

Aus dem Walther-Straub-Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. T. Gudermann

**Vergleichende Untersuchung zum Metabolismus von
nano- und mikromolaren Konzentrationen des
tabakspezifischen Nitrosamins NNK in humanen
Leber- und Lungenmikrosomen**

Dissertation zum
Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von
Irene Doering
aus
München

München 2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Elmar Richter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Reinhart Zachoval

Prof. Dr. Matthias Gries

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2010

Das Schönste, was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle.

(Albert Einstein)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen	VII
Zusammenfassung.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Aufgabenstellung.....	1
1.2 Tabak und Rauchen.....	3
1.2.1 Tabak und die Geschichte des Tabakkonsums	3
1.2.2 Tabakkonsum und seine Auswirkungen auf die Gesundheit	4
1.2.3 Zusammensetzung des Tabakrauchs	6
1.3 Nitrosamine und Gesundheit.....	8
1.3.1 Gefahrenpotenzial der Nitrosamine.....	8
1.3.2 Endogene und exogene Nitrosaminbelastung	11
1.3.3 Entstehung der TSNA	13
1.3.4 Kanzerogene und mutagene Wirkung der TSNA.....	15
1.4 Toxikokinetik	17
1.4.1 Der Fremdstoffmetabolismus	18
1.4.2 Der Metabolismus von NNK.....	22
2 Material und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 HPLC-System.....	27
2.1.2 Laborgeräte	27
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.4 Zellfraktionen.....	28
2.1.5 Chemikalien.....	28
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	29
2.1.7 HPLC-Fließmittel	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Vorversuche	30
2.2.2 Mikrosomaler Metabolismus.....	31

2.2.3	Auswertung der Daten	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	HPLC-Analytik	35
3.1.1	Etablierung der Methode	35
3.1.2	NNK und seine Metaboliten.....	36
3.2	Mikrosomaler Metabolismus von NNK.....	37
3.2.1	Kinetik.....	37
3.2.2	Hemmversuche	45
3.2.3	Einfluss von Nicotin und Cotinin	73
4	Diskussion.....	81
4.1	HPLC-Analytik	81
4.2	Mikrosomaler Metabolismus von NNK.....	81
4.2.1	Kinetik.....	82
4.2.2	Hemmversuche	84
4.2.3	Einfluss von Nicotin und Cotinin	90
5	Literaturverzeichnis	93
Anhang	107
Danksagung	137

Abkürzungen

CYP	Cytochrom P450
CZ	Chlorzoxazon
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
Diol	4-Hydroxy-4-(3-pyridyl)-butanol
ETS	environmental tobacco smoke
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase
HDL	high density lipoprotein
HPB	4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon
HPLC	High performance liquid chromatography
HS	Hauptstromrauch
11 β -HSD-1	11 β -Steroiddehydrogenase TYP 1
Hydroxysäure	4-Hydroxy-4-(3-pyridyl)-butansäure
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDLH	immediate dangerous for life or health
<i>iso</i> -NNAC	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure
<i>iso</i> -NNAL	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol
Ketosäure	4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butansäure
LDL	low density lipoprotein
LOD	limit of detection
MAK	maximale Arbeitsplatzkonzentration
MOP	8-Methoxypsoralen
n.s.	nicht signifikant
NAB	<i>N'</i> -Nitrosoanabasin
NADP/NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAT	<i>N'</i> -Nitrosoanatabin
NF	α -Naphthoflavon
NDMA	<i>N</i> -Nitrosodimethylamin
NNA	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-butanal
NNAC	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-butansäure
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol [nicotine-derived nitrosamino alcohol]
NNAL-Gluc	O- und N-Glucuronide von NNAL
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon [nicotine-derived nitrosaminoketone]
NNN	<i>N</i> -Nitrosonornicotin
NOAEL	no observed adverse effect level
NS	Nebenstromrauch
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
POR	NADPH Cytochrom P450 Reduktase
SCE	sister chromatid exchange = Schwesterchromatidaustausch
TAO	Troleandomycin
TSNA	tabakspezifische Nitrosamine
VLDL	very low density lipoprotein

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die konzentrationsabhängige Metabolisierung des tabak-spezifischen Nitrosamins 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) in den Mikro-somen von Lunge und Leber des Menschen zu charakterisieren. Es wurden kommerziell erhältliche gepoolte Mikrosomen verwendet um vergleichbare Ergebnisse in den verschie-denen Ansätzen zu erzielen. Die Mikrosomen wurden bei einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/mL 20 min mit [5-³H]-NNK inkubiert. Zur Bestimmung der Kinetik kamen je 16 Kon-zentrationen von 0,006 bis 499 μ M zum Einsatz. Die Charakterisierung des NNK-Meta-bolismus mit spezifischen Hemmstoffen für Cytochrom P450 (CYP) Isoenzyme, α -Naph-thoflavon (NF; CYP 1A1/2), 8-Methoxypsoralen (MOP; CYP 2A6/13), Chlorzoxazon (CZ; CYP 2E1) und Troleandomycin (TAO; CYP 3A4/5) alleine und in Kombination aller 4 Stoffe, erfolgte bei 46 nM und 49 μ M NNK und Hemmstoffkonzentrationen von 1, 5, 10, 25 und 50 μ M. Der Einfluss von Nicotin und seines Hauptmetaboliten Cotinin wurde bei den gleichen NNK-Konzentrationen mit einem 300- bzw. 3000-fachen Überschuss der Alkaloide geprüft. Art und Menge der entstandenen Metaboliten wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromato-graphie (HPLC) mit on-line Radioaktivitätsdetektion ermittelt. Durch Einsatz eines neuen Detektors mit vier hintereinander liegenden Messzellen und integrierten Additionsverfahren gelang es die Nachweisgrenze gegenüber handelsüblichen Detektoren um den Faktor 10 zu senken. Die Zuordnung der Metaboliten erfolgte durch Co-Chromatographie von Referenz-substanzen, die durch UV-Detektion bei 245 nm bestimmt wurden.

In Humanlebermikrosomen wurden 5 NNK-Metaboliten nachgewiesen, das Reduktions-produkt 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), die Produkte der α -Methylen-hydroxylierung von NNK und NNAL, 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butansäure (Ketosäure) und 4-Hy-droxy-4-(3-pyridyl)-butansäure (Hydroxysäure), das Produkt der α -Methylhydroxylierung von NNK, 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) und das *N*-Oxidationsprodukt von NNK, das NNK-*N*-Oxid. Humane Lungenmikrosomen bildeten die gleichen Metaboliten außer HPB.

Die Umsätze konnten für alle Metaboliten über den gesamten Konzentrationsbereich von 6 nM bis 500 μ M einer Reaktionskinetik nach Michaelis-Menten angepasst werden. Bei Anpassung nur im niedrigen, nanomolaren Bereich ergaben sich für alle Metaboliten außer Ketosäure und HPB k_m - und V_{max} -Werte, die um 2 bis 3 Größenordnungen niedriger lagen als die Werte, die für den gesamten Konzentrationsbereich erhalten wurden. Dabei änderte sich die katalytische Effizienz, der Quotient aus V_{max}/k_m -Werten nur geringfügig.

Die Hemmstoffe wirkten in Lebermikrosomen stärker als in Lungenmikrosomen. Bei keinem der Hemmversuche konnte jedoch selbst unter Verwendung der höchsten Konzen-

tration eine vollständige Hemmung der NNK-Verstoffwechslung durch α -Hydroxylierung und *N*-Oxidation erzielt werden.

