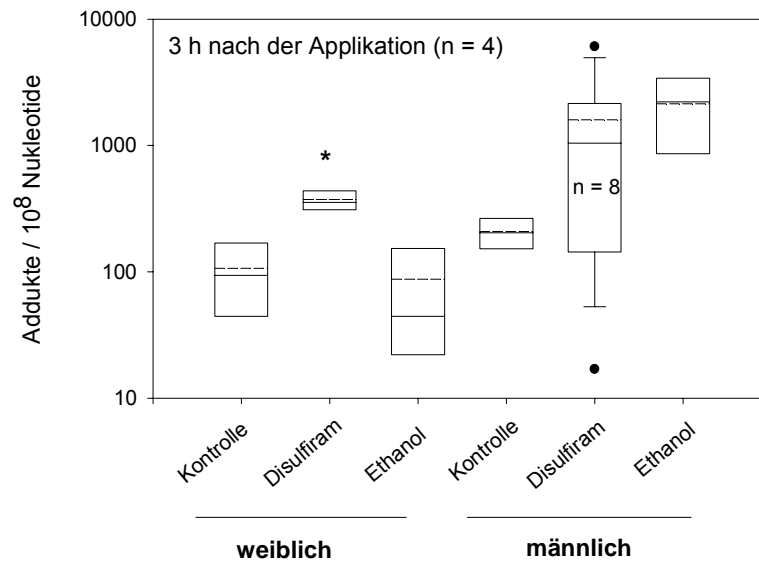


Abbildung 3.35 Box-Plot-Diagramm zum Vergleich der DNA-Addukthäufigkeit in der Leber nach der Behandlung mit HMP. Die Tiere wurden 3 h nach der HMP-Applikation getötet. Die Boxen umfassen die 25- bzw. 75-%igen Perzentilen. Das Zeichen * zeigt die Gruppe, bei der eine statistisch signifikante Erhöhung der DNA-Addukthäufigkeit gegenüber entsprechenden Kontrollen festgestellt wurde. Die Punkte zeigen die Addukthäufigkeit der Ausreißer. Die durchgezogenen Linien zeigen die Lage der jeweiligen Mediane an. Die unterbrochenen markieren die Lage der arithmetischen Mittelwerte.

Bei Tieren, die 24 h nach der HMP-Applikation getötet wurden, führte die Vorbehandlung mit Disulfiram weder bei den Männchen ($P = 0,486$) noch bei den Weibchen ($P = 0,343$) zu einer signifikanten Erhöhung der Addukthäufigkeit (Abb. 3.36). Ethanol dagegen bewirkte eine deutliche Zunahme der Addukthäufigkeit in der Leber bei den Weibchen, welche statistisch abgesichert werden konnte ($P = 0,029$).

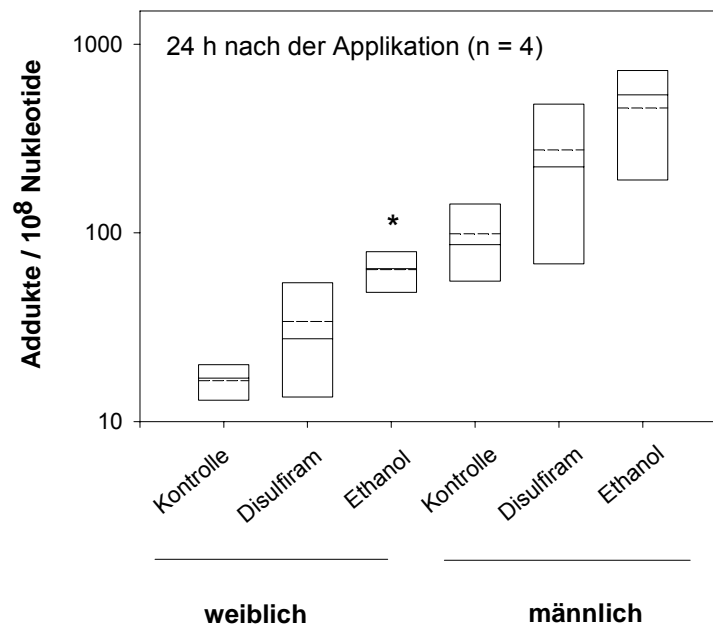


Abbildung 3.36 Box-Plot-Diagramm zum Vergleich der DNA-Addukthäufigkeit in der Leber. Die Tiere wurden 24 h nach der HMP-Applikation getötet. Die Boxen umfassen die 25 bzw. 75%igen Perzentilen. Das Zeichen * zeigt die Gruppe, bei der eine statistisch signifikante Erhöhung der DNA-Addukthäufigkeit gegenüber entsprechenden Kontrollen festgestellt wurde. Die durchgezogenen Linien zeigen die Lage der jeweiligen Mediane an. Die durchbrochenen markieren die Lage der arithmetischen Mittelwerte.

3.3.2.3 Die Ausscheidung der Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA)

Die über 24 h gesammelten Urin- und Faecesproben wurden auf MPMA untersucht. Die Ausscheidung in Urin und Faeces ist in der Tabelle 7.9 des Anhangs zusammengefasst. Der Einsatz von Disulfiram und Ethanol rief eine Änderung der MPMA-Ausscheidung nach der Applikation von HMP hervor (Abb. 3.37). Anhand der vorliegenden Daten konnte eine signifikante Erhöhung der MPMA-Ausscheidung nur bei den mit Ethanol vorbehandelten weiblichen Ratten gegenüber den nicht vorbehandelten Kontrolltieren festgestellt werden ($P = 0,030$). Die tendenziell leichte Erhöhung der MPMA-Ausscheidung bei den vorbehandelten Männchen ($P = 0,343$ für Disulfiramgruppe, $P = 0,114$ für Ethanolgruppe) sowie bei den mit Disulfiram

vorbehandelten Weibchen ($P = 0,114$) sind aufgrund der zum Teil sehr starken interindividuellen Unterschiede statistisch nicht belegbar.

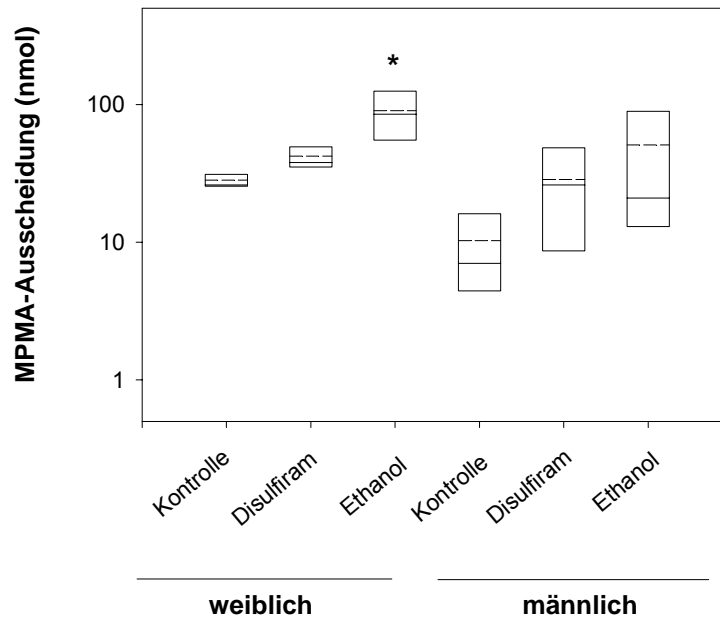


Abbildung 3.37 Box-Plot-Diagramm zum Vergleich der MPMA-Ausscheidung nach der Behandlung von Ratten mit HMP bei verschiedenen Gruppen. Die Boxen umfassen die 25- bzw. 75-%igen Perzentile. Das Zeichen * zeigt die Gruppe, bei der eine statistisch signifikante Erhöhung an ausgeschiedener MPMA gegenüber entsprechenden Kontrollen festgestellt wurde. Die durchgezogenen Linien zeigen die Lage der jeweiligen Mediane an. Die durchbrochenen markieren die Lage der arithmetischen Mittelwerte.

4. Diskussion

Die Entstehung entsprechender DNA-reaktiver Spezies ist eine Begleiterscheinung der Elimination verschiedener Fremdstoffe. Diverse endogene und exogene Faktoren entscheiden über die individuelle Suszeptibilität gegenüber präkanzerogenen Stoffen. Im Hinblick auf die übergeordnete Fragestellung, ob Mercaptursäuren und Nukleosidaddukte als Biomarker für die Belastung mit Methylpyren (MP) geeignet sind, waren die Ausscheidung der Mercaptursäure (MPMA) und eines der ausscheidbaren Nukleosidaddukte (MPdG) sowie darauf einflussnehmende Faktoren Gegenstand dieser Arbeit.

4.1 Die Ausscheidung der Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) und des N^2 -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosins (MPdG) als Resultat der Bioaktivierung

Die Ausscheidung von MPMA und MPdG wurde als Resultat der Aktivierung von HMP zu SMP postuliert (Abb 3.1). Die Bestätigung dieser Hypothese war die Voraussetzung für weitere Untersuchungen, so dass ihr schrittweise nachgegangen wurde. MPMA ist nicht das direkte Produkt der Konjugation von SMP mit GSH, sondern ein Folgeprodukt. Es wurde daher zunächst *in vitro* untersucht, ob eine Konjugation des SMP mit GSH stattfand und ob diese Reaktion enzymkatalysiert war. Es war von Interesse zu untersuchen, bis zu welchem Umfang SMP konjugiert würde und welche Organe dazu beitragen. Des Weiteren wurde die Ausscheidung von MPMA und MPdG in MP-, HMP- bzw. SMP-behandelten Ratten untersucht.

4.1.1 GSH-Konjugation von 1-Sulfooxymethylpyren (SMP) *in vitro*

In vitro Inkubationen von SMP mit Cytosolpräparationen verschiedener Organe in Anwesenheit von GSH bestätigten die Bildung des GSH-Konjugates MPSG. Der Befund, dass in Abwesenheit des Cytosols keine detektierbaren Mengen an MPSG gebildet wurden, machte deutlich, dass die katalytische Aktivität der GST für die Detoxifizierung des SMP von essenzieller Bedeutung war. Laut Literatur werden einige reaktive benzyliche Sulfatester besonders effizient durch Yrs-Yrs´ und Yrs´-

Yrs', Enzyme der Theta-Familie (GSTT), metabolisiert (Hiratsuka *et al.* 1990; 1994). Es lässt sich deshalb vermuten, dass die Enzyme der GSTT auch an der GSH-Konjugation des SMP beteiligt sind. In Übereinstimmung mit der Literatur (Hiratsuka *et al.* 1990), in der das Protein Yrs-Yrs mittels Immunoblot-Analyse in zahlreichen Organen der Ratte (Leber, Niere, Nebenniere, Lunge, Dünndarm, Muskel und Gehirn) identifiziert wurde, konnte hier eine katalytische Aktivität gegenüber SMP in allen untersuchten Organen festgestellt werden. Cytosolische Präparationen der Leber, der Niere, der Lunge und des Colons wurden detailliert untersucht. Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen konnte kein Bereich identifiziert werden, in dem die gebildete MPSG-Menge mit der Proteinmenge linear zunahm. Dieses Phänomen könnte eventuell durch eine Produkthemmung erklärt werden. Um trotzdem einen Einblick in die katalytische Aktivität zu erlangen, wurde hier der Kompromiss eingegangen, die Umsatzraten in einem semilinearen Bereich zu bestimmen (Abschnitt 2.3.1). Die ermittelten Umsatzraten bewegten sich zwischen 700 und 6000 pmol/mg Protein/min. Die Autoren Hiratsuka *et al.* (1990) beschrieben eine etwa 900-fach erhöhte Umsatzrate (1-Sulfooxymethylnaphthalin als Substrat) des gereinigten rGSTT2 im Vergleich zu Cytosol. Demzufolge könnte die Umsatzrate des gereinigten Enzyms gegenüber SMP bis zu einigen $\mu\text{mol/mg Protein/min}$ betragen, welches bis zu 25 mal höher als die spezifische Aktivität der rGSTT2 gegenüber dem mit SMP strukturverwandten Substrat 1-Sulfooxymethylnaphthalin ($0,17 \mu\text{mol/mg Protein/min}$) wäre (Hiratsuka *et al.* 1990; 1994).

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass SMP effektiv durch die GST der Ratte zum entsprechenden GSH-Konjugat MPSG umgesetzt wurde. Die katalytische Aktivität war in Leber, Niere, Lunge und Colon vorhanden.

4.1.2 Die Ausscheidung von Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) durch 1-Methylpyren (MP)-, 1-Hydroxymethylpyren (HMP)-, bzw. 1-Sulfooxymethylpyren (SMP)-behandelte Ratten

MPMA konnte im Urin sowohl HMP-behandelter Tiere als auch MP-behandelter Tiere nachgewiesen werden. Soweit untersucht, konnte MPMA auch in Plasma und Faeces der Versuchstiere identifiziert werden. Bei der Behandlung mit HMP wurden in Urin und Faeces bei den Weibchen 560 bis 2010 ppm der Dosis und bei den Männchen 50 bis 590 ppm der Dosis gefunden. Die mit MP exponierten männlichen

Ratten schieden 18 bis 114 ppm der Dosis als MPMA in Urin aus. Das liegt in der selben Größenordnung wie die renale MPMA-Exkretion in 48 h nach HMP Behandlung (19 bis 228 ppm, Tab. 7.2 und 7.5 im Anhang). Die Bildung von MPMA war ein indirekter Nachweis dafür, dass der reaktive Metabolit SMP tatsächlich gebildet worden war und die Hydroxylierung der Seitenkette und die anschließende Sulfonierung das kanzerogene Prinzip des MP darstellen. Die Menge, die insgesamt als MPMA ausgeschieden wurde, war mit weit weniger als 1 % der Dosis bemerkenswert gering. Moderat höhere Ausscheidungen an Mercaptursäuren (MA) waren nach Applikation von Benzylalkohol oder 1-Methylnaphthalin an Ratten in älterer Literatur gezeigt worden. Demnach waren je nach Dosis und Applikationsart 0,8 bis 5 % der Dosis als Benzyl-MA bzw. 1-Methylnaphthyl-MA im Urin der Versuchstiere detektiert worden (Clapp & Young 1970; van Doorn *et al.* 1981). Daraus ergab sich die Frage, ob die geringe MPMA-Ausscheidung auf der geringen Bildung von SMP beruhte. Um dies zu beantworten, wurden Ratten direkt mit äquimolaren Mengen an SMP behandelt und der ausgeschiedene Urin auf MPMA untersucht.

Obwohl durch die direkte Verabreichung von SMP keine Bildung des reaktiven Metaboliten über Phase I und Phase II Metabolismus notwendig war, wurden über den gesamten Zeitraum (3 bzw. 6 Tage) weniger als 0,6 % der Dosis als MPMA renal ausgeschieden. Faeces waren hier nicht untersucht worden, da aber bislang 75 bis 90 % der insgesamt ausgeschiedenen MPMA bei den weibliche Ratten im Urin zu finden gewesen waren (Tab. 7.4 im Anhang), dürfte auch hier die über Faeces ausgeschiedene MPMA-Menge nicht wesentlich zur Gesamtausscheidung beigetragen haben. Mögliche Ursachen für die geringe Ausscheidung könnten für die Aussage, ob MPMA die Bildung von reaktivem SMP widerspiegelt, und so als Biomarker geeignet wäre, entscheidend sein. Im Folgenden werden die möglichen Ursachen diskutiert.

Die effektive GSH-Konjugation ist eine Grundvoraussetzung dafür, dass MPMA als Parameter der SMP-Bildung fungieren kann. Die ermittelten Ergebnisse zeigen, dass SMP durch Cytosol der Rattenleber bis zu einer Substratkonzentration von 8 μM nahezu vollständig mit GSH konjugiert wurde. Die ermittelten Umsatzraten deuten auf eine hohe katalytische Aktivität der entsprechenden Enzyme in verschiedenen

Organen hin. Es ist daher zu vermuten, dass SMP *in vivo* ebenfalls effektiv mit GSH konjugiert wird.

Eine andere Ursache für die geringe MPMA-Ausscheidung könnte eine Depletion des GSH darstellen. Insgesamt wurden weniger als 250 nmol MPMA im Urin gefunden. Die Menge ist erheblich niedriger als die GSH-Gehalte in den Geweben, welche bis zu 100 μmol in der Leber (10 mM, Lebergewicht 10 g), bis zu 25 μmol im Gastrointestinaltrakt (5 mM, 5 g Gewebe) (Siegers *et al.* 1988) und bis zu 0,15 μmol in Plasma (18 μM , 8 ml Plasma) (Kretzschmar 1996) betragen. Eine Depletion des GSH erscheint deshalb unwahrscheinlich.

Ferner könnte die schnelle Hydrolyse von SMP zu HMP von Bedeutung sein. So beträgt die Halbwertszeit von SMP in Wasser (37 °C) 2 min bis 6 min (Landsiedel *et al.* 1996; Kuhlow 2001). Zwar wird SMP durch Bindung an Albumin stabilisiert, (Kuhlow 2001), doch dürfte diese Tatsache in der Bauchhöhle nicht relevant sein, da Albumin dort nicht vorkommt. Daher ist ein teilweiser Zerfall zu HMP vor der Resorption aus der Bauchhöhle zu erwarten.