Die CYP-Inhibitoren hatten erwartungsgemäß nur einen geringen Einfluss auf die NNK-Reduktion zu NNAL. In der Leber wurde die HPB-Bildung am stärksten gehemmt, gefolgt von der NNK-*N*-Oxidation, der Bildung von Ketosäure und der Bildung von Hydroxysäure. In Lungenmikrosomen war die Hemmung der NNK-*N*-Oxidation am stärksten ausgeprägt. Die größten Unterschiede zwischen der nano- und der mikromolaren NNK-Konzentration zeigte sich in Lebermikrosomen bei Einsatz von NF mit mäßiger bis starker Hemmung aller Stoffwechselwege bei 46 nM NNK und keiner Hemmung bis z.T. leichter Steigerung des Metabolismus bei 49 μ M NNK. Auffällige Unterschiede auch bei TAO in Leber und Lunge und bei CZ in der Leber zeigen, dass sich Versuche mit bisher verwendeten hohen NNK-Konzentrationen nur bedingt auf niedrigere Konzentrationen übertragen lassen.

Die in früheren Untersuchungen gezeigte Hemmung des NNK-Stoffwechsels konnte bei der mikromolaren NNK-Konzentration für die α -Hydroxylierung von NNK in Lungen- und Lebermikrosomen bestätigt werden. In der Leber wurde auch die NNK-*N*-Oxidation deutlich gehemmt. Überraschend war die Hemmung der Reduktion von NNK zu NNAL in Lungen- und Lebermikrosomen. All diese Effekte gingen bei Einsatz der nanomolaren NNK-Konzentration verloren. Es ist deshalb fraglich, ob unter realen Bedingungen bei Rauchern der NNK-Stoffwechsel durch die Tabakalkaloide beeinflusst wird.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die bei Verwendung unrealistisch hoher Konzentrationen von Fremdstoffen *in vitro* erzielten Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die tatsächliche Belastungssituation des Menschen durch Umwelt, Nahrung und Genuss von Tabakwaren zu übertragen sind.

1 Einleitung

1.1 Aufgabenstellung

Jedes Jahr sterben in Deutschland 110.000 bis 140.000 Menschen vorzeitig an tabakassoziierten Erkrankungen. Damit werden durch Tabakkonsum mehr Todesfälle verursacht, als durch Alkohol, illegale Drogen, Aids, Verkehrsunfälle, Morde und Suizide zusammen.

Im aktuellen Zeitgeschehen ist deshalb die Reduzierung des Tabakkonsums immer wieder Thema und führte zur Tabakrahenkonvention der Weltgesundheitsorganisation [1], nach der sich die unterzeichnenden Länder dazu verpflichten, eigene, sektorübergreifende nationale Strategien und Programme zur Eindämmung des Tabakkonsums umzusetzen.

In Deutschland führte dies zum Nationalen Aktionsprogramm zur Tabakprävention. Dieses beinhaltet neben präventiven Maßnahmen wie der Erhöhung der Tabaksteuer, des Heraufsetzens der Altersgrenze zum Erwerb von Tabakwaren von 16 auf 18 Jahre oder zahlreicher Rauchstopp-Kampagnen auch den Schutz vor Passivrauchbelastung. Ziel ist es, die durch den Tabakkonsum entstehenden Kosten für das Gesundheitssystem zu senken. Der Nichtraucherschutz in Deutschland war im internationalen Vergleich für lange Zeit wenig entwickelt und stößt nach wie vor auf Widerstand. Seit 2006 sind mit der Änderung des Vorläufigen Tabakgesetzes, dem Inkrafttreten des Gesetzes zum Schutz vor den Gefahren des Passivrauchens auf Bundesebene (2007) und der Verabschiedung von Gesetzen zum Nichtraucherschutz (2007) in allen Bundesländern wesentliche Änderungen erfolgt [2].

Eine weitere Strategie zur Eindämmung der durch den Tabakkonsum hervorgerufenen gesundheitlichen Schäden besteht darin, die gesundheitsschädlichen Stoffe zu minimieren [3-5]. Dafür ist jedoch ein besseres Verständnis ihrer Rolle bei den tabakassoziierten Erkrankungen von Nöten. Bisher fehlt der wissenschaftliche Beweis, dass eine Reduktion von Nicotin und/oder der tabakspezifischen Nitrosamine (TSNA) im Tabakrauch das kanzerogene Potenzial senkt. Dies zeigt sich auch bei Konsumenten von schwedischem Snus, bei denen die typischen, durch das Rauchen verursachten Erkrankungen in geringerem Ausmaß auftreten, obwohl sie ähnliche Mengen an Nicotin und TSNA aufnehmen wie Raucher [6-8].

Bisherige Ergebnisse weisen darauf hin, dass die TSNA eine metabolische Aktivierung benötigen, um die für die Kanzerogenität wichtigen DNA-Addukte zu bilden. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass sich der TSNA-Metabolismus und die zu Grunde liegende Enzymkinetik in Abhängigkeit von der Konzentration (nanomolar vs. mikromolar) verändert [9]. Daten über die Kinetik liegen bis jetzt jedoch nur für den mikromolaren Bereich vor.

Unter dem Aspekt, dass die Konzentrationen der TSNA beim Menschen *in vivo* in einem sehr niedrigen, picomolaren bis maximal nanomolaren Bereich liegen, ist es wichtig, die

mikrosomalen Systeme, sowie die einzelnen P450 Enzyme zu identifizieren, die effiziente Katalysatoren bei der Bioaktivierung unter diesen Bedingungen darstellen. Es wird angenommen, dass eine hohe Affinität der Enzyme im Zielgewebe, z. B. der Lunge, zur Anfälligkeit dieser Gewebe gegenüber der Kanzerogenität der TSNA beiträgt. Die Abwesenheit oder die Hemmung hoch affiner Enzyme in der Leber, dem Hauptort für den Cytochrom P450 (CYP)-katalysierten Metabolismus, kann insofern von Bedeutung sein, als dass dies ermöglicht, dass mehr von dem kanzerogenen Ausgangsstoff extrahepatische Zielgewebe erreicht [10].

In dieser Arbeit wird das von der Krebsgesellschaft der WHO, der International Agency for Research on Cancer (IARC), als kanzerogen für den Menschen eingestufte TSNA 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (nicotine-derived nitrosaminoketone, NNK) [11] mit kommerziell erhältlichen, charakterisierten menschlichen Lungen- und Lebermikrosomen im nanomolaren Bereich inkubiert und die Enzymkinetik mit der im mikromolaren Bereich verglichen. Anhand der charakterisierten Mikrosomen und spezifischer Inhibitoren werden zusätzlich die in diesem Konzentrationsbereich für den Metabolismus verantwortlichen Enzyme bestimmt. Auch werden die Interaktionen von Nicotin und Cotinin mit NNK genauer untersucht.

Ziel ist es, *in vitro* die Verstoffwechslung von NNK in Konzentrationen bestimmen zu können, die sich den realistischen Bedingungen beim Raucher annähern.

1.2 Tabak und Rauchen

1.2.1 Tabak und die Geschichte des Tabakkonsums

Tabakpflanzen (*Nicotiana spp.*) gehören zur Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*), die den Bedecktsamigen Pflanzen (*Magnoliophyta*) zugeordnet werden. Bei den Nachtschattengewächsen gibt es sowohl wichtige Nahrungspflanzen (*Solanum tuberosum*, *Capsicum spp.*, *Solanum lycopersicum*) als auch Zierpflanzen (*Petunia spp.*). Durch den Gehalt an Alkaloiden und Steroiden als charakteristische sekundäre Pflanzenstoffe finden sie auch als Medizin- und Rauschpflanzen Verwendung (*Atropa belladonna*, *Brugmansia spp.*).