Weiterhin liegt SMP bei physiologischem pH-Wert in ionischer Form vor (pK_a 0,4) (Landsiedel *et al.* 1996) und ist folglich nicht membrangängig. So könnte eine eingeschränkte Resorption aus der Bauchhöhle einen zusätzlichen reduzierenden Faktor für die SMP-Menge darstellen, die in die Gewebe gelangt und mit GSH konjugiert werden kann. In einem anderen Experiment wurde die SMP-Konzentration im Plasma von mit SMP behandelten Ratten (250 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ KM, i.p.) bestimmt. Die höchste SMP-Konzentration wurde bei dem frühest untersuchten Zeitpunkt (15 min) gefunden. Sie betrug 100 bis 200 μM im Plasma (Daten nicht gezeigt). Unter der Annahme, dass die Substanz sich nur in der Blutbahn verteilt, entspräche dies einer SMP-Resorption aus der Bauchhöhle von 2 - 4 %. Geht man jedoch von einer gleichmäßigen Verteilung im ganzen Körper aus, so käme man auf bis zu 80 % der Dosis.

Sulfatester können Membranen aufgrund ihres ionogenen Charakters nur mit Hilfe entsprechender Carrierproteine durchqueren (Pang *et al.* 1994). Ein eingeschränkter aktiver Transport des SMP würde die erst genannte Hypothese der Verteilung nur in

der Blutbahn unterstützen. Es ist zwar bekannt, dass die Sulfatester einiger Gallensäuren z. B. durch Na⁺-abhängige Carrierproteine in Hepatocyten transportiert werden (Eng 1983; Stremmel *et al.* 1993). Die Substratspezifität und die Organverteilung der Carrierproteine anderer Sulfatester ist heute jedoch noch weitgehend unbekannt. Gelangt SMP in die Blutbahn, stellt der Übergang von der Blutbahn zu den Geweben eine weitere Barriere dar. Der Carrier-vermittelte Transport aber ist im Allgemeinen durch Plasmaprotein-Bindung entsprechender Sulfatester zusätzlich eingeschränkt. Für den Sulfatester des Acetaminophens, der eine starke Neigung zur Plasmaprotein-Bindung besitzt, wurde eine sehr niedrige Influxrate in perfundierte Rattenleber beschrieben (Goresky *et al.* 1992). Da SMP ebenfalls stark an Plasmaprotein bindet (Kuhlow 2001), ist es möglich, dass appliziertes SMP nur schlecht in die Organe aufgenommen wird. Für die zweite Annahme, eine gleichmäßige Verteilung im ganzen Körper, spräche der Befund, dass DNA-Addukte des SMP in allen untersuchten Geweben zu finden waren (Kuhlow 2001). Die Organverteilung der Addukte ist jedoch bei weitem nicht homogen, was mit einer Verteilung des Carrierproteins zusammenhängen könnte.

Die dargelegten Annahmen stellen zwei Grenzfälle dar. Aus den vorliegenden Daten geht lediglich hervor, dass ein Teil des applizierten SMP aus der Bauchhöhle resorbiert wurde und in die Organe transportiert wurde. Eine abschließende Bewertung der beiden Annahmen ist auf dieser Datenbasis nicht möglich. Es ist jedoch anzunehmen, dass alle angesprochenen Faktoren die SMP-Resorption aus der Bauchhöhle und seine Verteilung beeinflussen. Die Problematiken sind jedoch nicht auf MP und HMP zu übertragen. Bei Applikation von MP und HMP ist aufgrund der hohen Lipophilie beider Substanzen von einer raschen Resorption aus dem Peritonealraum und einer ungehinderten Verteilung in die Organe auszugehen. SMP wird dabei intrazellulär gebildet. Seine Konjugation mit GSH ist dabei von der Aktivität und Lokalisation der GST und des GSH abhängig. Die Frage, ob die geringe MPMA-Ausscheidung nach HMP-Applikation auf die geringe SMP-Bildung zurückzuführen ist, kann durch diesen Versuch nicht beantwortet werden.

Die mit SMP behandelten Tieren starben 3 d bzw. 6 d nach der Applikation. Bei der Sektion nach dem Tod der Tiere wurden hämorrhagisch entzündeter Dünndarm und Dickdarm sowie blutiges Gewebswasser im Bauchraum festgestellt. Die lokale akute

Toxizität des SMP könnte mit einer Bildung von CMP zusammenhängen. SMP kann in Anwesenheit von Chloridionen zum reaktiven, membrangängigen Chloromethylpyren (CMP) reagieren. So führten Chloridionen im Medium zu erhöhter Mutagenität des SMP in *Escherichia coli* (Glatt *et al.* 1994b) bzw. *Salmonella typhimurium* (Glatt *et al.* 1990). Dieser Mechanismus kann auch hier eingreifen. In der Peritonealflüssigkeit sind Chloridionen, ähnlich wie im übrigen extrazellulären Raum (120 mM), in hoher Konzentration vorhanden. Ein Teil des applizierten SMP könnte hier zu CMP umgesetzt und so aufgenommen worden sein. Da CMP eine Halbwertszeit von einigen Sekunden hat (Glatt *et al.* 1994), dürfte dies hauptsächlich in der Nähe des Applikationsortes im Gastrointestinaltrakt zu übermäßigen Protein- und DNA-Schädigungen geführt haben. Die Bildung des reaktiven Sekundärmetaboliten ist daher eine plausible Erklärung der beschriebenen Symptome.

Ein weiterer Aspekt des *in vivo* Versuchs besteht in dem Geschlechtsunterschied der MPMA-Ausscheidung. Bei gleicher Dosis scheiden weibliche Ratten prozentual wesentlich mehr MPMA aus als die männlichen. Diesem Befund liegen wahrscheinlich höhere Sulfonierungsraten in weiblichen Ratten zugrunde. Glatt *et al.* (1994c) konnten zeigen, dass HMP in stärkerem Maße durch Lebercytosol weiblicher Ratten als durch solches von Männchen aktiviert wird. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich darauf, dass benzyllische hydroxylierte Methylarene hauptsächlich durch die Hydroxysteroid-Sulfotransferase zu entsprechenden reaktiven Sulfatestern umgesetzt werden, die geschlechtsspezifisch in der weiblichen Ratte exprimiert ist (Ogura *et al.* 1990). Die stärkere Aktivierung könnte eine höhere DNA-Adduktbildung zur Folge haben. Entgegen den Erwartungen stellte Kuhlow (2001) jedoch fest, dass die DNA-Addukthäufigkeit in allen untersuchten Geweben bei männlichen Ratten deutlich höher war als bei Weibchen. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass der Nettoeffekt der Toxifizierung und Detoxifizierung in Weibchen zu Gunsten der Detoxifizierung verschoben war. Dafür spricht auch die höhere MPMA-Ausscheidung bei weiblichen Ratten.

Im Bezug auf den Ausscheidungsweg von MPMA schien es ebenfalls einen Geschlechtsunterschied zu geben. Während bei weiblichen Ratten die renale Exkretion (69-88 % der Gesamtausscheidung in 48 h) bevorzugt war, überwog bei

den männlichen die Ausscheidung über Faeces (49-78 %). Gleichartige Präzedenzfälle für andere Substanzen wurde in der Literatur nicht gefunden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl HMP als auch MP *in vivo* als entsprechende Mercaptursäure MPMA ausgeschieden wurden. Die Exkretion als MPMA spielt mengenmäßig jedoch nur eine untergeordnete Rolle im Metabolismus beider Substanzen. Aufgrund der unterschiedlichen Resorptions- und Verteilungskinetik von exogen zugefügtem und endogen gebildetem SMP sagen die durch direkte Applikation von SMP gewonnenen Daten wenig darüber aus, in welchem Umfang endogen gebildetes SMP als MPMA ausgeschieden wurde. Ein Geschlechtsunterschied wurde hinsichtlich der prozentual ausgeschiedenen MPMA-Menge festgestellt. Die höhere MPMA-Ausscheidung in weiblichen Ratten lässt sich im Wesentlichen wahrscheinlich auf die höher exprimierte Hydroxysteroid-SULT und eine folglich höhere Sulfonierungsrate der weiblichen Ratten zurückführen. Da ein Geschlechtsunterschied hinsichtlich der Ausscheidungswege bestand, werden die renalen und die biliären MPMA-Exkretionen in den im Folgenden diskutierten Versuchen als Summe betrachtet.

4.1.3 Ausscheidung von N^2 -(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin (MPdG)

MPdG konnte nur in zwischen 12 und 24 h nach der Applikation gesammeltem Urin SMP-behandelter Tiere identifiziert werden. Die Menge des in diesem Zeitraum ausgeschiedenen MPdG war mit weniger als 0,9 bzw. 0,4 ppm der Gesamtdosis extrem gering. Der Urin in den ersten 12 h nach der Applikation, welcher für eine Einschätzung des MPdG wichtig war, war alle 3 h gesammelt und parallel für die MPMA-Bestimmung verwendet worden. So stand nur wenig Untersuchungsmaterial (50 bis 300 μ l) zur Verfügung. Durch die Aufarbeitung konnte keine hohe Aufkonzentrierung erzielt werden. Die MPdG-Konzentrationen der Proben lagen unter der Detektionsgrenze. So lag auch die MPdG-Menge der gepoolten Urinproben von 24 bis 48 h, von 48 bis 72 h sowie die der Faecesproben vom Zeitpunkt der Applikation bis 48 h unter der Detektionsgrenze. Der Befund war angesichts der hohen DNA-Addukthäufigkeit 15 min nach der Applikation (12000 Addukte/10⁸ Nukleotide in der Niere und 8000 in der Leber) unerwartet.

Bei den mit HMP und MP behandelten Tieren konnte in 24-h-Urin bzw. Faecesproben trotz der deutlich größeren Probenmengen (bis zu 5 ml Urin bzw. 1 g Faeceshomogenat), die verwendet wurden, kein MPdG nachgewiesen werden.

Folgende Erklärungen sind für diese Befunde in Betracht zu ziehen. Zum einen könnte bei HMP-behandelten Tieren die ausgeschiedene Menge an MPdG unterhalb des Detektionslimits gelegen haben. Zum anderen könnte bei SMP-behandelten Tieren der größte Teil des Nukleosidadduktes in den ersten 12 h ausgeschieden worden sein, welches durch fehlende Aufkonzentrierung nicht detektierbar war. Zuletzt könnte MPdG, wider Erwarten, nicht das Hauptausscheidungsprodukt der DNA-Addukte darstellen.

Hinsichtlich der Detektionsgrenze gelten folgende Überlegungen: Bei mit HMP behandelten Tieren wurden Urin und Faeces über 24 h gesammelt und auf MPdG untersucht. Die DNA-Addukthäufigkeit in der Leber der mit HMP behandelten Tiere lag anfangs (15 min) im Schnitt bei 1000 Addukten/ 10^8 Nukleotide. Bei extrem effizienter Reparatur und Ausscheidung innerhalb von 24 h, was von der Datenlage her zu erwarten gewesen wäre, würde sich rechnerisch eine Exkretion von 500 pmol MPdG ergeben¹. Diese Menge läge sehr weit über dem Detektionslimit (100 fmol pro Injektion).

Bei der Untersuchung von Urinproben SMP-behandelter Tiere könnte die MPdG-Ausscheidung in den ersten 12 h eine entscheidende Rolle für das Gesamtbild gespielt haben. Dafür spricht die kurze Halbwertszeit (etwa 30 min) der Addukte im Gewebe HMP-behandelter Tiere. Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass die meisten Addukte bereits in den ersten 12 h ausgeschieden worden waren. Die Addukthäufigkeit betrug jedoch 6 Tage nach der Behandlung noch 2500 pro 10^8 Nukleotide in der Niere und 2000 in der Leber. Zwischen 12 und 24 h nach der Applikation dürfte der Adduktspiegel also um ein Vielfaches höher gewesen sein. Selbst bei gleicher DNA-Addukthäufigkeit wie nach 6 Tagen hätte rechnerisch erheblich mehr MPdG im Urin sein müssen als identifiziert wurde. Denn auch hier gilt

¹ Es wird angenommen, dass 40 % der Addukte an die exocyclische Aminogruppe gebundene Guanosinaddukte sind. Die DNA-Menge der Leber wurde nach Angaben von QIAGEN® (100 µg DNA/25 mg Leber) auf 40 mg geschätzt (10 g Gewebe/Leber). Des Weiteren gilt die Umrechnung, dass eine Addukthäufigkeit von 33 Addukten/ 10^8 Nukleotide einer Adduktkonzentration von 1 fmol Addukt/µg DNA entspricht.

die obige Überlegung hinsichtlich der Ausscheidungsmenge und der Detektionsgrenze. Insofern ist die geringe MPdG-Ausscheidung nach Verabreichung des SMP mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme nicht erklärbar.

Die dritte Möglichkeit wäre, dass endogen gebildete DNA-Addukte des SMP nicht als MPdG sondern in Form anderer Addukte ausgeschieden werden. Hinter dieser Hypothese verbergen sich zwei Fragen, die im Folgenden einzeln diskutiert werden sollen.

Als erstes kann in Frage gestellt werden, ob an der exocyclischen Aminogruppe modifiziertes Desoxyguanosin (dG) das Hauptaddukt darstellt. Die Hypothese, dass das exocyclische *N*-Addukt des Guanosins (MPdG) ausgeschieden wird, beruht zum einen auf den Befunden von Monnerjahn (Monnerjahn *et al.* 1993) und Kuhlow (Kuhlow 2001), zum anderen auf dem theoretischen Ansatz von Dipple (Dipple 1995). Es wurde experimentell nachgewiesen, dass die Sulfotransferase-vermittelte Bioaktivierung über einen S_N1 -Mechanismus verläuft. Ein benzylisches Carbokation ist die reaktive Zwischenstufe. Das benzyliche Carbokation ist ein weiches Elektrophil, seine positive Ladung wird durch das aromatische System mesomeriestabilisiert (Boberg *et al.* 1983; Glatt 1997). Der bevorzugte Angriffspunkt eines solchen Elektrophils ist die exocyclische Aminogruppe des Guanosins bzw. des Adenosins (Dipple 1995). Dem entsprechend konnte Monnerjahn anhand eines chemisch modifizierten Oligonukleotids, das ein N^2 -(1-Methylpyrenyl)-dG enthält, zeigen, dass im ^{32}P -Postlabelling-Assay der Hauptspot der mit SMP modifizierten DNA mit dem exocyclisch modifizierten dG-Monophosphat komigriert. Der Autor räumte ein, dass der Spot noch ein dA-Addukt in unbekannter Menge beinhaltet. Kuhlow (2001) verbesserte die chromatographischen Bedingungen und zeigte, dass jener durch Monnerjahn beschriebene Addukt-Spot, welcher dG- und dA-Addukte beinhaltet, sich weder durch verbesserte Dünnschichtchromatographie noch durch HPLC trennen ließ. Die Radioaktivität des Spots betrug 40-50 % der Gesamtradioaktivität der entsprechenden Probe. Insofern kann man sagen, dass SMP zu einem hohen Teil an die exocyclische Aminogruppe des dG gebunden ist. Dadurch, dass das modifizierte N^2 -dG und das dA-Addukt sich dünnschichtchromatographisch nicht trennen lassen, ist der Anteil des N^2 -dG-

Addukts in dem Spot nicht einschätzbar. Theoretisch könnte der Anteil des N^2 -dG-Addukts sehr klein sein. Dies könnte die geringe Ausscheidung zum Teil erklären.

Des Weiteren stellt sich, falls es sich bei dem Hauptspot im Postlabelling-Assay in der Tat um das N^2 -dG-Addukt handeln sollte, die Frage, ob dieses bevorzugt als entsprechendes Nukleosid- (MPdG) oder Nukleobasenaddukt ausgeschieden wird. Die Ausscheidung addukturierter Nukleobasen bzw. Nukleoside ist als Folge der Instabilität des Adduktes und/oder aktiver Reparaturmechanismen zu betrachten. In vielen Fällen (z.B. bei DNA-Addukten des Aflatoxin B1) laufen beide Prozesse nebeneinander ab (Leadon *et al.* 1981). Die instabilen Addukte werden durch spontane Depurinierung als entsprechende Basenaddukte freigesetzt und als solche ausgeschieden (Autrup & Seremet 1986; Rogan *et al.* 1990; Shuker & Farmer 1992; Groopman *et al.* 1994; Casale *et al.* 2001). Die stabilen PAH-Addukte werden meist durch Nukleotid-Exzision eliminiert (Van Houten 1990; Braithwaite *et al.* 1998; 1999), dabei wird im betroffenen DNA-Einzelstrang ein Oligonukleotid von 27 bis 29 Nukleotiden ausgeschnitten (Sancar 1994). Es ist jedoch weitgehend unklar, wie die ausgeschnittenen Oligonukleotide metabolisiert werden. Der Katabolismus nicht-addukturierter DNA verläuft über entsprechende Nukleotide, Nukleoside und Nukleobasen. Purinbasen werden bei Menschen und Primaten zu Harnsäure, bei anderen Säugertieren zu Allantoin degradiert und ausgeschieden (Moriwaki *et al.* 1999). Es wird angenommen, dass adduktierte Oligonukleotide, die bei der Nukleotid-Exzisionsreparatur ausgeschnitten werden, ebenfalls diesen Weg durchlaufen. In diesem Fall wäre denkbar, dass durch die Modifikation bestimmter Basen dieser Prozess unterbrochen wird und die entsprechenden davor gebildeten Produkte ausgeschieden werden. Eine Ausscheidung modifizierter oder auch unmodifizierter Oligo- und Mononukleotide ist bis heute nicht bekannt. Es wurde jedoch über die Ausscheidung von dG als normalem Bestandteil des Urins in Menschen und Mäusen berichtet (Kuttesch & Nelson 1982). 2'-Chlor-dG, ein antiviraler Stoff, wurde ebenfalls unmetabolisiert in humanem Urin gefunden (Kuttesch & Nelson 1982). Es ist inzwischen bekannt, dass ein in der Niere exprimierter organischer Kationentransporter (OCT1) selektiv die renale Exkretion verschiedener Nukleoside erleichtert (Kearns *et al.* 1994; Chen & Nelson 2000). OCT1 wird in der Niere verschiedener Säuger (z.B. im Menschen, in der Ratte und in der Maus) exprimiert (Gundemann *et al.* 1994; Okuda *et al.* 1996; Loewen *et al.*

1999). Die Existenz des selektiven Kationentransporters OCT1 weist auf die Möglichkeit der renalen Exkretion von Nukleosiden und deren Analoga hin. Tierexperimentell konnte Frandsen (1997) zum ersten Mal anhand von mit PhIP modifizierter DNA zeigen, dass extern zugefügte modifizierte DNA in der Ratte zum entsprechenden dG-Addukt abgebaut und ausgeschieden wird. Zudem konnte der Autor zeigen, dass i.p. verabreichtes PhIP-dG-Addukt von der Ratte fast quantitativ unmetabolisiert ausgeschieden wurde. Ein Thymidin-Dimer ist als eines der renal ausgeschiedenen Basenprodukte bekannt, dessen Ursprung nicht in der spontanen Depurinierung und/oder Basen-Excision liegt. Es konnte gezeigt werden, dass diese häufig vorkommende UV-Schädigung durch Excinukleasen aus der DNA entfernt werden (Nukleotid-Exzision), jedoch als Basen-Dimer ausgeschieden werden (Ahmad *et al.* 1999). Andererseits wäre es aber auch möglich, dass modifizierte Purinbasen trotz der Modifikation an der exocyclischen Aminogruppe desaminiert würden. In diesem Fall würden dann keine modifizierten Nukleobasenaddukte im Urin zu finden sein.