Bis heute sind ca. 65 Tabakarten bekannt, die sich stark in ihren Formen unterscheiden. Ihnen gemein ist das vorrangig in der Wurzel gebildete und in den Blättern gespeicherte Alkaloid Nicotin. Zur Herstellung von Tabakwaren werden zwei Arten verwendet, die zahlreiche Varietäten bilden: hauptsächlich der echte oder virginische Tabak (*Nicotiana tabacum L.*), daneben in geringen Mengen der Bauerntabak (*Nicotiana rustica L.*). Der Alkaloidgehalt dieser Tabakarten liegt zwischen 0,5 und 8,0%. Für die Verarbeitung werden Sorten mit einem durchschnittlichen Alkaloidgehalt von 1,5% bevorzugt.

Nach §3, Absatz 1 des Vorläufigen Tabakgesetzes sind Tabakerzeugnisse aus Roh-tabak oder unter Verwendung von Roh-tabak hergestellte Erzeugnisse, die zum Rauchen, Kauen oder anderweitigen oralen Gebrauch oder zum Schnupfen bestimmt sind [12].

Zur Herstellung von Rauchtabak werden die Blätter nach der Ernte getrocknet. Der Roh-tabak wird anschließend durch Behandlung mit Feuchtigkeit bei höheren Temperaturen – auch unter Zusatz aromatischer Stoffe und Mineralsalze – fermentiert. Dieser Vorgang durchläuft mehrere Stufen, wobei Temperatur und Luftfeuchtigkeit vom jeweiligen Verwendungszweck abhängig sind [13].

Die Frage der Zulassung von Zusatz- und Ersatzstoffen, die Beimischung chemischer Substanzen oder der Abfälle der Tabakindustrie sowie künstlicher Umblätter für Zigarren ist ebenfalls durch das Vorläufige Tabakgesetz geregelt.

Die Verbreitung des Rauchens weist eine lange Entwicklungsgeschichte auf. Bereits vor 10.000 Jahren wurde Tabak in Nord- und Mittelamerika für kultische Zwecke verwendet. Nach der Entdeckung Amerikas im Jahr 1492 wurde die Tabakpflanze nach Europa gebracht und angebaut. Im 16. Jahrhundert führte der französische Gesandte *Jean Nicot* Tabak als Heilmittel am portugiesischen Hof ein. Nach ihm wurde die Pflanze *Nicotiana* und 1828 das Hauptalkaloid des Tabaks Nicotin benannt.

In Deutschland wurde der Tabakkonsum bereits während des 30jährigen Krieges (1618-1648) populär, zuerst in Form des Pfeiferauchens, später dann als Schnupftabak (18. Jahr-

hundert) und Zigarren (19. Jahrhundert). Seit Ende des 19. Jahrhunderts stellen Zigaretten mit der Entwicklung ihrer maschinellen Fertigung die prozentual am meisten konsumierte Form an Tabakprodukten dar. Innerhalb eines Jahrhunderts erhöhte sich der Absatz um mehr als das 20-fache. Dieser Anstieg lässt sich durch den Ersten Weltkrieg erklären, in dem Soldaten zur Unterdrückung von Müdigkeit und Hunger, sowie zur Steigerung der Kampfbereitschaft mit Zigaretten versorgt wurden. Auch die Nichtraucherpolitik der Nationalsozialisten konnte diese Entwicklung nicht bremsen, erst die Rationierung in den letzten Kriegs- und Nachkriegsjahren zeigte Wirkung.

Mit dem Wirtschaftswunder in den 1950er Jahren nahm der Konsum im westlichen Deutschland dann noch einmal stark zu. Erst seit der Wiedervereinigung 1990 sind die Zahlen erstmals wieder rückläufig (Abb. 1-1) [14]. Dieser Trend ist in allen industrialisierten Staaten zu beobachten und hängt mit dem zunehmenden Gesundheitsbewusstsein zusammen. Aufgrund des Suchtpotenzials von Nicotin setzen sich aber weiterhin viele Menschen bewusst dem Gesundheitsrisiko des Rauchens aus.

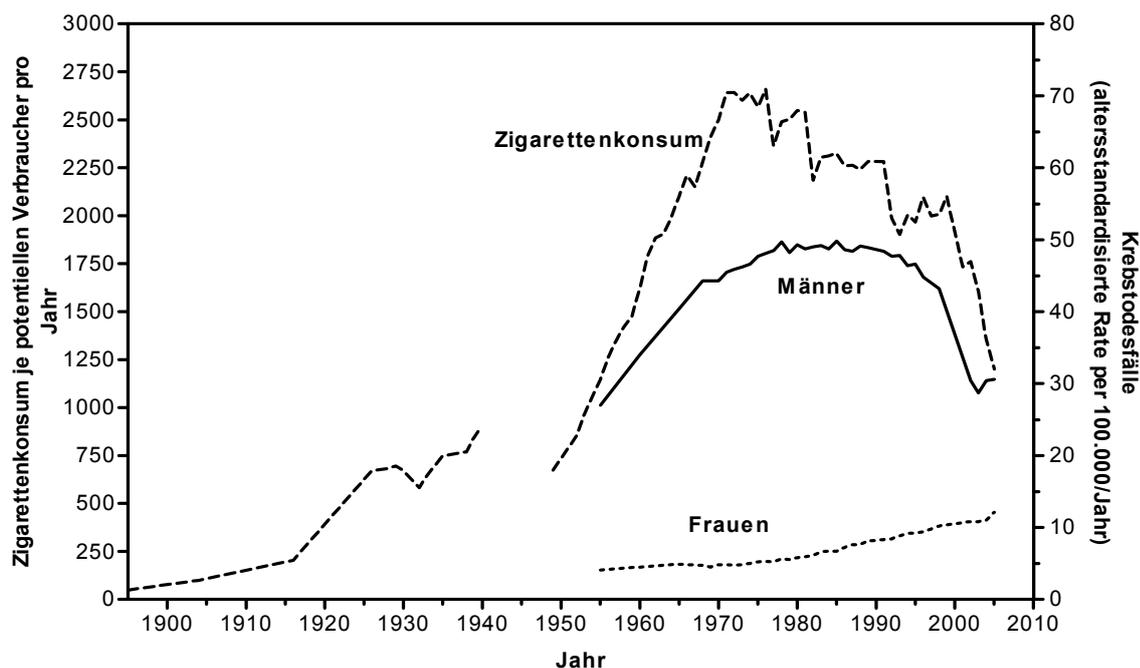


Abbildung 1-1 Entwicklung des Zigarettenkonsums (---) von Erwachsenen (>15 Jahre) von 1900 bis 2005 und die Lungenkrebsrate bei Männern (-) und Frauen (···) von 1995 bis 2005 in Deutschland [15]

1.2.2 Tabakkonsum und seine Auswirkungen auf die Gesundheit

Früh wurde eine schädigende Wirkung von Tabak vermutet und Versuche unternommen, die Ausbreitung des Konsums, z.B. durch die Erhebung einer Tabaksteuer, zu unterbinden. Bereits zu Beginn des 17. Jahrhundert sprach sich *Philaretus* in England gegen den

Tabakkonsum aus. Er wandte sich gegen die damals vorherrschende Meinung, dass Tabak eine heilende Wirkung habe und wies im Gegensatz dazu auf die gesundheitlichen Folgen des Rauchens hin [16]. In den 1930er Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen dem Konsum von Rauchtobak und Lungenkrebs vermutet und erste Versuche an Kaninchen dazu durchgeführt. Die krebserzeugende Wirkung wurde bereits damals den im Rauch enthaltenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen zugeschrieben [17]. 1939 wies der Kölner Mediziner *Müller* [18] den kausalen Zusammenhang zwischen Rauchen und Lungenkrebs durch detaillierte pathologische Fallstudien und epidemiologische Studien nach. Im gleichen Jahr wies *Lickint* [19] darauf hin, dass Tabakrauch auch Nichtraucher schädigt und prägte den Begriff des Passivrauchens. Diese Ergebnisse wurden jedoch vorerst ignoriert. Erst 1950 gab es neue Berichte aus den USA und Großbritannien über die negativen Auswirkungen des Rauchens [20,21]. Der Zusammenhang zwischen Zigarettenrauchen und Lungenkrebs wurde mehrfach bestätigt. Das National Cancer Institut der USA veröffentlichte 1991 eine Erhebung, nach der 90% der lungenkrebsbedingten Todesfälle bei Männern und 80% der Todesfälle bei Frauen durch Rauchen verursacht werden [22]. Bei Zigarettenrauchern wurde neben der Lunge auch eine erhöhte Krebsinzidenz für Kehlkopf, Mundhöhle, Speiseröhre, Magen, Pankreas, Niere und Harnblase festgestellt. Tabelle 1-1 zeigt die Todesfälle, für die diese Tumorarten 1995 in Deutschland verantwortlich waren, sowie die prozentuale Beteiligung des Zigarettenrauchens an diesen Todesfällen. Bei Frauen wird zudem eine erhöhte Rate an Zervixtumoren beobachtet. Epidemiologische Studien weisen auch auf eine erhöhte Sterblichkeit durch Krebs der Nasenschleimhäute, der Leber und durch Leukämie hin. Bei Zigarrenrauchern sind die Zahlen ähnlich, nur die Raten für Lungenkrebs, Pankreaskrebs und Blasenkrebs sind niedriger als bei Zigarettenrauchern.

Tabelle 1-1 Geschätzter Anteil der durch Rauchen verursachten Krebstodesfälle (Männer / Frauen) [15]

Organ	Krebstodesfälle in Deutschland	Prozent der durch Rauchen verursachten Fälle	Anzahl der durch Rauchen verursachten Fälle
Mundhöhle	3697 / 987	65 / 65	2400 / 600
Ösophagus	3123 / 950	30-50 / 30-50	900-1500 / 300-500
Pankreas	5132 / 6017	30-50 / 15-20	1500-2600 / 900-1200
Kehlkopf	1567 / 221	80 / 80	1300 / 200
Lunge	28887 / 8260	75-90 / 30-60	22000-26000 / 2500-4900
Harnblase	4215 / 2229	50 / 25	2100 / 600
Niere	3820 / 2792	30 / 30	1100 / 800
Magen	7887 / 7502	20-35 / 20-35	1600-2800 / 1500-2600
Gesamtzahl	58328 / 28958	50-70 / 25-40	33000-40000 / 7400-11000

Die größte Anzahl vorzeitiger Todesfälle durch das Rauchen beruht jedoch auf dem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, welches durch weitere Risikofaktoren wie einem erhöhten Cholesterinspiegel und hohem Blutdruck zusätzlich begünstigt wird. Auch chronische Bronchitis und Emphyse treten bei Rauchern weit häufiger auf als bei Nichtrauchern. Bei starken Rauchern liegt das Risiko für eine chronische Erkrankung der Atemwege 20- bis 30-fach über dem des Nichtrauchers.

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen der Passivrauchbelastung des Menschen und einem erhöhten Lungenkrebsrisiko untersucht. Die meisten dieser Studien ergaben zwar eine höhere Wahrscheinlichkeit für exponierte Nichtraucher an Lungenkrebs zu erkranken, aber nur wenige Studien wiesen eine statistische Signifikanz auf. In einer zusammenfassenden Würdigung aller Daten kam die IARC zu dem Schluss, dass das Passivrauchen das Krebsrisiko eindeutig erhöht [23]. Auch andere Erkrankungen der Luftwege wie COPD und Asthma sowie Herz-Kreislauserkrankungen werden durch das Passivrauchen negativ beeinflusst [23-26].

1.2.3 Zusammensetzung des Tabakrauchs

Der Rauch von Zigaretten, Zigarren und Pfeifentabak wird unterteilt in Hauptstromrauch (HS) und Nebenstromrauch (NS). Der Hauptstromrauch entsteht in der Glimmzone durch Verbrennung während des Ziehens bei 850-950 °C unter Einwirkung großer Mengen Sauerstoff und wird vom Raucher zum größten Teil inhaliert. Der Nebenstromrauch ist der Rauch, der sich während der Zugpausen bei 500-650 °C unter Sauerstoffarmut bildet und der sowohl vom Raucher, als auch von Personen in seinem Umfeld eingeatmet wird (Abb. 1-2).

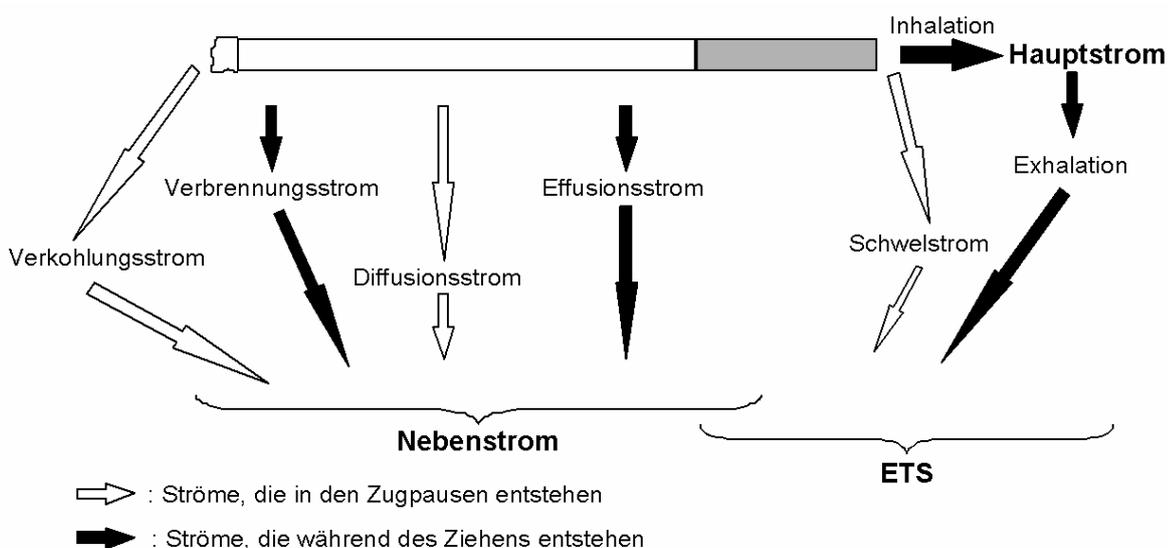


Abbildung 1-2

Rauchströme beim Rauchen einer Zigarette [27]

Aufgrund der verschiedenen Bedingungen während der Verbrennung unterscheidet sich die Zusammensetzung von HS und NS. Sowohl HS als auch NS bestehen aus einer gasförmigen Phase, die flüchtige Substanzen wie Benzol, Vinylchlorid, Acrolein etc. enthält und der Partikelphase, dem Kondensat („Teer“), in der sich die halb- und nichtflüchtigen Stoffe wie Tabakalkaloide (Nicotin und dessen Derivate), aromatische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) befinden.