Angeichts der oben dargelegten Aspekte zur Bildung der aus SMP resultierenden DNA-Addukte und der Wahrscheinlichkeit von deren Ausscheidung als MPdG lässt sich Folgendes feststellen. (a) Die Literaturdaten haben vielfach gezeigt, dass stabile DNA-Addukte durch aktive Reparaturmechanismen eliminiert und prinzipiell zu Nukleosid- oder Nukleobasenaddukten abgebaut und auch als solche ausgeschieden werden können. (b) Das an der exocyclischen Aminogruppe modifizierte dG-Addukt könnte einen geringeren Anteil an den gesamten DNA-Addukten des SMP ausmachen als bislang angenommen. Der Befund, dass nur 0,9 ppm des applizierten SMP als MPdG in 12 h ausgeschieden wurden, könnte ein zusätzlicher Hinweis für die genannten Annahmen darstellen. (c) Eine Ausscheidung als Basenaddukt, N^2 -(1-Methylpyrenyl)-guanin, ist prinzipiell möglich.

4.2 Metabolismus von 1-Hydroxymethylpyren (HMP) und dessen Beeinflussbarkeit

Die Identifizierung der ausgeschiedenen Metaboliten diene dazu, die alternativen Metabolismuswege, über die HMP ausgeschieden wird, zu erfassen. Des Weiteren

sollten die daran beteiligten Enzyme eingegrenzt werden, um zum einen Erkenntnisse zu gewinnen, über welche Angriffspunkte die Bildung des DNA-reaktiven SMP erhöht werden kann, und um zum anderen zu überprüfen, ob die potenziellen Biomarker wie z.B. MPMA empfindlich auf solche Veränderungen des Systems reagieren.

Im Rahmen der Metabolismusuntersuchung wurde die Ausscheidung und Verteilung von i.p. verabreichtem ^{14}C -HMP in der Ratte untersucht. Die Elimination des applizierten ^{14}C -HMP erfolgte hauptsächlich in den ersten 48 h nach der Behandlung. Etwa 70% der applizierten Radioaktivität befand sich in den gesammelten Urin- und Faecesproben. Mindestens weitere 8 % der Dosis wurden an den Käfigwänden gefunden. Die Tiere wurden nach 48 h durch Dekapitation getötet. Zum Zeitpunkt der Tötung wurden weniger als 3,5% der applizierten Radioaktivität in den Geweben der Tiere gefunden, wobei das Fettgewebe 80% der in den Geweben persistierenden Radioaktivität enthielt. Ein ähnliches Ausscheidungsverhalten wurde für das strukturverwandte Pyren beschrieben (Bouchard *et al.* 1998). Dabei wurden in einer Beobachtungsperiode von 24 h nach der Applikation mehr als 90 % der Radioaktivität wiedergefunden, was nur moderat höher war als in der vorliegenden Studie. Übereinstimmung bestand weiterhin in der Gewebeverteilung der Radioaktivität. Der höchste Anteil der Radioaktivität wurde im Fettgewebe in Form von unmetabolisiertem ^{14}C -Pyren gefunden (Bouchard *et al.* 1998).

Die renal ausgeschiedenen Metaboliten wurden weitgehend identifiziert. Für neun von ihnen existieren Strukturvorschläge (Abschnitt 3.2.2). Aufgrund dieser Kenntnisse wurden die in Abbildung 4.1 aufgezeigten Metabolismuswege postuliert. Die identifizierten Metaboliten sind in den grau unterlegten Kästen dargestellt. Es wird angenommen, dass HMP zunächst am Ring oder an der Seitenkette oxidiert wird.

Als Produkt der Ringoxidation wurde ein Isomer des ringhydroxylierten HMP sowie dessen phenolischer Sulfatester im Urin von mit HMP behandelten Ratten identifiziert. Die Hydroxylierung am Ring war vermutlich aus entsprechenden Epoxiden hervorgegangen. Vogel *et al.* (1968) synthetisierten 1,2-Naphthalinepoxid und stellten fest, dass dieses nicht-enzymatisch rasch zu 1-Naphthol umgelagert. Bei Betrachtung des Metabolismus zahlreicher PAHs wurden neben Phenolen auch

Dihydrodirole identifiziert (Boyland & Sims 1965; Jacob *et al.* 1982; Shou & Yang 1996; Hegstad *et al.* 1999), welche *in vivo* meist zusätzlich am aromatischen Ringsystem hydroxyliert (Dihydrotrirole) waren und als entsprechende phenolische Sulfat- bzw. Glucuronsäure-Konjugate ausgeschieden wurden (Grimmer *et al.* 1988; Hegstad *et al.* 1999; Yang *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu konnten hier weder Dihydrodirole noch Konjugate der Dihydrotrirole im Urin identifiziert werden. Engst *et al.* (1999) untersuchten die mikrosomale Oxidation des MP *in vitro*. Dabei wurden sehr geringe Mengen an Dihydrodiolen identifiziert. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass ein geringer Anteil an Dihydrodiolen gebildet und ausgeschieden wurde, sei es als Dihydrodiol oder als phenolisches Sulfat- oder Glucuronsäure-Konjugat entsprechender Dihydrotrirole.

Das Produkt der Seitenkettenoxidation war die Pyrencarbonsäure (PCS), die sowohl als freie Säure als auch in ihrer konjugierten Form (Glucuronsäure-Konjugat) ausgeschieden wurde. PCS sowie ihre Glucuronsäure-Konjugate machten etwa 50 % der Gesamtmenge der ausgeschiedenen Metaboliten aus. Die Seitenkettenoxidation zur entsprechenden Carbonsäure ist kein seltenes Phänomen. Gillette *et al.* (1959) zeigten, dass die Hydroxylierung an der Methylgruppe des *p*-Nitrotoluol der erste Schritt in der Oxidation zu *p*-Nitrobenzoesäure war. Im selben Jahr stellte Williams (1959) die damaligen Kenntnisse in einer Monographie zusammen und bezeichnete die Oxidation von Methylgruppen zu Carbonsäuren als Mechanismus der Detoxifizierung. Das stark kanzerogene 7,12-Dimethylbenzo[*a*]anthracen wurde ebenfalls bis zum 12-Methyl-7-carboxbenzo[*a*]anthracen oxidiert (Pataki & Huggins 1969).

Neben PCS wurden auch ihre Glucuronsäure-Konjugate gefunden. Es ist anzumerken, dass Acylglucuronide ebenfalls reaktiv sein können. Es wurde über kovalente Proteinbindungen der Acylglucuronide berichtet, welche mit allergischen Reaktionen, die durch bestimmte Medikamente hervorgerufen werden, in Verbindung gebracht wurden (Spahn-Langguth & Benet 1992).

Neben der PCS wurde ein beträchtlicher Anteil (> 20 %) der renalen Metaboliten als Isomere phenolische Sulfatester von PCS, welche durch Sulfo-Konjugation aus ringhydroxylierter PCS hervorgingen, identifiziert. Drei Isomere, die sich in der Retentionszeit voneinander unterscheiden, wurden identifiziert. Die Ausscheidung

weiterer Isomere ist jedoch nicht auszuschließen. Die ringhydroxylierten PCS könnten auf zwei verschiedenen Wegen entstehen. Die Ringhydroxylierung der PCS stellt den einen Weg dar, die Ringhydroxylierung des HMP und anschließende Oxidation zur entsprechenden Carbonsäure wäre der andere. In Abbildung 4.1 wird nur der letztere dargestellt, da sich aus der Inkubation von PCS mit Rattenlebermikrosomen in Gegenwart von NADPH keine Metaboliten ergaben (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wurden mehr als 80 % der Metaboliten in oxidierter Form ausgeschieden.

Das Glucuronsäure-Konjugat des HMP gehörte ebenfalls ins Metabolitenspektrum. Sein Anteil betrug weniger als 5 %. Eine Spur von HMP wurde in einigen Urinproben und in allen Faecesproben identifiziert. Es ist wahrscheinlich, dass diese aus dem Glucuronsäure-Konjugat des HMP durch mikrobielle β -Glucuronidase freigesetzt wurde, wie bereits für Benzo[a]pyren-3-glucuronid (Renwick & Drasar 1976) und Iodothyronin-glucuronid (Hazenber *et al.* 1988) gezeigt wurde.

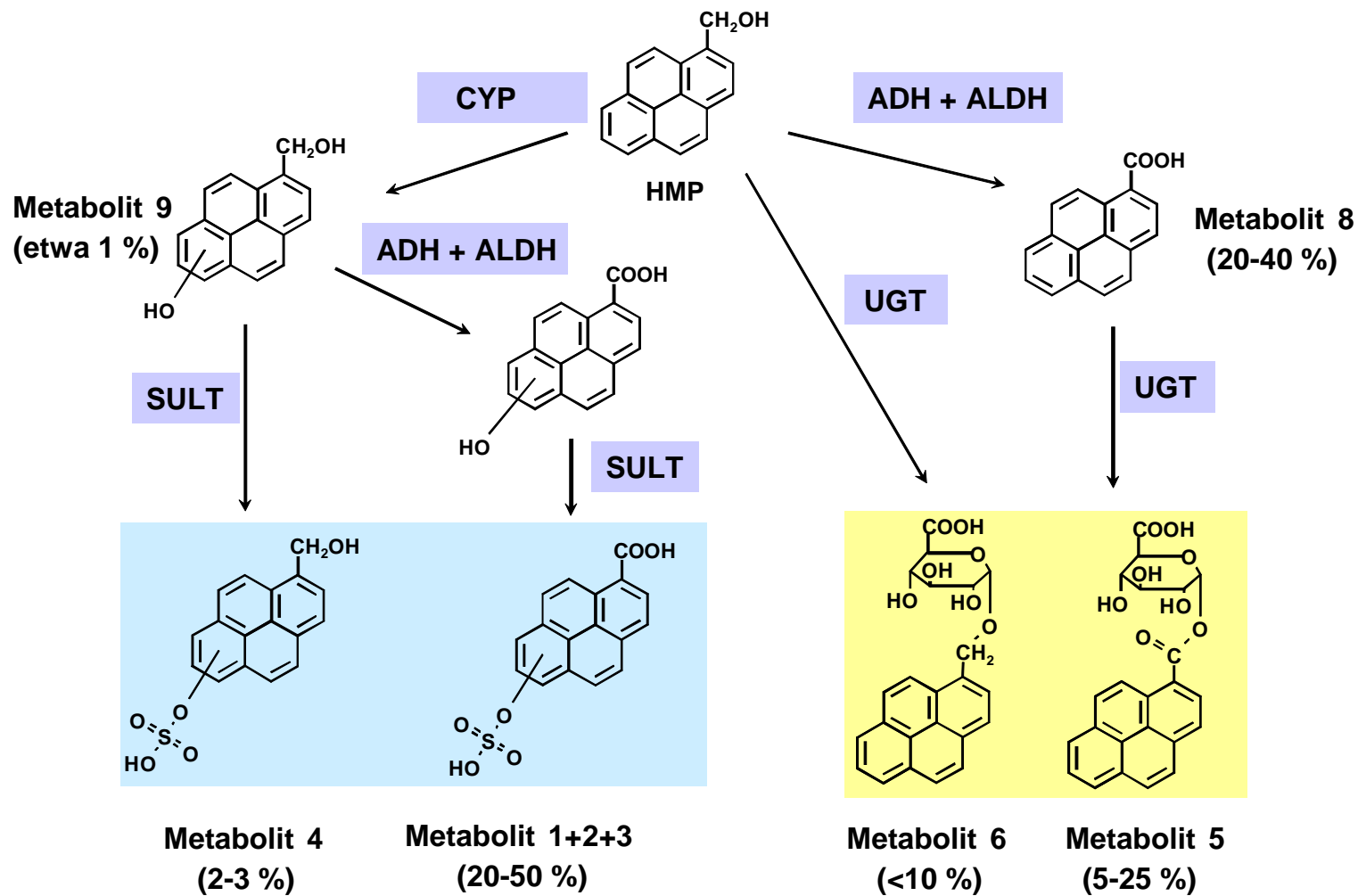


Abbildung 4.1 Postulierte Metabolismuswege des HMP. Die Bezeichnungen der Metaboliten entsprechen denen in Abbildung 3.12. Die Metaboliten sind phenolische Sulfatester der Pyrencarbonsäure (1 + 2 + 3), phenolische Sulfatester des HMP (4), das Glucuronsäurekonjugat der PCS (5), das Glucuronsäurekonjugat des HMP (6), die PCS (8) und ringhydroxyliertes HMP (9). Der Metabolit 7 ist ein Stellungsisomer des Metaboliten 5 und wurde hier nicht abgebildet. Die vorgeschlagenen Metabolismuswege basieren auf den Ergebnissen der Metabolismusuntersuchungen des HMP in der Ratte (3.2.2.2). Die Angaben zu den prozentualen Anteilen der Metaboliten beziehen sich auf die Metabolitenspektren vier weiblicher und vier männlicher Ratten (3.2.2.3).

Aus den Metabolismusuntersuchungen ist zu schließen, dass der oxidative Weg zur PCS eine dominante Rolle bei der Detoxifizierung von HMP spielt. Die Oxidation wurde daher näher charakterisiert. Da eine Oxidation von HMP zu PCS den Transport von vier Elektronen benötigt, verläuft diese vermutlich über einen Zweistufenprozess, wobei PCA das Zwischenprodukt darstellt (Kapitel 3). Weil die Reaktionen vermutlich durch unterschiedliche Enzyme katalysiert werden, wurde die Oxidation von HMP und die des PCA getrennt betrachtet. Dazu wurden subzelluläre Fraktionen der Rattenleber mit HMP bzw. PCA unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert.

Zur Oxidation von HMP leisteten die cytosolischen und mitochondrialen Fraktionen der Ratte einen signifikanten Beitrag. Die Cofaktoren NAD^+ und NADP^+ waren für die Oxidation essenziell. Die Sensibilität der enzymatischen Oxidation von HMP gegenüber dem diagnostischen Inhibitor 4-Methylpyrazol lässt auf eine Beteiligung von Alkoholdehydrogenasen (ADH) schließen. Demnach gäbe es mindestens zwei ADH-Formen, die HMP oxidieren können, eine cytosolische und eine mitochondriale. Beide Enzymformen ließen sich sowohl durch 4-Methylpyrazol als auch durch Ethanol hemmen, wobei das cytosolische Enzym sensitiver gegenüber Ethanol war als das mitochondriale. Eine mitochondriale Form der ADH wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Bisher galt die ADH als zuverlässiges Markerenzym für die cytosolische Fraktion (Tottmar *et al.* 1973). Demzufolge wäre eine Kontamination der mitochondrialen Fraktion durch cytosolische Enzyme möglich. In Inkubationen der Mitochondrienpräparation mit Ethanol und NAD^+ zeigte sich jedoch keine Bildung von NADH , so dass diese Möglichkeit ausgeschlossen werden kann (Daten nicht gezeigt).

Die Eigenschaften der HMP-oxidierenden Aktivität in der cytosolischen und mitochondrialen Fraktion der Rattenleber, d.h. die Notwendigkeit von NAD^+ - bzw. NADP^+ und die Inhibition durch 4-Methylpyrazol und Ethanol, schließen jedoch nicht aus, dass andere Enzyme beteiligt sein können. So sind z.B. einige Oxidoreduktasen ebenfalls in der Lage, in Anwesenheit des Cofaktors NAD^+ oder NADP^+ Alkohole zu entsprechenden Aldehyden oder Ketonen zu oxidieren (Maser & Bannenberg 1994). In der Literatur sind Untersuchungen zur Reduktion des PCA durch Rattenlebercytosol in Anwesenheit von NADPH beschrieben. Dabei wurde das

beteiligte Enzym durch Einsatz diagnostischer Inhibitoren (Quercetin, Phenobarbital) als Ketonreduktase klassifiziert (Landsiedel 1998). Da die Reaktion in Anwesenheit von NAD^+ oder NADP^+ auch oxidativ verlaufen kann, ist es wahrscheinlich, dass die Ketonreduktase zum Teil auch an der HMP-Oxidation beteiligt ist.

Die Oxidation des PCA wurde in mikrosomalen, cytosolischen und mitochondrialen Präparationen der Rattenleber untersucht. Die mikrosomale Fraktion der Rattenleber weist in Gegenwart von NAD^+ und NADP^+ keine nennenswerte Aktivität auf. Die cytosolische Fraktion dagegen konnte in Gegenwart von NAD^+ eine Aktivität von 0,3 nmol/mg Protein/min vorweisen, welche etwa fünf Mal größer war als die der mitochondrialen Fraktion. Die Sensitivität der cytosolischen und mitochondrialen Enzyme gegenüber Disulfiram deutet auf eine Beteiligung des Enzyms ALDH hin. Die katalytische Aktivität der ALDH in den subzellulären Fraktionen wurde in der Literatur mehrfach beschrieben. In Gegenwart von NAD^+ verteilt sich die oxidative Aktivität in der Rattenleber, gemessen an Acetaldehyd und Propionaldehyd, wie folgt: Mitochondrien > Mikrosomen > Cytosol (Lindahl & Evces 1984). Daraus ist zu schließen, dass es sich hierbei vermutlich um andere ALDH handelt als diejenigen, die auch Acetaldehyd und Propionaldehyd oxidieren, da die oxidative Aktivität gegenüber PCA in Cytosol und Mitochondrien wesentlich größer war als in Mikrosomen. Überdies deutet die cytosolische Enzymaktivität gegenüber PCA in Abwesenheit von NAD^+ auf Mitwirkung NAD^+ bzw. NADP^+ -unabhängiger Enzyme hin. Der Befund, dass durch Verdrängung des Sauerstoffes durch Argon die Enzymaktivität auf 60 % gesenkt wurde, deutet auf eine mögliche Rolle des Sauerstoffes als Redoxäquivalent hin. Demnach könnte das dritte Enzym eine Oxidase sein, wie z. B. das molybdänabhängige Flavonprotein Aldehyd-Oxidase, welche Sauerstoff als physiologischen Elektronenakzeptor benötigt. Langkettige und aromatische Aldehyde können durch dieses Enzym schnell oxidiert werden, wogegen die kurzkettigen nur sehr schlechte Substrate sind (Beedham 1987). Einer Disproportionierung dürfte insofern keine Bedeutung beigemessen werden, weil die entstehende HMP-Menge nicht im gleichen Verhältnis zur PCS-Bildung steht.

4.3 Einfluss von Störungen des detoxifizierenden Systems

Die Metabolismusvorgänge eines Organismus halten sich gegenseitig in einer empfindlichen Balance. Veränderungen bei detoxifizierenden Stoffwechselwegen können die Toxifizierung begünstigen. Diese Veränderungen des detoxifizierenden Systems können z. B. durch Nahrungsbestandteile und Medikamente verursacht werden. Aber auch Polymorphismen der detoxifizierenden Enzyme stellen potenzielle Faktoren dar, die das Risiko bestimmter Populationen erhöhen können. Unsere Untersuchungen zum Metabolismus von HMP zeigten, dass die Seitenkettenoxidation eine wichtige Rolle in der Detoxifizierung des HMP spielte, woran *in vitro* Versuchen nach die Enzyme ADH und ALDH beteiligt waren. Um dies *in vivo* zu überprüfen und die Beeinflussbarkeit der MPMA-Ausscheidung durch äußere Faktoren zu untersuchen, wurden diese Enzyme in der Ratte durch Ethanol bzw. Disulfiram inhibiert. Als direkter Parameter der veränderten Toxifizierung wurde die SMP-Konzentration im Plasma bestimmt. Zudem wurden die DNA-Addukthäufigkeit in der Leber sowie die Ausscheidung der MPMA als indirekte Parameter der Toxifizierung untersucht.

4.3.1 Wirkung des Disulfirams

Disulfiram wurde lange Zeit als Therapeutikum gegen Alkoholabusus verabreicht. Die Basis für seine klinische Anwendung ist die irreversible Hemmung der ALDH und die resultierende langanhaltende Alkoholunverträglichkeit (Hald & Jacobsen 1948; Brien 1985). Da ALDH vermutlich an der oxidativen Detoxifizierung des HMP beteiligt ist, wurde diese Eigenschaft des Disulfirams ausgenutzt. Die Vorbehandlung mit Disulfiram führte tatsächlich zu einer verstärkten Bildung des reaktiven Sulfatesters SMP, die direkt durch die erhöhte SMP-Konzentration im Plasma zum Ausdruck gebracht wurde. Zudem wurde eine Zunahme der DNA-Addukthäufigkeit in der Leber und eine vermehrte MPMA-Exkretion festgestellt.

Die Werte der mit Disulfiram vorbehandelten männlichen Tiere zeigten eine ausgeprägte Variabilität. Während bei den Kontrolltieren, die kein Disulfiram bekamen, eine SMP-Plasmakonzentration von 0,18 bis 0,74 μM vorzufinden war, lagen die Werte bei den mit Disulfiram vorbehandelten Tieren zwischen 0,12 μM und 8,24 μM (Tab. 7.7 im Anhang). Ein ähnlicher Sachverhalt war bei der DNA-

Addukthäufigkeit und bei der MPMA-Ausscheidung zu beobachten. Dieses Phänomen könnte mit einer unterschiedlichen Resorption des Disulfirams aus der Bauchhöhle zusammenhängen (Peterson 1992). Da Disulfiram schwer wasserlöslich ist, wurde es in DMSO gelöst und i.p. appliziert. Nach der Tötung der Versuchstiere wurden Substanzablagerungen unterschiedlichen Grades festgestellt, welche mit unterschiedlicher Resorption aus der Bauchhöhle erklärbar wären. In der Literatur wurde eine erhöhte Toxizität von in Öl gelösten Disulfiram bei oraler Gabe beschrieben. Die Autoren erklärten ihren Befund mit verbesserter Resorption durch das Medium Öl (Child & Crump 1952).

Die komplexe Wirkung des Disulfirams dürfte ebenfalls zu der großen Variabilität der Werte (z.B. 0,12 – 8,24 μM SMP im Plasma) der mit Disulfiram behandelten Ratten beigetragen haben. Disulfiram erlangt seine Aktivität erst nach vorangegangener Bioaktivierung (Abb. 4.2) (Johansson 1992), an der viele Enzyme beteiligt sind. Fehlende oder nicht ausreichende Aktivität eines der beteiligten Enzyme kann zu einer stark verringerten biologischen Aktivität von Disulfiram führen. Darüber hinaus werden neben derer der ALDH die katalytischen Aktivitäten der am Metabolismus des Disulfirams beteiligten Enzyme wie der Glutathionreduktase (Strömme 1963), der mikrosomalen CYP Enzyme (Brady *et al.* 1991) und der UGT (Kaslander 1963) beeinträchtigt. Die Aktivität der GST wird ebenfalls herabgesetzt (Ploemen *et al.* 1996). Dies könnte zur Folge haben, dass weniger Glutathionkonjugat (MPSG) gebildet wird und somit auch weniger Mercaptursäure (MPMA) ausgeschieden wird. Angesichts der gegebenen Umstände ist die Variabilität verständlich. Die tendenziell gesteigerte Aktivierung durch die Einwirkung von Disulfiram sollte daher als Effekt, der weiterer Überprüfung bedarf, Beachtung finden, auch wenn er aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede und des geringen Probenumfangs statistisch nicht immer signifikant war.

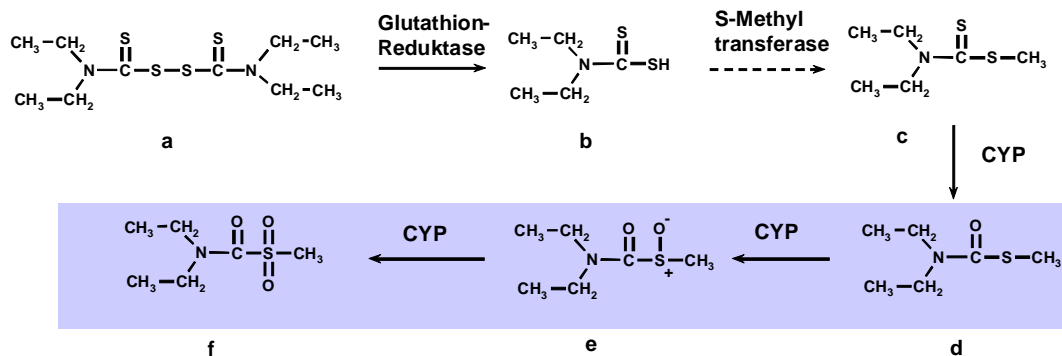


Abbildung 4.2 Bioaktivierung von Disulfiram. \rightarrow zeigen die bekannten und \dashrightarrow die zu prüfenden Metabolismuswege. Die grau unterlegten Metaboliten sind die vermeintlichen aktiven Metaboliten. Die Substanzen sind (a) Disulfiram (*N,N'*-Tetramethylthiuramdisulfid); (b) *N,N'*-Diethyldithiocarbamat; (c) *N,N'*-Diethyldithiomethylcarbammat; (d) *N,N'*-Diethyl-S-methylthiocarbamat; (e) *N,N'*-Diethyl-S-methylthiolcarbamoylsulfoxid; (f) *N,N'*-Diethyl-S-methylthiolcarbamoylsulfonat.

4.3.2 Wirkung des Ethanols

Ethanol inhibierte die Oxidation von HMP *in vitro*. Hinsichtlich der Aktivierung von HMP zu SMP *in vivo* führte die simultane Behandlung mit Ethanol und HMP zu Ergebnissen, die auf den ersten Blick zum Teil widersprüchlich waren. So wurde 3 h nach der HMP-Applikation bei den männlichen Tieren eine leichte Erhöhung der SMP-Konzentration im Plasma sowie eine leichte Zunahme der DNA-Addukthäufigkeit festgestellt, während die Werte der Weibchen denen der Kontrolltiere entsprachen. 24 h nach der HMP-Behandlung war die DNA-Addukthäufigkeit in der Leber jedoch bei beiden Geschlechtern erhöht. Außerdem wurde eine erhöhte MPMA-Exkretion ebenfalls bei beiden Geschlechtern festgestellt. Die gleichbleibende Plasmakonzentration von SMP in den weiblichen Ratten (3 h nach der HMP-Applikation) ist angesichts der im Allgemeinen höheren MPMA-Ausscheidung der Weibchen (Abb. 3.37) durch stärkere GSH-Konjugation, welche die gesteigerte SMP-Bildung effektiv kompensierte, erklärbar. Einen zusätzlichen Hinweis auf diese Hypothese lieferte das unterschiedliche Verhalten der männlichen und weiblichen Ratten hinsichtlich der DNA-Addukthäufigkeit, die bei den Männchen um ein Vielfaches höher war als bei den Weibchen. Unter Berücksichtigung der oben genannten Argumente sagen die scheinbar widersprüchlichen Daten aus, dass die Aktivierung von HMP durch Ethanol begünstigt wird. Bemerkenswert war, dass

bereits eine Dosis von 0,2 g Ethanol/kg KM zu einer messbar gesteigerten Bildung des reaktiven SMP führte. Dabei erwies sich die Ausscheidung des MPMA als ein besonders empfindlicher Parameter. Eine erhöhte Ausscheidung entsprechender Thioether in Anwesenheit von Ethanol wurde bei Untersuchungen anderer benzylischer Verbindungen wie Benzylacetat (Chidgey *et al.* 1986), Toluol und Xylol (Doorn *et al.* 1981) berichtet. Die verwendeten Ethanol-Dosen waren jedoch mit 3 g Ethanol/kg KM um ein vielfaches höher als im vorliegenden Versuch.

Die Ergebnisse dieses Versuchs scheinen die wichtige Rolle der Seitenkettenoxidation durch ADH in der Detoxifizierung von HMP zu belegen. Doch auch die Wirkung von Ethanol ist sehr komplex. Eine akute Ethanolgabe wirkt im Allgemeinen inhibierend auf den Fremdstoffmetabolismus (Rubin *et al.* 1970; Whitehouse *et al.* 1975a; 1975b). Die involvierten Mechanismen scheinen hauptsächlich kompetitive Hemmungen gemeinsamer Detoxifizierungswege zu sein, welche die ADH und CYP beinhalten. Darüber hinaus ist die Freisetzung von Steroid-Hormonen und eine damit verbundene Hemmung einiger mikrosomaler Enzyme bekannt (Chung & Brown 1976). Ein indirekter Effekt ist die durch den Ethanol-Metabolismus hervorgerufene Änderung des Redoxstatus der Zelle, welche eine Hemmung der UGT bewirken kann (Moldeus *et al.* 1978). Angesichts dieser Effekte ist nicht auszuschließen, dass neben ADH auch CYP und UGT in Mitleidenschaft gezogen wurden, so dass die initiale Metabolisierung und Eliminierung von HMP auf vielen Wegen verlangsamt wurde. Whitehouse *et al.* (1975a) berichteten über eine stark erhöhte ¹⁴C-Diazepam-Menge im tiefen Kompartiment (Gehirn, Fettgewebe) in Folge eines retardierten Metabolismus des ¹⁴C-Diazepams durch Ethanol. Da auch HMP im Fettgewebe gespeichert wird (Kapitel 3), ist anzunehmen, dass HMP durch den herabgesetzten Metabolismus dort in stärkerem Maße angereichert wird und nach und nach freigesetzt werden kann. Im Vergleich zu UGT besitzen SULT eine höhere Affinität und niedrigere Kapazität gegenüber potenziellen Substraten. So werden Substrate in niedriger Konzentration bevorzugt sulfoniert (Morris 1987; Pang 1987). Die Sulfonierung wird nicht durch Ethanol beeinträchtigt (Sundheimer & Brendel 1984). Da die Menge des nach und nach freigesetzten HMP als gering einzuschätzen ist, ist unter Ethanoleinfluss von einer im Vergleich zur Glucuronidierung höheren Sulfonierungsrate auszugehen.

Vereinfacht lässt sich sagen, dass bereits eine Dosis von 0,2 g Ethanol/kg KM zu einer deutlich erhöhten Bildung des SMP führte. Dies wurde insbesondere durch die MPMA-Ausscheidung zum Ausdruck gebracht. Die gesteigerte Aktivierung von HMP zu SMP beruhte wahrscheinlich auf der inhibierenden Wirkung des Ethanols auf verschiedene detoxifizierende Systeme.

4.4 Methylpyren-Mercaptursäure (MPMA) als Biomarker für die Exposition gegenüber 1-Methylpyren (MP)

Je nach Fragestellung stellt das Biomonitoring unterschiedliche Anforderungen an die verwendeten Biomarker. Im Allgemeinen soll ein Biomarker vor allem mit möglichst wenig analytischem Aufwand und hohem Probendurchsatz sensitiv zu analysieren sein. Zudem ist eine nicht-invasive Probennahme von großem Vorteil. Zur Bestimmung der Expositionshöhe ist ein linearer Zusammenhang mit der Exposition über einen weiten Bereich des Expositionsniveaus eine notwendige Voraussetzung, während eine Aussage über die effektive Dosis eine gut etablierte Korrelation zwischen der Menge des Biomarkers (z.B. MPMA) und dem beobachteten Effekt (z.B. DNA-Addukt) erfordert. Um zu erkennen, mit welchem Stoff ein Individuum oder eine Population belastet ist, benötigt man Biomarker mit hoher Spezifität für die interessierenden Chemikalien. Wenn ein Biomarker idealer Weise all diese Eigenschaften besitzt, kann er für verschiedene Fragestellungen herangezogen werden. Hinsichtlich der dargelegten Kriterien soll im Folgenden die Anwendung der MPMA beurteilt werden.

MPMA ist analytisch gut erfassbar. MPMA wurde gemäß der in Abschnitt 2.5.7 beschriebenen Methoden aus Urin und Faeces extrahiert und mittels LC-MS/MS im MRM-Modus bestimmt. Die Methode ist durch die vorausgehende chromatographische Trennung mittels HPLC und Detektion mittels MS/MS im MRM-Modus hoch sensitiv und selektiv. Das Detektionslimit beträgt 100 fmol pro Injektion. Aufgrund der Selektivität reicht eine einfache chromatographische Trennung. Der Probendurchsatz wird daher durch die Geschwindigkeit der Probenvorbereitung bestimmt. Bei den vorliegenden Versuchen betrug der Probendurchsatz bis zu 36 Urin- bzw. 8 Faecesproben pro Tag. Die Aufarbeitung von Urinproben kann jedoch

durch Automation erheblich beschleunigt werden. Die Analyse von Faecesproben ist dagegen sehr zeitaufwendig, so dass sie nur im Tierversuch sinnvoll ist. Da das Grenz-Molekulargewicht für die Gallengängigkeit bei den Versuchstieren (> 300 Da) niedriger ist als beim Menschen (> 475 Da) (Klaassen 1975), ist davon auszugehen, dass viele Substanzen, darunter auch HMP-Metaboliten, die beim Versuchstier sowohl renal als auch biliär ausgeschieden werden, beim Menschen fast ausschließlich mit dem Urin exkretiert werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die MPMA aufgrund ihrer guten analytischen Erfassbarkeit im Urin als Biomarker zur Bestimmung der inneren Dosis eignen würde. Die Beobachtung, dass weibliche Ratten tendenziell mehr MPMA ausscheiden als Männchen, während für die DNA-Addukte das umgekehrte zutrifft, weist darauf hin, dass die Beziehung zwischen der MPMA-Ausscheidung und der Bildung des reaktiven SMP unter anderem von der Detoxifizierungskapazität abhängt, so dass eine höhere MPMA-Ausscheidung nicht zwangsläufig eine höhere innere Dosis des SMP bedeutet.