Tabakrauch enthält schätzungsweise bis zu 12000 chemische Verbindungen von denen bisher in der Gasphase mehr als 500 und in der Partikelphase über 4000 isoliert und identifiziert werden konnten [28-30]. Viele dieser Stoffe sind organspezifische Kanzerogene, Co-Kanzerogene, Tumorpromotoren, aber auch –inhibitoren [15,31].

Im Tabakrauch sind über 80 Substanzen enthalten, die nachgewiesen eine kanzerogene Wirkung haben. Dazu gehören Formaldehyd, PAK, aromatische Amine und TSNA [3,30,32], wobei das größte kanzerogene Potenzial den PAK und TSNA zugeschrieben wird [33].

In Tabelle 1-2 werden die Verteilung einiger kanzerogener Inhaltsstoffe zwischen Haupt- und Nebenstromrauch und die aus der Arbeitsmedizin und Epidemiologie bekannten Zielorgane beim Menschen und die im Tierversuch ermittelten Krebsarten zusammengefasst.

Tabelle 1-2 Kanzerogene im Haupt- und Nebenstromrauch

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

¹Nachweis im Tierversuch (*kursiv*: humankanzerogen)

Im Nebenstromrauch sind aufgrund der unvollständigen Verbrennung einige Kanzerogene in bis zu 130-fach höherer Konzentration enthalten als im Hauptstromrauch. Relevant ist dies für den environmental tobacco smoke (ETS), den Tabakrauch in der Umgebungsluft. Dieser setzt sich zu etwa 85% aus NS und zu 15% aus exhalierendem HS zusammen und belastet somit neben dem Raucher auch den Passivraucher. Trotz der erhöhten Konzentration an Kanzerogenen ist die Aufnahme dieser Stoffe jedoch wegen der Verdünnung mit der

Umgebungsluft und durch Alterungsprozesse deutlich geringer als beim Raucher selbst. Der gealterte ETS weist eine veränderte Zusammensetzung der Gas- und Partikelphase auf: Mittel- und schwerflüchtigen Substanzen adsorbieren an Oberflächen und radikalische Verbindungen reagieren ab, so dass die Zytotoxizität des NS rasch abnimmt. Eine Beurteilung des tatsächlichen Gefährdungspotentials des ETS ist daher schwierig und wird kontrovers geführt [34,35].

1.3 Nitrosamine und Gesundheit

1.3.1 Gefahrenpotenzial der Nitrosamine

Die Substanzklasse der Nitrosamine hat einen außergewöhnlich hohen Anteil an kanzerogenen Verbindungen. Nitrosamine gehören mit den Nitrosamiden zur Stoffklasse der *N*-Nitrosoverbindungen, deren gemeinsames chemisches Strukturmerkmal eine an ein Stickstoffatom gebundene Nitrosogruppe ist.

Nitrosamine entstehen bevorzugt im sauren Milieu aus sekundären Aminen und salpetriger Säure. Primäre und sekundäre Amine können auch in neutraler und alkalischer Lösung von Stickoxiden nitrosiert werden, unabhängig von der Basizität des Amins [36]. Die Bildung von Nitrosaminen aus tertiären Aminen erfordert die vorangehende Spaltung einer Stickstoff-Kohlenstoff-Bindung, weshalb diese Reaktion wesentlich langsamer verläuft. Als reaktives Agens fungiert nicht das Nitrit, vielmehr erfolgt die Nitrosierung durch das Nitrosylierung oder das Nitrosylhalogenid (Abb. 1-3).

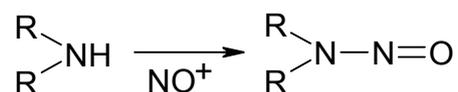


Abbildung 1-3 Prinzip der Nitrosierung

Durch das pH-Milieu des Reaktionsmediums lässt sich der Anteil des Nitrosierungsagens und somit die Ausbeute an Nitrosaminen steigern. Das pH-Optimum liegt im Bereich von 3,0 bis 3,5, pH-Werte unterhalb dieses Bereiches führen zu einer Protonierung des Stickstoffes des sekundären Amins zum Iminiumion, was die Reaktion mit nitrosierenden Substanzen erschwert, pH-Werte über 5 verhindern weitestgehend die säurekatalysierte Nitrosierung.

Seit der Entdeckung der Leberkrebs erzeugenden Wirkung von NDMA in Ratten durch *Magee* und *Barnes* [37] wurde in den 50er Jahren in zahlreichen Tierversuchen belegt, dass 90% der bisher über 300 untersuchten Nitrosamine kanzerogen sind. Sie erzeugen Krebs in sehr vielen Organen und Geweben mit teilweise hoher Organspezifität, etwa bei Ratten *N*-Nitrosomethylbenzylamin selektiv im Ösophagus, *N*-Nitrosodibutylamin überwiegend in der Harnblase und NNK in der Lunge [36,38-40].

Die Untersuchung besonders starker Kanzerogene, wie NDMA, an einer Vielzahl von Tierarten, einschließlich subhumaner Primaten, ergab, dass keine der untersuchten Spezies eine Resistenz gegenüber der kanzerogenen Wirkung dieser Substanzklasse zeigte [36]. Es ist deshalb davon auszugehen, dass der Mensch in dieser Hinsicht keine Ausnahme darstellt und ebenfalls von der kanzerogenen Wirkung betroffen ist.

Dies hat zur Folge, dass jede noch nicht geprüfte *N*-Nitrosoverbindung bis zum gegenteiligen Beweis als potenzielles Kanzerogen betrachtet werden muss. Ausnahmen sollten nur gemacht werden, wenn strukturelle Kriterien eindeutig dagegen sprechen.

Im heute allgemein anerkannten Mehrstufenkonzept der chemischen Kanzerogenese (Abb. 1-4) spielen Nitrosamine eine entscheidende Rolle bei der Initiation. Sie sind wie die Mehrheit der Kanzerogene so genannte Präkanzerogene, die einer metabolischen Aktivierung bedürfen, um ihr tumor erzeugendes Potenzial entfalten zu können [39]. Aus den proximalen Kanzerogenen entstehen ultimale Kanzerogene, die kovalent an DNA, RNA, Proteine und andere Zellbestandteile binden. Dies kann zu bleibenden Veränderungen an der DNA führen, auch wenn das Kanzerogen nur kurzfristig wirksam war.

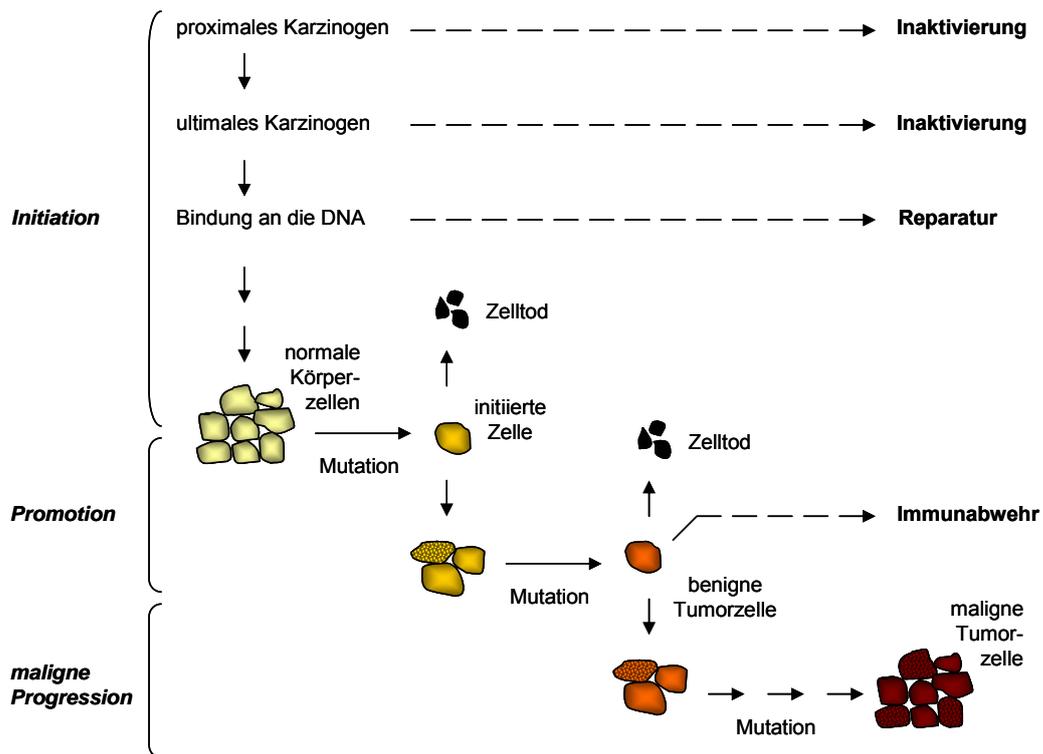


Abbildung 1-4 Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese

Entgeht die Veränderung der zelleigenen Reparatur, überträgt sie sich auf die Tochterzelle und der DNA-Schaden wird weitervererbt. Die Auswirkung des Kanzerogens auf die Effizienz der malignen Transformation kann durch die Promotion unterstützt oder verstärkt

werden. Promotoren wirken proliferationssteigernd und erhöhen so die Wahrscheinlichkeit für das Ablesen des geschädigten DNA-Teils. Im Unterschied zu den Kanzerogenen müssen Promotoren jedoch meist eine Wirkschwelle überschreiten, eine einmalige Exposition reicht in der Regel nicht aus. Die transformierte Zelle (Tumorzelle) stellt den Ausgangspunkt der nach einer unterschiedlich langen Latenzzeit einsetzenden klonalen Expansion dar. Die in der Folge auftretenden mikroskopisch kleinen Tumorherde durchlaufen dann das Stadium der Progression und schließlich der Invasion und Metastasierung.

Dieses Schema ist jedoch stark vereinfacht. So führen starke Kanzerogene wie NDMA, NNK, bestimmte PAK und aromatische Amine auch ohne Promotoren direkt zu Tumoren, wobei bereits eine einzige Dosis ausreichend sein kann. Andererseits sind die Möglichkeiten der Initiation vielfältig und ihre Ursachen oft noch unbekannt, so dass unter den Bedingungen einer stark promovierenden Behandlung bzw. bei chronischen Entzündungen Tumoren entstehen, ohne dass eine bewusste Initiation stattgefunden hat. In diesem Fall spricht man von der epigenetischen Kanzerogenese.

Um ihr kanzerogenes Potenzial entfalten zu können, müssen die Nitrosamine metabolisch aktiviert werden. Dies erfolgt meist über eine durch Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) vermittelte Hydroxylierung der Kohlenstoffatome in der Nachbarschaft zur *N*-Nitrosogruppe, die allgemein α -Hydroxylierung genannt wird. Es entstehen als Zwischenprodukte chemisch instabile α -Hydroxynitrosamine, die unter Aldehydabspaltung und Protonenwanderung zu Diazohydroxiden reagieren. Diese gelten als äußerst reaktionsfreudig und können entweder durch Hydrolyse Alkohole bilden oder sie zerfallen sehr schnell in Wasser, Stickstoff und ein Carbeniumion, welches das ultimale Kanzerogen darstellt und DNA, RNA und Proteine alkyliert.

Die Prävalenz der α -Hydroxylierung für die metabolische Aktivierung und die daraus resultierende kanzerogene Wirkung wird besonders deutlich, wenn man Nitrosamine mit einem sterisch gehinderten α -C-Atom betrachtet. Während eine Methyl-Substitution in α -C-Position bereits eine verringerte Kanzerogenität bewirkt, ist die sterische Hinderung durch eine tertiäre Butylgruppe wie bei *N*-Nitroso-*N*-methyl-*tert*-butylamin so stark, dass keine Aktivierung mehr stattfinden kann und das Nitrosamin nicht mehr kanzerogen ist [36].

Deutliche Unterschiede in der metabolischen Aktivierung der einzelnen Nitrosamine bestehen bezüglich der beteiligten Cytochrom P450 Isoenzyme. Häufig existiert für ein bestimmtes Nitrosamin ein Isoenzym mit besonders hoher Affinität und einige mit wesentlich geringerer Wirkung [41]. Die gewebespezifische Aktivität der CYP-Isoenzyme kann zum Teil die unterschiedliche Organspezifität der Nitrosamine bei der Tumorbildung erklären, die unabhängig vom Ort der Applikation auftreten [42].

Die akute Toxizität der Nitrosamine variiert stark und korreliert nicht mit der kanzerogenen Potenz [36]. Mit einem LD₅₀-Wert von 18 mg/kg KG ist *N*-Nitroso-*N*-methylbenzylamin für die Ratte das am stärksten toxische Nitrosamin. Im Gegensatz dazu übersteigt die LD₅₀ für das starke Leberkarzinogen *N*-Nitrosodiethylamin einen Wert von 7500 mg/kg KG.

1.3.2 Endogene und exogene Nitrosaminbelastung

Die endogene Nitrosaminbelastung erfolgt hauptsächlich durch Nitrosierung von Aminen in Gegenwart von Nitrat bzw. Nitrit oder Stickoxiden im sauren Milieu des Magens. Man geht grundsätzlich davon aus, dass im Organismus aus Aminen dieselben Nitrosamine entstehen, wie sie *in vitro* durch klassische Nitrosierungsmechanismen dargestellt werden können. Bei einem nüchternen Menschen liegt die durchschnittliche Nitritkonzentration im Magensaft bei pH-Werten unter 5 im Bereich von 0,1-2,6 µM und erreicht bei pH-Werten größer 5 Konzentrationen von 26 bis 54 µM [43]. Der größte Anteil des Nitrits im Magen wird in Form von Nitrat über die Nahrung aufgenommen, vom Gastrointestinaltrakt resorbiert und zu 25% in den Speichel abgegeben [35,44,45]. Bakterien reduzieren in der Mundhöhle etwa 20% des Nitrats zu Nitrit, welches mit dem Speichel abgeschluckt wird. Bei einem gesunden Organismus baut aktiv sezernierte Ascorbinsäure über Redoxreaktionen das Nitrit im Magen ab [46,47]. Verschiedene Bakterienstämme wie z.B. *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella* und *Pseudomonas* können ebenfalls die Nitrosierung von sekundären Aminen katalysieren [48-51]. Hohe pH-Werte im Magen bieten ideale Wachstumsbedingungen für Darmbakterien wie *Escherichia coli* und *Proteus*, welche in der Lage sind, große Mengen Nitrat zu Nitrit zu reduzieren und somit enzymatisch die Synthese von Nitrosaminen zu katalysieren. Diese bakterienvermittelten Nitrosierungsreaktionen können bei Blasen- und Harnwegsinfektionen und bei mangelhafter Mundhygiene im oberen Verdauungstrakt eine bedeutsame Nitrosaminexposition zur Folge haben [52]. Auch Entzündungsprozesse fördern die endogene Bildung von Nitrosaminen. Als Reaktion auf die Immunstimulation durch Makrophagen und Neutrophile bilden Entzündungszellen in Organen mit chronischen Infektionen oder Entzündungen Stickoxide. NO wird bei der Sauerstoff- und NADPH-abhängigen Oxidation des endständigen Guanidino-Stickstoffs des L-Arginins zu Citrullin durch das Enzym NO-Synthetase gebildet und dient dem Organismus als Vasodilatator in Arteriolen und als Neurotransmitter. Da es jedoch im Überschuss produziert wird, reagiert der größte Teil mit dem im Blut gelösten Sauerstoff zu den potenten Nitrosierungsagenzien N₂O₃ und N₂O₄ ab [42,53].