4.5 Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich MPMA aufgrund ihrer Erfassbarkeit und ihrer empfindlichen Reaktion auf Veränderungen des detoxifizierenden Systems gut als Biomarker für die Exposition gegenüber MP/HMP eignen könnte. Es sind jedoch noch Fragen offen. Dies gilt vor allem für die Beziehung zwischen der MPMA-Ausscheidung und der DNA-Addukthäufigkeit in den Organen. Sowohl die MPMA-Ausscheidung als auch die DNA-Adduktbildung sind Folgen der Aktivierung von HMP zu reaktivem SMP. MPMA stellt den Anteil der Detoxifizierung dar, während die DNA-Addukthäufigkeit den der Toxifizierung verkörpert. Die Beziehung der beiden Parameter wird unter anderem durch die variable Detoxifizierungskapazität des SMP durch GSH-Konjugation beeinflusst. Zwar wurde im Rahmen dieser Arbeit die MPMA-Ausscheidung in 24 h (Tab. 7.9 im Anhang) und die DNA-Addukthäufigkeit in der Leber (ebenfalls 24 h nach der HMP-Applikation, Tab. 7.8 im Anhang) hinsichtlich einer Korrelation überprüft. Das Ergebnis ist aufgrund der wenigen sinnvollen Datenpunkte und fehlenden Informationen über die individuelle Detoxifizierungskapazität jedoch nicht schlüssig

(Abb. 7.2 und 7.3 im Anhang). Dies sollte daher durch zusätzliche Experimente unter Berücksichtigung der Detoxifizierungskapazität durch Glutathionkonjugation weiter verfolgt werden.

Ferner sind ausgeschiedene Nukleobasen- und Nukleosidaddukte toxikologisch von außerordentlichem Interesse, da sie die primären DNA-Schäden widerspiegeln. MPdG konnte nur in Urinprobe zwischen 12 und 24 h nach der SMP-Applikation identifiziert werden. Es ist deshalb wichtig zu klären, wieviel MPdG in den ersten 12 h nach der SMP-Applikation ausgeschieden wird. Dies könnte durch Untersuchung des über 24 h gesammelten und gepoolten Urins in einem zusätzlichen Experiment überprüft werden. Wäre das Ausmaß der adduktierten DNA wiederum nicht durch die MPdG-Ausscheidung wiedergegeben, wie bei den beschriebenen Versuchen, wäre es nicht minder wichtig zu klären, welche Substanz das Hauptabbau- und Ausscheidungsprodukt der SMP-modifizierten DNA vertritt.

Ein Nebenaspekt der vorliegenden Arbeit war der Metabolismus von HMP. Dabei wurde die wichtige Rolle der seitenkette-oxidierenden Enzyme bei der Detoxifizierung von HMP festgestellt. Die zelluläre Verteilung der oxidativen Aktivität, ihre Abhängigkeit von den Cofaktoren NAD^+ und NADP^+ sowie ihre Sensitivität gegenüber den diagnostischen Inhibitoren Disulfiram und 4-Methylpyrazol wurde untersucht, womit eine Eingrenzung der beteiligten Enzymgruppe möglich war. Die vorliegenden Daten reichen jedoch für eine eindeutige Identifizierung der involvierten Enzyme nicht aus, so dass auch auf diesen Gebiet weiterer Forschungsbedarf besteht.

5. Zusammenfassung

Substanzspezifische Biomarker wie Mercaptursäuren (MA) und Nukleosid- bzw. Nukleobasenaddukte können helfen, toxische Potenziale von Substanzen zu erkennen. Während MA die Detoxifizierung durch Glutathion (GSH) repräsentieren, dokumentieren Nukleosid- und Nukleobasenaddukte parallel dazu die Toxifizierung mit darauf folgender Bildung von DNA-Addukten.

Benzylische Alkohole werden unter Umständen zu elektrophilen, mutagenen Schwefelsäureestern sulfoniert, die enzymatisch zu entsprechenden Glutathionkonjugaten detoxifiziert werden können. Die Reaktion wird besonders gut durch die Glutathion-S-Transferase Theta2 katalysiert. Der benzylische Alkohol 1-Hydroxymethylpyren (HMP) ist ein bedeutender Metabolit von 1-Methylpyren (MP), einem hepatokarzinogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff. In Anwesenheit von Sulfotransferasen (SULT) und 5'-Phosphoadenosin-3'-phosphosulfat als Kofaktor wird das Molekül zu dem hochreaktiven 1-Sulfooxy-methylpyren (SMP) aktiviert. SMP bildet DNA-Addukte und ist mutagen.

Im Hinblick auf die Fragestellung, ob sich MA und Nukleobasen- bzw. Nukleosidaddukte als Biomarker eignen, sollten im Rahmen dieser Arbeit die Ausscheidung von *N*-Acetyl-S-(1-methylpyrenyl)-cystein (MPMA), der MA des SMP, und die Ausscheidung des *N*²-(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosins (MPdG), eines möglichen Abbauproduktes der DNA-Addukte von SMP, in der Ratte nach Applikation von MP und HMP untersucht werden. Voraussetzung der MPMA-Ausscheidung ist eine Konjugation des SMP mit GSH. Es wurde daher zunächst untersucht, ob eine enzymatische GSH-Konjugation des SMP in der Ratte stattfindet und wie hoch der Anteil ist, der zum Glutathion-S-Konjugat des SMP (MPSG) umgesetzt wird. Dazu wurde SMP mit GSH in An- und Abwesenheit cytosolischer Präparationen der Leber, der Niere, der Lunge und des Colons inkubiert. Die gebildete MPSG-Menge wurde anhand synthetisch hergestellten MPSG als Referenzsubstanz mittels HPLC mit UV-Detektion bestimmt. Die Untersuchung ergab, dass die Anwesenheit der Cytosole für die MPSG-Bildung in messbarer Menge essenziell war. Bei niedriger Substratkonzentration (8 µM) und 1 mg Protein/ml entsprechender Menge an Lebercytosol wurde SMP fast quantitativ zu

MPSG umgesetzt. In der Lunge, der Niere und dem Colon wurden ebenfalls hohe katalytische Aktivitäten gefunden. In anschließenden Tierversuchen wurden Ratten mit HMP und MP behandelt. In Urin und Faeces der behandelten Tiere wurde die Ausscheidung des MPdG und der MPMA anhand synthetisch hergestellter Referenzsubstanzen mittels LC-MS-MS bestimmt. Ziel des Tierversuchs war, die Ausscheidung der Substanzen hinsichtlich der Menge und des Ausscheidungszeitraumes zu untersuchen. Bei den mit HMP oder MP behandelten Tieren wurde weit weniger als 1 % der Dosis als MPMA ausgeschieden. Die Ausscheidung erfolgte hauptsächlich in den ersten 24 h nach der Applikation. MPdG konnte weder in Urin noch in Faeces der behandelten Tiere identifiziert werden. Die direkte Applikation von SMP sollte klären, in welchem Umfang SMP als MPMA ausgeschieden würde und ob in Folge starker DNA-Adduktbildung MPdG ausgeschieden würde. Insgesamt wurden weniger als 0,6 % der Dosis als MPMA gefunden. Da es Indizien dafür gab, dass appliziertes SMP nur begrenzt systemisch verfügbar war, konnte hier nicht geklärt werden, in welchem Umfang *in vivo* gebildetes SMP als MPMA ausgeschieden wird. Aufgrund der hohen Effektivität der GSH-Konjugation ist jedoch zu vermuten, dass endogen entstandenes SMP zu einem höheren Anteil in Form von MPMA ausgeschieden wird als direkt verabreichtes SMP. MPdG wurde nur in sehr geringen Mengen (weniger als 0,9 ppm der Dosis in 12 h) im Urin gefunden.

Um die Beeinflussbarkeit der genannten Biomarker zu untersuchen und auch ihre Eignung zu beurteilen, war es notwendig, die Stoffwechselfvorgänge, die maßgeblich an der Detoxifizierung beteiligt sind, zu erkennen. Es wurden daher umfassende Untersuchungen zum Metabolismus des HMP durchgeführt. Zur Identifizierung von renal und biliär ausgeschiedenen Metaboliten wurde zunächst Urin mittels HPLC getrennt und die HMP-Metaboliten mittels UV- und MS-MS-Detektion identifiziert. Es wurden Isomere der phenolischen Sulfatester der Pyrencarbonsäure (PCS), Glucuronsäure-Konjugate der PCS bzw. des HMP sowie freie PCS im Urin von HMP-behandelten Ratten identifiziert. Ferner gehörten phenolische Sulfatester des HMP und ringhydroxyliertes HMP ebenfalls ins Metabolitenspektrum des HMP. Zum quantitativen Vergleich der ausgeschiedenen Metaboliten wurden Urin- und Faecesproben von ¹⁴C-HMP behandelten Ratten verwendet. Hierzu wurden ¹⁴C-Faecesextrakte und -Urinproben mittels HPLC mit UV- und Riodurchflussdetektion untersucht und die Peaks den zuvor identifizierten Metaboliten zugeordnet. Die

prozentualen Anteile einzelner Metaboliten an den Gesamtmetaboliten wurden ermittelt. Mehr als 80 % der Metaboliten wurden in oxidierter Form (PCS, deren Glucuronsäure-Konjugate, phenolische Sulfatester der PCS) ausgeschieden. Demnach spielt die Oxidation des HMP zu PCS eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung und Ausscheidung von HMP.

Aufgrund dessen wurden *in vitro* mit subzellulären Leberfraktionen die an der Oxidation von HMP beteiligten Enzyme durch Einsatz diagnostischer Inhibitoren (Disulfiram, 4-Methylpyrazol und Ethanol) bzw. An- oder Abwesenheit von Kofaktoren ($\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$) eingegrenzt. Dazu wurde unter verschiedenen Bedingungen die Bildung der PCS mittels HPLC mit Fluoreszenz-Detektion bestimmt. Es wurde festgestellt, dass das cytosolische Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) maßgeblich an der Oxidation des HMP beteiligt war. Ethanol als kompetitives Substrat der ADH unterdrückte die Oxidation. Zudem wurde neben dem Einfluss der cytosolischen und mitochondrialen Aldehyddehydrogenasen eine Beteiligung NAD^+ -unabhängiger cytosolischer Enzyme festgestellt.

Auf diesen Daten basierend wurden Disulfiram und Ethanol zur Modulation der detoxifizierenden Oxidation von HMP *in vivo* bei der Ratte eingesetzt. Die Veränderungen in der Umsetzung von HMP zu SMP wurden durch die SMP-Konzentration im Plasma, die DNA-Addukthäufigkeit und die MPMA-Ausscheidung erfasst. Die Bestimmung der DNA-Addukthäufigkeit erfolgte mittels ^{32}P -Postlabelling und die der SMP-Plasmakonzentration sowie der MPMA-Ausscheidung mittels HPLC-MS-MS. Während die SMP-Konzentration im Plasma eine direkte Konsequenz der Toxifizierung darstellt, besitzen die anderen zwei Parameter als indirekte Folge der Aktivierung einen Biomarker-Charakter. Die Vorbehandlung mit Disulfiram und Ethanol führte zu teilweise starken Erhöhungen der SMP-Konzentration im Plasma, der DNA-Addukthäufigkeit in der Leber und der MPMA-Ausscheidung. Zwar waren nicht alle Effekte statistisch signifikant, doch dürfte dies auf die geringe Zahl der Tiere, die eingesetzt wurden, zurückzuführen sein. Bemerkenswert ist jedoch, dass bereits eine Dosis von 0,2 g Ethanol/kg Körpermasse zu statistisch signifikanten Erhöhungen der MPMA-Ausscheidung bei weiblichen Ratten führte.

Hinsichtlich der Fragestellung, ob MPMA und MPdG als Biomarker geeignet sind, lässt sich folgendes feststellen: MPdG als Vertreter der renal ausgeschiedenen

Nukleosidaddukte konnte nur in sehr geringer Menge im Urin von SMP-behandelten Tieren identifiziert werden. Es dürfte sich daher nicht als Biomarker für die Exposition gegenüber MP/HMP bei Menschen eignen, weil hier mit einer sehr viel niedrigeren Exposition zu rechnen ist. MPMA ist gut analytisch erfassbar, würde sich daher als Biomarker für eine Belastung durch MP/HMP eignen.

6. Literaturverzeichnis

Adams, R., R. Burdon, A. Campbell, D. Leader und R. Smellie (1981). The Biochemistry of Nucleic Acids. London, Chapman and Hall.

Ahmad, J., M. S. Cooke, A. Hussieni, M. D. Evans, K. Patel, R. M. Burd, T. O. Bleiker, P. E. Hutchinson und J. Lunec (1999). Urinary thymine dimers and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in psoriasis. *FEBS Lett* **460**: 549-553.

Akerboom, T. P. und H. Sies (1989). Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzymol* **173**: 523-534.

Ashby, J., J. E. Gallagher, M. Kohan, H. Tinwell, I. Kimber, D. Paton, R. D. Callander und I. Chouroulinkov (1990). 1-Chloromethylpyrene: a reference skin sensitizer and genotoxin. *Mutation Res* **243**: 281-289.

Autorenkollektiv (1988). Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaft.

Autrup, H. und T. Seremet (1986). Excretion of benzo[a]pyrene-Gua adduct in the urine of benzo[a]pyrene-treated rats. *Chem-Biol Interact* **60**: 217-226.

Beedham, C. (1987). Molybdenum hydroxylases: biological distribution and substrate-inhibitor specificity. *Prog Med Chem* **24**: 85-127.

Boberg, E. W., E. C. Miller, J. A. Miller, A. Poland und A. Liem (1983). Strong evidence from studies with brachymorphic mice and pentachlorophenol that 1'-sulfooxysafrole is the major ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of 1'-hydroxysafrole in mouse liver. *Cancer Res* **43**: 5163-5173.

Bouchard, M., K. Krishnan und C. Viau (1998). Kinetics of tissue distribution and elimination of pyrene and 1-hydroxypyrene following intravenous administration of ¹⁴C-pyrene in rats. *Toxicol Sci* **46**: 11-20.

Boyland, E. und P. Sims (1965). Metabolism of polycyclic compounds: the metabolism of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by rat liver homogenates. *Biochem J* **95**: 780-787.

Brady, J. F., F. Xiao, M. H. Wang, Y. Li, S. M. Ning, J. M. Gapac und C. S. Yang (1991). Effects of disulfiram on hepatic P450IIE1, other microsomal enzymes, and hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **108**: 366-373.

- Braithwaite, E., X. Wu und Z. Wang (1998). Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis* **19**: 1239-1246.
- Braithwaite, E., X. Wu und Z. Wang (1999). Repair of DNA lesions: mechanisms und relative repair efficiencies. *Mutation Res* **424**: 207-209.
- Brien, J. F., G. S. Tam, R. J. Cameron, N. A. Steenaart und C. W. Loomis (1985). A comparative study of the inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenases in the rat by methyltetrazoethiol, calcium carbimide, and disulfiram. *Can J Physiol Pharmacol* **63**: 438-443.
- Casale, G. P., M. Singhal, S. Bhattacharya, R. RamaNathan, K. P. Roberts, D. C. Barbacci, J. Zhao, R. Jankowiak, M. L. Gross, E. L. Cavalieri, G. J. Small, S. I. Rennard, J. L. Mumford und M. Shen (2001). Detection and quantification of depurinated benzo[a]pyrene-adducted DNA bases in the urine of cigarette smokers and women exposed to household coal smoke. *Chem Res Toxicol* **14**: 192-201.
- Chen, R. und J. A. Nelson (2000). Role of organic cation transporters in the renal secretion of nucleosides. *Biochem Pharmacol* **60**: 215-219.
- Chidgey, M., J. Kennedy und J. Caldwell (1986). Studies on benzylic acetate II use of specific metabolic inhibitors to define the pathway leading to the formation of benzylmercapturic acid in the rat. *Fd Chem Toxic* **24**: 1267-1272.
- Child, G. und M. Crump (1952). The toxicity of tetraethylthiuramdisulfide (Antabuse) to mouse, rat, rabbit and dog. *Acta Pharmacol Toxicol* **8**: 305-314.
- Chung, H. und D. Brown (1976). Mechanism of the effect of acute ethanol on hexobarbital metabolism. *Biochem Pharmacol* **25**: 1613-1616.
- Clapp, J. und L. Young (1970). Formation of mercapturic acids in rats after the administration of aralkyl esters. *Biochem J* **118**: 765-771.
- Commandeur, J. N. M., G. J. Stijntjes und N. P. E. Vermeulen (1995). Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione-S-conjugates, role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol Rev* **47**: 272-330.
- Cornell, N., C. Hansch, K. Kim und K. Henegar (1983). The inhibition of alcohol dehydrogenase in vitro and in isolated hepatocytes by 4-substituted pyrazoles. *Arch Biochem Biophys* **227**: 81-90.
- Craddock, V. und P. Magee (1967). Effects of administration of the carcinogen dimethylnitrosamine on urinary 7-methylguanaine. *Biochem J* **104**: 435-440.