Eine zusätzliche, exogene Exposition durch Nitrosamine erfolgt für den Menschen durch Nahrungs- und Genussmitteln, am Arbeitsplatz und in der Umwelt oft unbewusst und unfreiwillig.

In Nahrungsmitteln sind sowohl flüchtige, als auch nichtflüchtige Nitrosamine enthalten [36]. Unter den flüchtigen Substanzen hat das *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA) den größten Anteil und besitzt zudem das stärkste kanzerogene Potenzial. Von Bedeutung sind ferner *N*-Nitrosopiperidin und *N*-Nitrosopyrrolidin [54,55]. Flüchtige Nitrosamine können sowohl durch Nitrosierung der zugehörigen Amine, aber auch bei der Erwärmung der Nahrungsmittel beim Kochen und Braten, durch Decarboxylierung nichtflüchtiger Nitrosamine entstehen [56]. Die wichtigsten Vertreter der nichtflüchtigen, teils wenig bis nicht kanzerogenen Nitrosamine sind *N*-Nitrososarcosin, *N*-Nitrosoprolin und *N*-Nitrosothiazolidincarbonsäure. Sie stellen den größten Anteil unter den Nitrosaminen in Lebensmitteln dar [57]. Mit der Nahrung nimmt der Mensch zwischen 0,1 und 1 µg an Nitrosaminen pro Person und Tag auf. In geräucherten Nahrungsmitteln, gepökeltem Fleisch, getrocknetem Fisch und einigen Meeressfrüchten können besonders hohe Gehalte nachgewiesen werden. Um die Belastung des Menschen mit Nitrosaminen aus Lebensmitteln zu verringern, wird der Zusatz von Nitrat und Nitrit zu Fleischwaren durch die Zusatzstoffzulassungsverordnung (Anlage 5 zu §5 Abs. 1 und §7) und die erlaubte Höchstmenge an Nitrat als Rückstand in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs (VO (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln) gesetzlich geregelt [58,59]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, zu gepökelten Fleischwaren Hemmstoffe (Ascorbinsäure, Tocopherole) der Nitrosaminbildung zuzusetzen [60].

In den 1970er Jahren war es zudem üblich, bei der Herstellung von Kosmetika Vorstufen von NDMA, *N*-Nitrosomorpholin und langkettige *N*-Nitroso-*N*-methylalkylamine einzusetzen [61,62]. Durch Veränderung der Rezepturen und Beimischung von Antioxidantien und Komplexbildnern für Iminiumionen, gelang es die Nitrosaminbelastung durch Kosmetikprodukte seit Anfang der 1990er Jahre stark zu reduzieren [63]. Auch Arzneimittel können seit den 1980er Jahren als Quelle einer exogenen Nitrosaminbelastung weitestgehend ausgeschlossen werden [64].

Eine weit erheblichere Expositionsquelle für den Menschen stellt der Arbeitsplatz dar. Die relativ hohe Belastung durch meist leichtflüchtige Nitrosamine konnte in den vergangenen 30 Jahren durch Optimierung der Produktionsvorgänge und Einsatz alternativer Substanzen maßgeblich gesenkt werden. Die Einführung von MAK-Werten (maximale Arbeitsplatzkonzentration) und im Falle von Kanzerogenen von TRK-Werten (technische Richtkonzentration) mit den damit verbundenen Kontrollen zur Einhaltung dieser Werte, brachte zusätzlich eine Entschärfung des gesundheitlichen Risikos im beruflichen Umfeld.

Neben der unfreiwilligen Exposition durch Ernährung und Beruf ist der Konsum von Tabakwaren eine weitere bedeutende Quelle für die exogene Nitrosaminbelastung des Menschen, der sich viele bewusst aussetzen. Zigarettenrauch enthält drei verschiedene Arten

von *N*-Nitrosoverbindungen: flüchtige Nitrosamine, z.B. NDMA und *N*-Nitrosopyrrolidin, schwerflüchtige Nitrosamine, z.B. Nitrosodiethanolamin, und TSNA.

Im Hauptstromrauch gängiger Zigarettenmarken sind von den TSNA 19-135 ng *N'*-Nitrosornicotin (NNN), 21-110 ng NNK und 18-155 ng *N'*-Nitrosoanatabin (NAT) und *N'*-Nitrosoanabasin (NAB) enthalten. Während die flüchtigen Nitrosamine in der Gasphase enthalten sind, sind die TSNA hauptsächlich an Rauchpartikel gebunden. Davon ausgehend, dass ein Raucher mit einem Rauchkonsum von 20 Zigaretten am Tag durch die Inhalation des Rauches etwa 70% der gebundenen TSNA aufnimmt, ist er einer Belastung von etwa 3,0 µg/d TSNA und 0,4 µg/d flüchtiger Nitrosamine ausgesetzt [29,30,57].

1.3.3 Entstehung der TSNA

Die TSNA entstehen durch Nitrosierung der Tabakalkaloide Nicotin, Nornicotin, Anatabin und Anabasin. Bisher konnten sieben TSNA im Tabak bzw. Tabakrauch identifiziert werden: NNN, NNK, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (nicotine-derived nitrosamino alcohol, NNAL), NAT, NAB, 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol (*iso*-NNAL) und 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure (*iso*-NNAC). In den noch grünen, jungen Blättern der Tabakpflanzen können TSNA nur in Spuren nachgewiesen werden, ihre Bildung hängt stark von Anbau, Tabaksorte und Reifung ab. Der größte Teil entsteht während der Trocknung und Fermentierung des Tabaks, sowie bei der Alterung der Pflanze [65,66].

Die TSNA NNN, NAB und NAT entstehen durch Nitrosierung der Tabakalkaloide Nornicotin, Anabasin und Anatabin, welche zur Gruppe der sekundären Amine gehören. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass auch die Nitrosierung des tertiären Amins Nicotin Anteil an der Bildung von NNN hat [67]. *Mirvish et al.* [68] geben Nicotin als Hauptquelle des NNN an, die Nitrosierung von Nicotin-1'-*N*-Oxid zu NNN erfolgt in kleinerem Ausmaß [69]. Trotz der jahrzehntelangen Forschung auf dem Gebiet der TSNA wurde Myosmin, ein weiteres Tabakalkaloid, das außer in Tabak auch in Nahrungsmitteln wie Getreide, Milch, Obst, Nüsse und weiteren ubiquitär vorkommt [70,71], nicht als NNN-Quelle erkannt. Erst mit dem Nachweis, dass Myosmin ebenso wie Nornicotin leicht zu NNN nitrosiert werden kann [72], erweiterte sich das Spektrum der Nitrosierungsvorstufen auch auf ein Alkaloid, das nicht nur im Tabak vorkommt.

Den Hauptbildungsweg von NNK stellt vermutlich der mikrobielle Abbau von Nicotin-1'-*N*-Oxid zu Pseudooxynicotin dar, welches schnell und irreversibel zu NNK nitrosiert wird [73]. Durch enzymatische Reduktion der Ketogruppe entsteht aus NNK ein weiteres Nitrosamin, das NNAL, welches vereinzelt im Tabak nachgewiesen wurde. Dagegen wurde NNAC als bisher einziges TSNA nicht im Tabak oder Tabakrauch identifiziert. Aufgrund der hohen Re-

aktivität der Aldehydgruppe wird eine schnelle Weiterreaktion zu *iso*-NNAC oder *iso*-NNAL angenommen (Abb. 1-5) [74]. Der Gehalt an Nitrosaminen ist zum einen von der Alkaloid- und Nitratkonzentration in den Tabakblättern abhängig, zum anderen wird er von den Prozessbedingungen der verschiedenen Herstellungsstufen beeinflusst [15,75,76]. Der Nicotingehalt in Tabakblättern beträgt im Durchschnitt 1-8%, in wenigen Fällen bis zu 15%. Der Anteil an Nitrosaminen im Tabak ist um das 3.000-300.000-fache kleiner. Besonders hohe Nitrosamingehalte finden sich im Schnupftabak, da sich die höheren Temperaturen während der Fermentierung günstig auf deren Bildung auswirken (Tab. 1-3) [77].

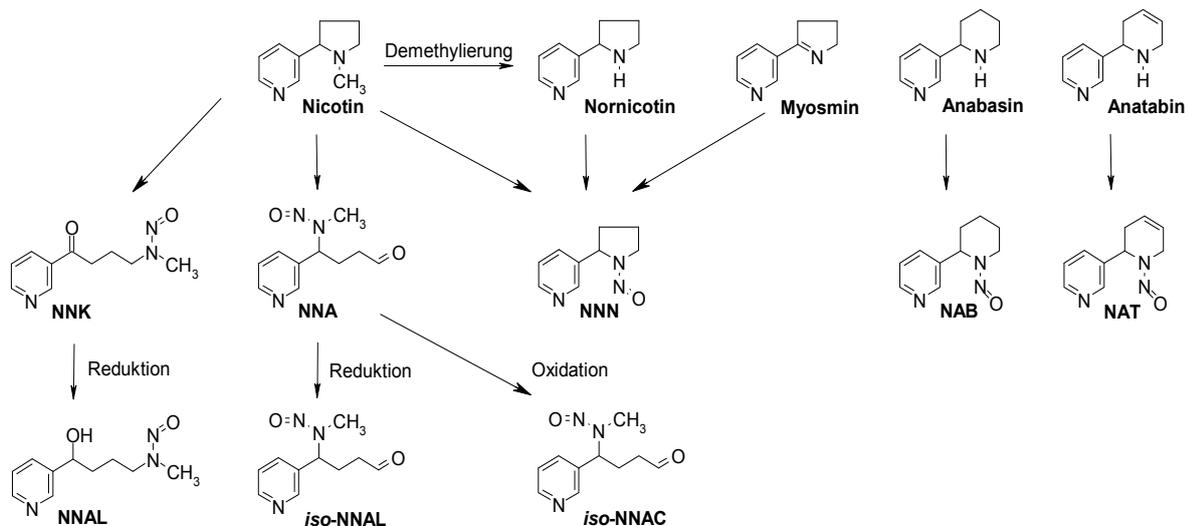


Abbildung 1-5 Bildung der TSNA (nach Hoffmann et al. [74] ergänzt durch Zwickenpflug [72])

Tabelle 1-3 TSNA-Konzentrationen [ppm] in Tabakprodukten der USA und UK [77,78]

Tabakprodukt	NNN	NNK	NAT und NAB
Schnupftabak (feucht)	3,1-135	0,1-13,6	0,64-339
Kautabak	0,6-8,2	0,38	2,4
Zigaretten	0,6-7,9	0,1-1,3	0,5-5,8
Zigarren	3,0-10,7	1,1-3,5	2,5-33
Pfeifentabak (UK)	3,0	0,6	20,5

Die Annahme, dass durch Pyrolyse, also der Verbrennung des Tabaks beim Rauchen, TSNA entstehen [79,80], konnte hingegen größtenteils widerlegt werden [81]. Der überwiegende Teil der TSNA im Hauptstromrauch ist bereits im Tabak vorhanden. In Tabelle 1-4 sind die Konzentrationen der wichtigsten TSNA und weiterer gesundheitsschädlicher Stoffe im Hauptstromrauch der 1995 in den USA am meisten verkauften Filterzigaretten und die der filterlosen Zigaretten gegenübergestellt.

Tabelle 1-4 Gehalt an gesundheitsschädlichen Stoffen im Hauptstromrauch von Filterzigaretten unterschiedlichen Teergehalts und filterlosen Zigaretten (modifiziert nach [82])

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

¹ Die Einteilung erfolgte nach dem Gehalt an Teer: FF= full flavour; FFLT=full flavour low tar; ULT=ultra low tar

² Angaben für FF-Zigaretten aus dem IARC Monograph Vol. 38 [31]

1.3.4 Kanzerogene und mutagene Wirkung der TSNA

Die TSNA NNN, NNK und NNAL wirken systemisch, also in vom Applikationsort entfernten Organen [40,83]. Man kann hinsichtlich der Tumorbildung eine klare Organspezifität feststellen. Während die Lunge in allen Spezies das wichtigste Zielorgan von NNK und NNAL ist, induziert NNN nur bei Mäusen Lungenkrebs [40]. Dagegen werden die nach NNN-Gabe bei Ratten hauptsächlich beobachteten Ösophagustumoren von NNK nicht ausgelöst [84,85].

Wie schon in Kapitel 1.2.1 erwähnt sind die TSNA Präkanzerogene, die einer metabolischen Aktivierung bedürfen, um ihr tumorerzeugendes Potenzial entfalten zu können [39]. Die Voraussetzungen für den Metabolismus werden im Kapitel 1.3 genauer besprochen. Die Rolle des Metabolismus im Zusammenhang mit der Organotropie wird bereits an dieser Stelle näher erläutert. Außerdem gibt es Hinweise, dass die TSNA auch durch hochspezifische Bindung an Rezeptoren die Tumorentwicklung fördern können [86]. Der mit sehr hohen NNK-Dosen beobachtete vermehrte oxidative Stress mit Auftreten von 8-Hydroxydesoxyguanosin [87] sowie einer Zunahme von Einzelstrangbrüchen der DNA [88] dürfte unter realistischen Bedingungen in vivo keine Rolle spielen.

Die relative Häufigkeit der durch NNN induzierten Ösophagus- und Nasenraumtumoren hängt von der Applikationsart ab. So wurden in Studien mit F344-Ratten, welche NNN über das Trinkwasser erhielten, zu etwa gleichen Teilen Ösophagus- und Nasentumoren diagnostiziert [89