- Dipple, A. (1995). DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **16**: 437-441.
- Doorn, V., C.-M. Leijdekkers, R. P. Bos, R. Brouns und P. T. Henderson (1981). Alcohol and sulfate intermediates in the metabolism of toluene and xylenes to mercapturic acids. *J Appl Toxicol* **1**: 236-242.
- Eisenhofer, G., M. W. H. Coughtrie und D. S. Goldstein (1999). Dopamine sulphate: an enigma resolved. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**: S41-S53.
- Enders, N., A. Seidel, S. Monnerjahn und H. Glatt (1991). Synthesis of 11 benzylic sulfate esters, their bacterial mutagenicity and its modulation by chloride, bromide and acetate ions. *Polycyclic Aromat Compds* **3**: 887s-894s.
- Eng, C. (1983). Chenodeoxycholic acid-3-sulfate: metabolism and excretion in the rat and hamster and effects on hepatic transport systems. *Biochem Pharmacol* **32**: 3555-3558.
- Engst, W., R. Landsiedel, H. Hermersdörfer, J. Doehmer und H. R. Glatt (1999). Benzylic hydroxylation of 1-methylpyrene and 1-ethylpyrene by human and rat cytochromes P450 individually expressed in V79 chinese hamster cells. *Carcinogenesis* **20**: 1777-1785.
- Faed, E. (1984). Properties of acyl glucuronides: Implications for studies of the pharmacokinetics and metabolism of acidic drugs. *Drug Metab Rev* **15**: 1213-1249.
- Falany, C. N., X. Xie, J. Wang, J. Ferrer und J. L. Falany (2000). Molecular cloning and expression of novel sulphotransferase-like cDNAs from human and rat brain. *Biochem J* **346**: 857-864.
- Farmer, P. B., O. Sepai, R. Lawrence, H. Autrup, P. Sabro Nielsen, A. B. Vestergard, R. Waters, C. Leuratti, N. J. Jones, J. Stone, R. A. Baan, J. H. van Delft, M. J. Steenwinkel, S. A. Kyrtopoulos, V. L. Souliotis, N. Theodorakopoulos, N. C. Bacalis, A. T. Natarajan, A. D. Tate, A. Haugen, A. Andreassen, S. Ovrebo, D. E. Shuker, K. S. Amaning, P. Castelain und et al. (1996). Biomonitoring human exposure to environmental carcinogenic chemicals. *Mutagenesis* **11**: 363-381.
- Frandsen, H. (1997). Excretion of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline, PhIP-dG, PhIP-DNA and DiMeIQx-DNA from the rat. *Carcinogenesis* **18**: 1555-1560.
- Glatt, H. R. (1997). Bioactivation of mutagens via sulfation. *FASEB J* **11**: 314-321.

- Glatt, H. R. (2001). Sulphotransferases, in C. Ioannides (ed.), Handbook of Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics. Sussex, John Wiley & Sons: 353-439.
- Glatt, H. R., R. Henschler, D. H. Phillips, J. W. Blake, P. Steinberg, A. Seidel und F. Oesch (1990). Sulfotransferase-mediated chlorination of 1-hydroxymethylpyrene to a mutagen capable of penetrating indicator cells. *Environ Health Perspect* **88**: 43-48.
- Glatt, H., K. Pauly, H. Frank, A. Seidel, F. Oesch, R. G. Harvey und G. Werle Schneider (1994a). Substance-dependent sex differences in the activation of benzylic alcohols to mutagens by hepatic sulfotransferases of the rat. *Carcinogenesis* **15**: 2605-2611.
- Glatt, H. R., A. Staffa-Pi e, N. Enders, W. Baidossi und J. Blum (1994b). The presence of KCl in the exposure medium strongly influences the mutagenicity of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli*. *Mutation Res* **324**: 111-114.
- Glatt, H. R., G. Werle-Schneider, N. Enders, S. Monnerjahn, J. Pudil, A. Czich, A. Seidel und M. Schwarz (1994c). 1-Hydroxymethylpyrene and its sulfuric acid ester: toxicological effects *in vitro* and *in vivo*, and metabolic aspects. *Chem-Biol Interact* **92**: 305-319.
- Glatt, H. R., K. Pauly, A. Czich, J. L. Falany und C. N. Falany (1995). Activation of benzylic alcohols to mutagens by rat and human sulfotransferases expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Pharmacol* **293**: 173-181.
- Glatt, H., I. Bartsch, S. Christoph, M. W. Coughtrie, C. N. Falany, M. Hagen, R. Landsiedel, U. Pabel, D. H. Phillips, A. Seidel und Y. Yamazoe (1998). Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems. *Chem-Biol Interact* **109**: 195-219.
- Goresky, C. A., K. S. Pang, A. J. Schwab, F. Barker, W. F. Cherry und G. G. Bach (1992). Uptake of a protein-bound polar compound, acetaminophene sulfate, by perfused rat liver. *Hepatology* **16**: 173-190.
- Grimmer, G., H. Brune, G. Dettbarn, U. Heinrich, J. Jacob, E. Mohtashamipur, K. Norpoth, F. Pott und R. Wenzel-Hartung (1988). Urinary and faecal excretion of chrysene and chrysene metabolites by rats after oral, intraperitoneal, intratracheal or intrapulmonary application. *Arch Toxicol* **62**: 401-405.
- Groopman, J. D., G. N. Wogan, B. D. Roebuck und T. W. Kensler (1994). Molecular biomarkers for aflatoxins and their application to human cancer prevention. *Cancer Res* **54**: S1907-S1911.
- Gundemann, D., V. Gorboulev, S. Gambaryan, M. Veyhl und H. Koepsell (1994). Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372**: 549-552.

- Gupta, R. (1984). Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6943-6947.
- Hald, J. und E. Jacobsen (1948). The formation of acetaldehyde in the organism after ingestion of Antabuse (tetraethylthiuramdisulphide) and alcohol. *Acta Toxicol Pharmacol* **4**: 305-310.
- Hanski, C. und P. Lawley (1985). Urinary excretion of 3-methyladenine and 1-methylnicotinamide by rats, following administration of [*methyl*-¹⁴C]methyl methanesulphonate and comparison with administration of [¹⁴C]methionine or formate. *Chem-Biol Interact* **55**: 225-234.
- Hartung, J., B. Elpelt und K. Klösner (1999). Statistik. Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik. München, Oldenbourg.
- Hazenberg, M. P., W. W. de Herder und T. J. Visser (1988). Hydrolysis of iodothyronine conjugates by intestinal bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **4**: 9-16.
- Hegstad, S., E. Lundanes, J. A. Holme und J. Alexander (1999). Characterization of metabolites of benz[*a*]aceanthrylene in faeces, urine and bile from rat. *Xenobiotica* **29**: 1257-1272.
- Henderson, R. F., W. E. Bechtold, J. A. Bond und J. D. Sun (1989). The use of biological markers in toxicology. *Crit Rev Toxicol* **20**: 65-82.
- Hiratsuka, A., N. Sebata, K. Kawashima, H. Okuda, K. Ogura, T. Watabe, K. Satoh, I. Hatayama, S. Tsuchida, T. Ishikawa und K. Sato (1990). A new class of rat glutathione *S*-transferase Yrs-Yrs inactivating reactive sulfate esters as metabolites of carcinogenic arylmethanols. *J Biol Chem* **265**: 11973-11981.
- Hiratsuka, A., T. Okada, T. Nishiyama, M. Fujikawa, K. Ogura, H. Okuda, T. Watabe und T. Watabe (1994). Novel *theta* class glutathione *S*-transferases Yrs-Yrs' and Yrs'-Yrs' in rat liver cytosol: their potent activity toward 5-sulfoxymethylchrysene, a reactive metabolite of the carcinogen 5-hydroxymethylchrysene. *Biochem Biophys Res Commun* **202**: 278-284.
- Ishikawa, T. (1992). The ATP-dependent glutathione *S*-conjugate export pump. *Trends in Biol Sci* **17**: 463-468.
- Jacob, J., G. Grimmer, G. Raab und A. Schmoldt (1982). The metabolism of pyrene by rat liver microsomes and the influence of various mono-oxygenase inducers. *Xenobiotica* **12**: 45-53.
- Johansson, B. (1992). A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl* **369**: 15-26.

- Kaslander, J. (1963). Formation of an S-glucuronide from tetraethylthiuram disulfide (Antabuse) in man. *Biochim Biophys Acta* **71**: 730-732.
- Kearns, C., R. Blakley, V. Santana und W. Crom (1994). Pharmacokinetics of cladribine (2-chloro-deoxyadenosine) in children with acute leukemia. *Cancer Res* **54**: 1235-1239.
- Klaassen, C. D. (1975). Biliary excretion of xenobiotics. *CRC Crit Rev Toxicol* **4**: 1-30.
- Knight, R. H. und L. Young (1958). Biochemical studies of toxic agents. *Biochem J* **70**: 111-119.
- Kokontis, J. M., S. S. Tsung, J. Vaughan-Johnson, H. Lee, R. G. Harvey und S. B. Weiss (1993). Mutation in *Escherichia coli* and mammalian cells induced by closely spaced 1-methylpyrene-deoxyadenosine adducts in opposite DNA strands. *Carcinogenesis* **14**: 645-651.
- Kretzschmar, M. (1996). Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp Toxic Pathol* **48**: 439-446.
- Kruber, O. und G. Grigoleit (1954). Über neue Stoffe des Steinkohlenteer-Pechs. *Chemische Berichte* **87**: 1895-1905.
- Krüger, M. and G. Salomon (1898a). Die Alloxurbasen des Harnes. *Z Phydiol Chem* **24**: 364-393.
- Krüger, M. and G. Salomon (1898b). Die Alloxurbasen des Harnes. *Z Phydiol Chem* **26**: 350-380.
- Kubota, H., W. Griest und M. Guerin (1975). Determination of carcinogens in tobacco smoke and coal derived samples: trace polynuclear aromatic hydrocarbons, in D. Hephill (ed.), Trace Substances in Environmental Health. Columbia, University of Missouri. **9**: 281-289.
- Kuhlow, A. (2001). Bildung, Verteilung und DNA-Bindung des reaktiven Sulfatester 1-Sulfooxy-methylpyren in der Ratte. Dissertation, Universität Potsdam
- Kuttesch, J. und J. Nelson (1982). Renal handling of 2'-deoxyadenosine and adenosine in humans and mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **8**: 221-229.
- Landsiedel (1998). Stoffwechsel und Mutagenität benzyliischer Verbindungen. Berlin, Logos-Verlag.
- Landsiedel, R., W. Engst, A. Seidel und H. R. Glatt (1996). Physico-chemical properties and mutagenicity of benzylic compounds. *Exp Toxicol Pathol* **48, Suppl. 2**: 215-222.
- Lash, L. H. und D. P. Jones (1984). Renal glutathione transport. Characteristics of the sodium-dependent system in the basal-lateral membrane. *J Biol Chem* **259**: 14508-14514.

- Leadon, S. A., R. M. Tyrrell und P. A. Cerutti (1981). Excision repair of aflatoxin B1-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer Res* **41**: 5125-5129.
- Legator, M., M. Ammenhaeuser und J. J. Ward (1993). Butadiene and styrene: Assessment of health hazards, in M. Soras, K. Peltonen, H. Vainio and K. Hemminki (eds.), Lyon, IARC Scientific Publications **127**: 253-263.
- Lindahl, R. und S. Evces (1984). Comparative Subcellular distribution of aldehyde dehydrogenase in rat, mouse and rabbit liver. *Biochem Pharmacol* **33**: 3383-3389.
- Loewen, S. K., A. M. Ng, S. Y. Yao, C. E. Cass, S. A. Baldwin und J. D. Young (1999). Identification of amino acid residues responsible for the pyrimidine and purine nucleoside specificities of human concentrative Na⁺ nucleoside cotransporters hCNT1 and hCNT2. *J Biol Chem* **274**: 24475-24484.
- Lowry, L. K. (1995). Role of biomarkers of exposure in the assessment of health risks. *Toxicol Lett* **77**: 31-38.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* **3**: 208-218.
- Maser, E. und G. Bannenberg (1994). 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase mediates reductive metabolism of xenobiotic carbonyl compounds. *Biochem. Pharmacol* **47**: 1805-1812.
- Moldeus, P., B. Andersson und A. Norling (1978). Interaction of ethanol oxidation with glucuronidation in isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **7**: 2583-2588.
- Monnerjahn, S., A. Seidel, P. Steinberg, F. Oesch, M. Hinz, J. J. Stezowsky, A. Hewer, D. H. Phillips und H. R. Glatt (1993). Formation of DNA adducts from 1-hydroxymethylpyrene in liver cells *in vivo* and *in vitro*, in: D. H. Phillips, M. Castegnaro and H. Bartsch (eds.), Postlabelling Methods for Detection of DNA Adducts, Lyon (France), IARC. **124**: 189-193.
- Moriwaki, Y., T. Yamamoto und K. Higashino (1999). Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol* **14**: 1321-40.
- Morris, M. (1987). Competition between two enzymes of substrate removal in liver: modulation effects of competitive pathways. *J Pharmacokin Biopharm* **15**: 437-496.
- Ogura, K., T. Sohtome, A. Sugiyama, H. Okuda, A. Hiratsuka und T. Watabe (1990). Rat liver cytosolic hydroxysteroid sulfotransferase (sulfotransferase a) catalyzing the formation of reactive sulfate esters from carcinogenic polycyclic hydroxymethylarenes. *Mol Pharmacol* **37**: 848-854.

- Okuda, M., H. Saito, Y. Urakami, M. Takano und K. Inui (1996). cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 500-507.
- Pang, K. (1987). Kinetic Modeling of conjugations in liver. *Fed Proc* **46**: 2439-2441.
- Pang, K. S., A. J. Schwab, C. A. Goresky und M. Chiba (1994). Transport, binding, and metabolism of sulfate conjugates in the liver. *Chem-Biol Interact* **92**: 179-207.
- Pataki, J. und C. Huggins (1969). Molecular site of substituents of benz[a]anthracene related to carcinogenicity. *Cancer Res* **29**: 506-509.
- Peterson, E. (1992). The pharmacology and toxicology of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand* **86**: 7-13.
- Phillips, D. H. und M. Castegnaro (1999). Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* **14**: 301-315.
- Ploemen, J. P., M. L. van Iersel, L. W. Wormhoudt, J. N. Commandeur, N. P. Vermeulen und P. J. van Bladeren (1996). In vitro inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by disulfiram and diethyldithiocarbamate. *Biochem Pharmacol* **52**: 197-204.
- Qian, G. S., R. K. Ross, M. C. Yu, J. M. Yuan, Y. T. Gao, B. E. Henderson, G. N. Wogan und J. D. Groopman (1994). A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **3**: 3-10.
- Renwick, A. und B. Drasar (1976). Environmental carcinogens and large bowel cancer. *Nature* **263**: 234.
- Rice, J. E., N. G. Geddie, M. C. DeFloria, E. J. LaVoie (1988). Structural requirements favoring mutagenic activity among methylated pyrenes in *S. typhimurium*, in M. Cooke, A. Dennis. (eds.) Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: A Decade of Progress, Columbus (Ohio), Battelle Press: 773-785.
- Rice, J. E., A. Rivenson, J. Braley und E. J. LaVoie (1987). Methylated derivatives of pyrene and fluorene: evaluation of genotoxicity in the hepatocyte/DNA repair test and tumorigenic activity in newborn mice. *J Toxicol Environ Health* **21**: 525-532.

- Rogan, E. G., N. V. S. RamaKrishna, S. Higginbotham, E. L. Cavalieri, H. Jeong, R. Jankowiak und G. J. Small (1990). Identification and quantitation of 7-(benzo[a]pyren-6-yl)guanine in the urine and feces of rats treated with benzo[a]pyrene. *Chem Res Toxicol* **3**: 441-444.
- Ross, R. K., J. M. Yuan, M. C. Yu, G. N. Wogan, G. S. Qian, J. T. Tu, J. D. Groopman, Y. T. Gao und B. E. Henderson (1992). Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet* **339**: 943-946.
- Rubin, E., H. Gang, P. S. Misra und C. S. Lieber (1970). Inhibition of drug metabolism by acute ethanol intoxication. A hepatic microsomal mechanism. *Am J Med* **49**: 801-806.
- Sancar, A. (1994). Mechanisms of DNA excision repair. *Science* **266**: 1954-1956.
- Shou, M. G. und S. K. Yang (1996). 3-Hydroxymethylcholanthrene: metabolic formation from 3-methylcholanthrene and stereoselective metabolism by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **24**: 595-601.
- Shuker, D. E., E. Bailey, A. Parry, J. Lamb und P. B. Farmer (1987). The determination of urinary 3-methyladenine in humans as a potential monitor of exposure to methylating agents. *Carcinogenesis* **8**: 959-962.
- Shuker, D. E. und P. B. Farmer (1992). Relevance of urinary DNA adducts as markers of carcinogen exposure. *Chem Res Toxicol* **5**: 450-460.
- Siegers, C. P., D. Riemann, E. Thies und M. Younes (1988). Glutathione and GSH-dependent enzymes in the gastrointestinal mucosa of the rat. *Cancer Lett* **40**: 71-76.
- Spahn-Langguth, H. und L. Z. Benet (1992). Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism. *Drug Metab Rev* **24**: 5-48.
- Stremmel, W., C. Tiribelli, K. Vyska (1993). The multiplicity of sinusoidal membrane carrier systems of organic anions, in N. Tavaloni, P.D. Berk (eds.), *Hepatic transport and bile acid secretion. Physiology and pathophysiology*, New York, Raven Press: 225-244.
- Strömme, J. (1963). Effects of diethyldithiocarbamate and disulfiram on glucose metabolism and glutathion content of human erythrocytes. *Biochem Pharmacol* **12**: 705-715.
- Sundheimer, D. und K. Brendel (1984). Factors influencing sulfation in isolated rat hepatocytes. *Life Sci* **34**: 23-29.

- Teubner, W., U. Pabel, W. Meinel, M. W. H. Coughtrie, C. N. Falany, M. Kretzschmar, A. Seidel und H. R. Glatt (1998). Characterisation of sulfotransferases in human colon mucosa and their expression in *Salmonella typhimurium* for the study of the activation of promutagens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **357**: R 135.
- Tierney, B., C. N. Martin und R. C. Garner (1987). Topical treatment of mice with benzo[a]pyrene or parenteral administration of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA to rats results in faecal excretion of a putative benzo[a]pyrene diol epoxide-deoxyguanosine adduct. *Carcinogenesis* **8**: 1189-1192.
- Tottmar, S., H. Pettersson und K. Kiessling (1973). The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenases in rat liver. *Biochem J* **135**: 577-586.
- van Doorn, R., C. M. Leijdekkers, R. P. Bos, R. M. E. Brouns und P. T. Henderson (1981). Alcohol and sulphate intermediates in the metabolism of toluene and xylenes to mercapturic acids. *J Appl Toxicol* **1**: 236-242.
- Van Houten, B. (1990). Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **54**: 18-51.
- van Welie, R. T., R. G. van Dijck, N. P. Vermeulen und N. J. van Sittert (1992). Mercapturic acids, protein adducts, and DNA adducts as biomarkers of electrophilic chemicals. *Crit Rev Toxicol* **22**: 271-306.
- Vogel, E. und F. Klärner (1968). 1,2-Naphthalene Oxide. *Angew Chem Internat Edit* **7**: 374-375.
- Whitehouse, L. W., C. J. Paul, B. B. Coldwell und B. H. Thomas (1975a). Effect of ethanol on diazepam distribution in rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **12**: 221-242.
- Whitehouse, L. W., C. J. Paul und B. H. Thomas (1975b). Effect of aspirin on fate of ¹⁴C-acetaminophene in guinea pigs. *J Pharm Sci* **64**: 819-821.
- Williams, R. (1959). Detoxication Mechanisms. London, Chapman & Hall.
- Yang, Y., W. J. Griffiths, T. Midtvedt, J. Sjøvall, J. Rafter und J. A. Gustafsson (1999). Characterization of conjugated metabolites of benzo[a]pyrene in germ-free rat urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* **12**: 1182-1189.
- Yu, M. und R. Hites (1981). Identification of organic compounds on diesel engine soot. *Anal Chem* **53**: 951-954.

Zaman, G. J., J. Lankelma, O. van Tellingen, J. Beijnen, H. Dekker, C. Paulusma, R. P. Oude Elferink, F. Baas und P. Borst (1995). Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7690-7694.

7. Anhang

Tabelle 7.1 Prozentualer Anteil einzelner Metaboliten an der jeweils in Urin bzw. Faeces ausgeschiedenen Radioaktivität sowie daraus resultierender relativer Anteil der jeweiligen Metaboliten an der in 24 h insgesamt ausgeschiedenen Radioaktivität. Es wurde die 24-h-Faeces- und –Urinproben von je vier männlichen und weiblichen Ratten untersucht. Die Zuordnung der Metaboliten erfolgt wie beschrieben (3.2.3). Die Bezeichnung der Metaboliten entspricht der Darstellung in Abbildung 3.12. Der prozentuale Flächenanteil der Metaboliten ergibt sich direkt aus dem jeweiligen Radiochromatogramm. Der Anteil jeweiliger Metaboliten an der Exkretion über Urin bzw. über Faeces ergibt sich aus dem Produkt der prozentualen Peakfläche und des Anteils von Urin bzw. Faeces an der in 24 h ausgeschiedenen Radioaktivität. Bei den Männchen wurden jeweils 66,9 %, 96,3%, 49,1 % und 56,1 %¹ der in 24 h ausgeschiedenen Radioaktivität in Urin und 33,1 %, 3,7 %, 50,9 % und 43,9 %² in Faeces gefunden, während beim Weiblich jeweils 36,3 %, 35,9 %, 38,8 %, 79,0 %³ renal und 63,7 %, 64,1 %, 61,2 % und 21,0 %⁴ biliär ausgeschieden wurden. Der Anteil eines Metaboliten an der in 24 h insgesamt ausgeschiedenen Radioaktivität resultiert aus der Summe des jeweiligen Prozentsatzes in Urin und Faeces. Nicht identifizierte Metaboliten wurde mit n.i. bezeichnet.

Männchen 1					
Metabolit	% Peakfläche (Pf)		% ausgeschiedener Metaboliten		
	Urin	Faeces	in Urin (= % Pf, Urin x 66,9 % ¹)	in Faeces (= % Pf, Faeces x 33,1 % ²)	gesamte Exkretion in 24 h
1	28,2	n.i.	18,9	0	18,9
2	17,3	n.i.	11,6	0	11,6
3	3,1	n.i.	2,1	0	2,1
4	1,5	n.i.	1,0	0	1,0
5	5,7	n.i.	3,8	0	3,8
6	n.i.	n.i.	0	0	0
7	11,6	26,9	7,7	8,9	16,7
8	19,1	67,3	12,8	22,3	35,0
9	0,9	2,9	0,6	1,0	1,6
Summe	98,9	97,1	66,2	32,1	98,3

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 1

Männchen 2					
Metabolit	% Peakfläche (Pf)		% ausgeschiedener Metaboliten		
	Urin	Faeces	in Urin (= % Pf, Urin x 96,3 % ¹)	In Faeces (= % Pf, Faeces x 3,7 % ²)	gesamte Exkretion in 24 h
1	30,5	n.i.	29,4	0	29,4
2	19,6	n.i.	18,9	0	18,9
3	3,1	n.i.	3,0	0	3,0
4	1,8	n.i.	1,7	0	1,7
5	1,9	n.i.	1,8	0	1,8
6	n.i.	8,2	0,0	0,3	0,3
7	3,3	20,1	3,2	0,7	3,9
8	30,7	61,6	29,5	2,3	31,8
9	0,7	2,5	0,7	0,1	0,8
10	0,5	5,7	0,5	0,2	0,7
Summe	91,9	98,1	88,5	3,6	92,2

Männchen 3					
Metabolit	% Peakfläche (Pf)		% ausgeschiedener Metaboliten		
	Urin	Faeces	in Urin (= % Pf, Urin x 49,1 % ¹)	In Faeces (= % Pf, Faeces x 50,9 % ²)	gesamte Exkretion in 24 h
1	34,31	1,5	16,8	0,8	17,6
2	20,55	n.i.	10,1	0	10,1
3	8,25	n.i.	4,1	0	4,1
4	4,16	1,3	2,0	0,6	2,7
5	3,18	1,3	1,6	0,7	2,2
6	n.i.	4,2	0	2,1	2,1
7	14,74	19,7	7,2	10,0	17,3
8	10,25	48,4	5,0	24,6	29,7
9	n.i.	2,5	0	1,3	1,3
10	n.i.	14,2	0	7,2	7,2
Summe	95,4	93,1	46,9	47,4	94,2

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 1

Männchen 4					
Metabolit	% Peakfläche (Pf)		% ausgeschiedener Metaboliten		
	Urin	Faeces	in Urin (= % Pf, Urin x 56,1 % ¹)	in Faeces (= % Pf, Faeces x 43,9 % ²)	gesamte Exkretion in 24 h
1	36,2	2,0	20,3	0,9	21,2
2	12,5	1,8	7,0	0,8	7,8
3	3,4	n.i.	1,9	0	1,9
4	1,8	n.i.	1,0	0	1,0
5	7,8	0,8	4,4	0,3	4,7
6	n.i.	2,1	0,0	0,9	0,9
7	7,8	19,9	4,4	8,7	13,1
8	13,6	30,7	7,6	13,5	21,1
9	n.i.	5,1	0	2,2	2,2
10	n.i.	27,8	0	12,2	12,2
Summe	83,1	90,1	46,6	39,5	86,2

Weibchen 1					
Metabolit	% Peakfläche (Pf)		% ausgeschiedener Metaboliten		
	Urin	Faeces	in Urin (= % Pf, Urin x 36,3 % ³)	in Faeces (= % Pf, Faeces x 63,7 % ⁴)	gesamte Exkretion in 24 h
1	33,3	1,2	12,1	0,8	12,9
2	37,3	n.i.	13,5	0	13,5
3	n.i.	1,9	0	1,2	1,2
4	3,4	n.i.	1,2	0	1,2
5	3,4	n.i.	1,2	0	1,2
6	8,0	4,6	2,9	2,9	5,8
7	12,2	27,6	4,4	17,6	22,0
8	2,4	37,1	0,9	23,7	24,5
9	n.i.	2,0	0	1,3	1,3
10	n.i.	15,4	0	9,8	9,8
Summe	100,0	89,8	36,3	57,2	93,5

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 1

Weibchen 2					
Metabolit	% Peakfläche (Pf)		% ausgeschiedener Metaboliten		
	Urin	Faeces	in Urin (= % Pf, Urin x 35,9 % ³)	in Faeces (= % Pf, Faeces x 64,1 % ⁴)	gesamte Exkretion in 24 h
1	34,6	n.i.	12,4	0	12,4
2	17,0	1,8	6,1	1,1	7,2
3	3,6	n.i.	1,3	0	1,3
4	0,7	n.i.	0,3	0	0,3
5	6,4	1,4	2,3	0,9	3,2
6	n.i.	7,1	0	4,6	4,6
7	12,9	24,5	4,6	15,7	20,3
8	15,5	50,9	5,6	32,6	38,2
9	n.i.	6,2	0	3,9	3,9
10	n.i.	3,4	0	2,2	2,2
Summe	90,8	95,2	32,6	61,0	93,6

Weibchen 3					
Metabolit	% Peakfläche (Pf)		% ausgeschiedener Metaboliten		
	Urin	Faeces	in Urin (= % Pf, Urin x 38,8 % ³)	in Faeces (= % Pf, Faeces x 61,2 % ⁴)	gesamte Exkretion in 24 h
1	25,9	n.i.	10,1	0	10,1
2	20,2	2,0	7,8	1,2	9,1
3	3,0	n.i.	1,2	0	1,2
4	2,5	n.i.	1,0	0	1,0
5	5,0	0,7	1,9	0,5	2,4
6	n.i.	10,3	0,0	6,3	6,3
7	9,0	22,0	3,5	13,5	17,0
8	24,3	51,0	9,4	31,2	40,6
9	0,6	3,7	0,2	2,3	2,5
10	n.i.	2,7	0	1,6	1,6
Summe	90,5	92,3	35,1	56,5	91,6

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 1

Weibchen 4					
Metabolit	% Peakfläche (Pf)		% ausgeschiedener Metaboliten		
	Urin	Faeces	in Urin (= % Pf, Urin x 79 % ³)	in Faeces (= % Pf, Faeces x 21 % ⁴)	gesamte Exkretion in 24 h
1	29,7	1,6	23,4	0,3	23,8
2	18,3	1,3	14,5	0,3	14,7
3	7,8	n.i.	6,2	0	6,2
4	1,6	n.i.	1,2	0	1,2
5	n.i.	3,9	0,0	0,8	0,8
6	8,7	18,2	6,9	3,8	10,7
7	5,5	2,5	4,3	0,5	4,9
8	22,8	54,9	18,0	11,5	29,6
9	n.i.	n.i.	0	0	0
10	n.i.	3,3	0	0,7	0,7
Summe	94,3	85,6	74,5	18,0	92,5

Tabelle 7.2 Zeitkurve der renalen Ausscheidung von MPMA in Ratten nach Applikation von HMP. Je drei weibliche Ratten (F1, F2, F3) und männliche Ratten (M1, M2, M3) bekamen einmalig 1-HMP (250 µmol / kg KM, i.p.) appliziert. Der Zeitpunkt der Behandlung wurde als 0 h bezeichnet. 16 h vor der Applikation wurden die Tiere in Stoffwechsellkäfige gesetzt. Der bis zum Zeitpunkt 0 h gesammelte Urin diente als Kontrolle. Die Urinentnahme nach der Applikation wurde in den gezeigten Zeitintervallen vorgenommen.

Sammelperiode (h)	MPMA in Urin						
	nmol/g Kreatinin			% Dosis x 10 ⁴			
Weibchen		<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>
(-16) - 0	< 10 ^c	< 10 ^c	< 10 ^c	- ^b	- ^b	- ^b	
0 - 3	1558	159	1254	36	1	5	
3 - 6	- ^a	- ^a	5661	0	0	12	
6 - 9	8368	- ^a	32560	429	0	580	
9 - 12	5696	7175	5086	203	262	243	
12 - 24	474	3071	4083	128	122	278	
24 - 48	43	1027	1531	38	37	337	
Σ 0 - 48	- ^b	- ^b	- ^b	834	422	1455	
Σ 48 - 168	- ^b	- ^b	- ^b	23	1	355	
Männchen		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>
(-16) - 0	< 10 ^c	< 10 ^c	< 10 ^c	- ^b	- ^b	- ^b	
0 - 1,5	184	306	209	2	3	2	
1,5 - 3	691	178	- ^a	9	2	0	
3 - 6	3437	45	34	49	1	5	
6 - 9	324	< 13	454	6	< 0.5	12	
9 - 12	2593	< 11	252	48	< 0.5	5	
12 - 24	562	59	83	83	8	7	
24 - 48	139	40	101	21	5	15	
Σ 0 - 48	- ^b	- ^b	- ^b	218	19	46	
Σ 48 - 168	- ^b	- ^b	- ^b	24	13	27	

^a keine Urinausscheidung in der genannten Sammelperiode.

^b nicht anwendbar.

^c unter dem Detektionslimit.

Tabelle 7.3 Ausscheidung von MPMA in Faeces von Ratten nach einmaliger Applikation mit HMP. Die Daten beziehen sich auf die selben Tiere wie in Tabelle 4.

Sammel- periode (h)	MPMA in Faeces					
	nmol			% Dosis x 10 ⁴		
weiblich	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>
0 - 24	8,4	3,2	3,8	233	74	112
24 - 48	5,7	2,8	3,0	158	65	88
männlich	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>
0 - 24	13,2	0,8	7,6	264	18	116
24 - 48	4,3	< 0,3 ^a	3,1	87	< 7 ^a	47
48 - 72	2,4	< 0,2 ^a	0,5	49	< 5 ^a	8
72 - 96	< 0,7 ^a	< 0,4 ^a	< 0,4 ^a	< 14 ^a	< 8 ^a	< 6 ^a

^a Detektionslimit

Tabelle 7.4 Die Gesamtausscheidung von MPMA innerhalb 48 nach HMP-Applikation. Die Daten beziehen sich auf die selben Tiere wie in Tabellen 2 und 3. Beim Tier M2 lag die Ausscheidung der MPMA in Faeces zwischen 24 und 48 h unter dem Detektionslimit von 0,3 nmol.

		MPMA (nmol)		
weiblich		<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>
	Urin	29,8	17,9	49,1
	Faeces	14,1	6,0	6,8
	Summe	43,9	23,9	55,9
	Anteil Faeces	32 %	25 %	12 %
männlich		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>
	Urin	10,9	0,9	3,0
	Faeces	17,5	0,8 - 1,1	10,7
	Summe	28,4	1,7 - 2,0	13,7
	Anteil Faeces	62 %	47 - 55 %	78 %

Tabelle 7.5 Ausscheidung von MPMA in Urin von Ratten nach einmaliger Applikation von MP. Drei männliche Ratten (M-MP1, M-MP2, M-MP3) wurde mit MP (250 µmol / kg KM, i.p.) behandelt. Der Zeitpunkt der Behandlung wurde als 0 h bezeichnet. 16 h vor der Applikation wurden die Tiere in die Stoffwechselfäfige gesetzt. Der bis zum Zeitpunkt 0 h gesammelte Urin diente als Kontrolle. Die Urinentnahme nach der Applikation wurde in den gezeigten Zeiträumen vorgenommen.

Sammel- periode (h)	MPMA in Urin					
	nmol/g Kreatinin			% Dosis x 10 ⁴		
	<i>M-MP1</i>	<i>M-MP2</i>	<i>M-MP3</i>	<i>M-MP1</i>	<i>M-MP2</i>	<i>M-MP3</i>
(-16) - 0	< 10 ^a	< 10 ^a	< 10 ^a	- ^b	- ^b	- ^b
0 - 3	118	82	567	1,0	2,3	5,9
3 - 6	270	417	444	3,0	6,9	6,1
6 - 9	298	416	1349	11,2	7,8	44,1
9 - 12	167	479	2153	2,1	5,2	49,8
12 - 24	74	182	433	0,8	0,8	4,5
24 - 48	< 10 ^a	246	394	- ^b	0,9	3,4
Summe	- ^b	- ^b	- ^b	18,1	23,9	113,7

^a Detektionslimit

^b nicht anwendbar.

Tabelle 7.6 Zeitkurve der renal ausgeschiedenen MPMA in weiblichen Ratten nach Applikation von SMP. Zwei weibliche Ratten (Tier 1 und 2) wurden mit SMP (250 µmol/kg KM, i.p.) behandelt. Der Zeitpunkt der Behandlung wurde als 0 h bezeichnet. 16 h vor der Applikation wurden die Tiere in Stoffwechselfäße gesetzt. Der bis zum Zeitpunkt 0 h gesammelte Urin diente als Kontrollurin. Die Urinentnahme nach der Applikation wurde in den gezeigten Zeitintervallen vorgenommen.

Sammelperiode (h)	MPMA im Urin			
	nmol / g Kreatinin		% Dosis x 10 ⁴	
	<i>Tier 1</i>	<i>Tier 2</i>	<i>Tier 1</i>	<i>Tier 2</i>
(-16)-0	< 10	< 10	- ^a	- ^a
0-1,5	15987	936	163	2
1,5-3	70993	488	786	7
3-6	120794	25439	2677	575
6-9	53737	2908	1007	38
9-12	35962	730	710	19
12-24	13430	8351	650	513
24-48	993	1224	147	158
Ab 48	- ^a	- ^a	9 ^b	102 ^b
(kumulativ)				
Gesamt	- ^a	- ^a	6149	1414

^a nicht anwendbar

^b Tier 1 und Tier 2 starben 72 h bzw. 144 h nach Applikation

Tabelle 7.7 SMP-Plasmakonzentration nach Behandlung mit HMP. Pro Gruppe vier bis acht Ratten bekamen eine einmalige i.p. Injektion von HMP (250 µmol / kg KM). Die Disulfiram- und die Ethanolgruppen wurden entsprechend vorbehandelt (Abschnitt 2.4.6). Die Tiere wurden 3 h nach der HMP-Applikation durch Dekapitation getötet. Plasmaproben stammten vom Tötungszeitpunkt. Jeder Wert stellt ein Tier dar.

	1-SMP Plasmakonzentration (µM)			
	Kontrolle	Disulfiram	Ethanol	
Weiblich	0,24	0,68	0,29	
	0,19	0,62	0,50	
	0,14	0,50	0,07	
	0,50	0,59	0,10	
	Mittelwert ± S.D.	0,27 ± 0,16	0,62 ± 0,09	0,24 ± 0,20
Männlich	0,53	4,08	1,52	
	0,74	4,60	0,68	
	0,18	0,12	0,59	
	0,26	0,38	2,26	
		0,84		
		0,67		
		8,24		
		1,76		
	Mittelwert ± S.D.	0,43 ± 0,26	2,59 ± 2,84	1,26 ± 0,79

Tabelle 7.8 Beeinflussbarkeit der DNA-Addukthäufigkeit in der Leber nach der HMP-Behandlung. Pro Gruppe vier bis acht Ratten bekamen eine einmalige i.p. Injektion von HMP (250 µmol / kg KM). Die Disulfiram- und Ethanolgruppen wurden entsprechend vorbehandelt (Abschnitt 2.4.6). Die Tiere wurden 3 h bzw. 24 h nach der HMP-Applikation durch Dekapitation getötet. Die Leber wurde sofort entnommen und bis zum Untersuchungszeitpunkt bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Jeder Wert stellt ein Tier dar.

		Addukte / 10^8 Nukleotide		
		Kontrolle	Disulfiram	Ethanol
3 h	Weiblich	113	368	57
		74	341	249
		15	280	12
		224	503	32
		Mittelwert \pm SD	94 ± 28	373 ± 94
	Männlich	280	1820	3870
		158	1970	215
		250	151	1504
		145	17	2927
		Mittelwert \pm SD	208 ± 67	1595 ± 2048
24 h	Weiblich	21	23	82
		15	32	52
		19	77	45
		11	4	77
		Mittelwert \pm S.D.	17 ± 4	34 ± 31
	Männlich	39	595	19
		72	56	362
		183	81	736
		101	367	715
		Mittelwert \pm S.D.	99 ± 62	275 ± 256

Tabelle 7.9 Beeinflussbarkeit der MPMA-Ausscheidung in Urin und Faeces nach Applikation von HMP. Pro Gruppe vier Ratten bekamen eine einmalige i.p. Injektion von HMP (250 µmol/kg KM). Die Disulfiram- und Ethanolgruppen wurden entsprechend vorbehandelt (Abschnitt 6.4.6). Die Tiere wurden 16 h vor und unmittelbar nach der HMP-Applikation in Stoffwechselfägen gehalten, Urin- und Faecesproben wurden gesammelt und auf MPMA-Ausscheidung untersucht. Jeder Wert stellt ein Tier dar. In einer Zeile stehende Urin- und Faeceswerte stammen vom gleichen Tier.

		MPMA (nmol)				
		Urin	Faeces	Urin + Faeces	Mittelwert ± S.D.	
Weiblich	Kontrolle	18	7,1	25,0	28,3 ± 5,2	
		19,8	6,1	25,9		
		32,4	3,6	36,0		
		21,6	4,6	26,2		
	Disulfiram	27,8	7,5	35,4	42,2 ± 10,8	
		36,1	4,2	40,4		
		56,2	1,8	58,0		
		21,5	13,5	35,0		
	Ethanol	128,2	9,9	138,1	90,0 ± 42,1	
		103,5	8,6	112,1		
		48,2	10,3	58,5		
		37,8	13,3	51,1		
	Männlich	Kontrolle	3,2	3,8	7,0	10,8 ± 10,2
			5,7	19,4	25,1	
			1,4	0,48	1,9	
			5,9	1,2	7,1	
Mit Disulfiram		3,1	0,2	3,3	28,5 ± 24,8	
		13,9	0,1	14,0		
		16,2	42,4	58,6		
		6,1	32,2	38,3		
Mit Ethanol		3,0	11,5	14,5	51,0 ± 66,8	
		20,9	6,5	27,4		
		119,9	30,7	150,6		
		8,9	2,6	11,5		

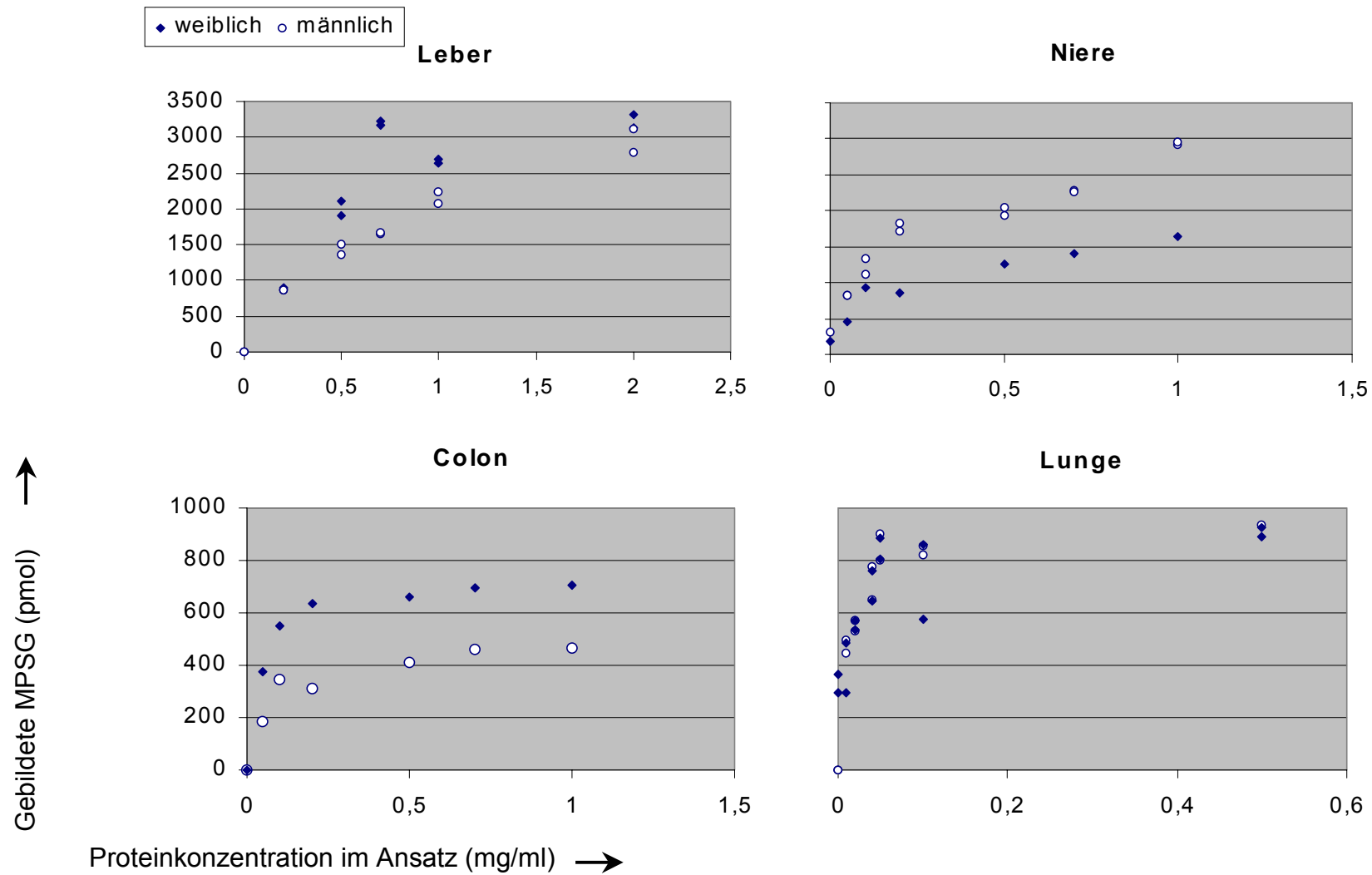


Abbildung 7.1 MPSG-Bildung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Hierzu wurde Cytosol (0,01 bis 2 mg Protein) ad 445 μ l Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,4) und 50 μ l GSH (10 mM in Phosphatpuffer, unter Argon) vorgelegt. Nach einminütiger Vorinkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l SMP (10 mM in DMSO) gestartet. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Die Angabe sind abzüglich der Werte, welche aus Inkubationen mit entsprechenden Proteinmengen jedoch ohne den Zusatz des GSH ermittelt wurden.

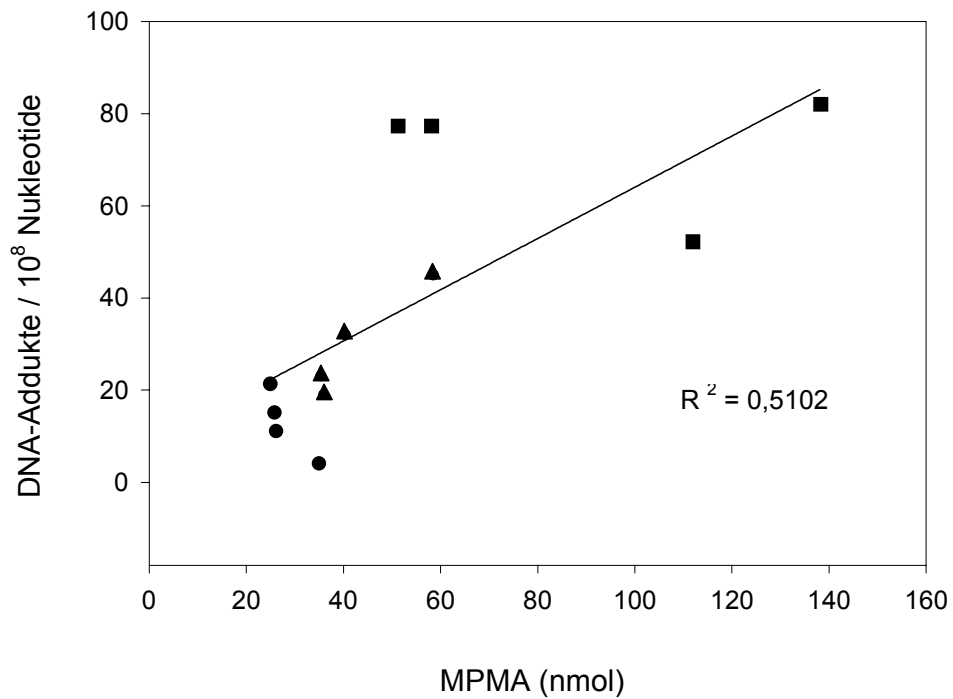
weiblich

Abbildung 7.2 Zusammenhang zwischen MPMA-Ausscheidung (Tab. 8) und DNA-Adduktlevel in der Leber (Tab. 9) in weiblichen Ratten. Die MPMA-Ausscheidung ergibt sich aus der Gesamtexkretion über Urin und Faeces innerhalb von 24 h. Die Punkte beziehen sich auf einzelne Tiere (● Kontrolle, ▲ Ethanol, ■ Disulfiram)

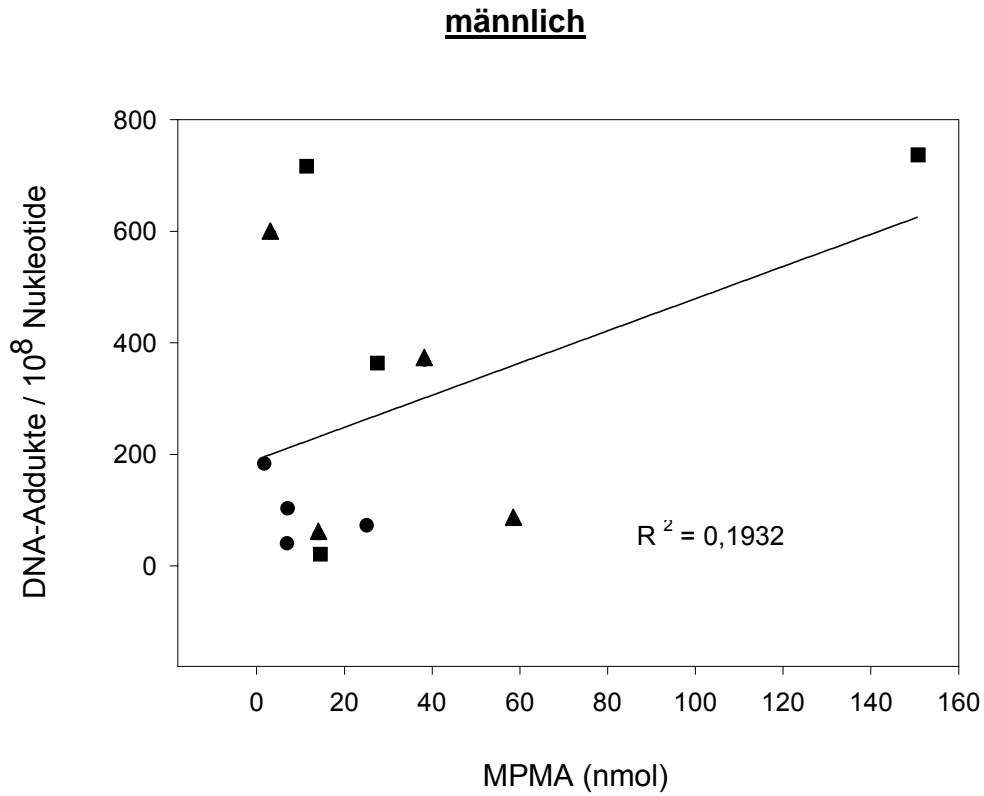


Abbildung 7.3 Zusammenhang zwischen MPMA-Ausscheidung (Tab. 8) und DNA-Adduktlevel in der Leber (Tab. 7) in männlichen Ratten. Die MPMA-Ausscheidung ergibt sich aus der Gesamtexkretion über Urin und Faeces innerhalb von 24 h. Die Punkte beziehen sich auf einzelne Tiere (● Kontrolle, ▲ Ethanol, ■ Disulfiram).

Dank

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hansruedi Glatt, der mir das Thema bereitstellte. Er förderte mich zu selbständiger Arbeit, tolerierte meine Fehler und gab mir viele fruchtbare Hinweise. Er unterstützte mich bei der Weiterbildung in der Toxikologie und gab mir viele Gelegenheiten, meine Ergebnisse zu präsentieren.

Dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung danke ich für mein finanzielles Auskommen und für die Möglichkeit zur Nutzung der Labore und Geräte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Martina Scholtyssek, die mir nicht nur bei den wichtigsten Teilen meiner Arbeit tatkräftig assistierte, sondern mir auch psychisch und seelisch stets zur Seite stand. Frau Brigitte Knuth, die mich fast adoptiert hat, danke ich ganz herzlich dafür, dass sie mir auf mütterliche Art und Weise mit Rat und Tat zur Seite stand, sowohl innerhalb als auch außerhalb des Institutes.

Herrn Dr. Robert Landsiedel und Herrn Dr. Albrecht Seidel danke ich für die vielen wertvollen Hinweise, die meine Arbeit wesentlich vorantrieben.

Insbesondere danke ich auch Herrn Andreas Kuhlow für die langjährige freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen interessanten Diskussionen.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Frau Heli Hollnagel und Frau Dr. Eva Muckel für die geduldigen Korrekturen meiner Texte. Hier gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Dr. Heiko Schneider, der viele hunderttausend Male meine Texte ganz schnell durcharbeiten musste.

Ein großes Dankeschön geht natürlich an die Mitarbeiterinnen aus dem MRL Frau Elke Thom und Frau Ute Lehmann, die mit viel Engagement für den reibungslosen Ablauf der Tierversuche sorgten.

Bei Herrn Dr. Wolfram Engst bedanke ich mich dafür, dass er mich ertragen hat ohne nachtragend zu sein.

Nicht vergessen sind auch alle anderen Mitarbeiter des DIfE, die durch Schaffung einer anregenden Arbeitsatmosphäre auf vielfältige Weise am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren.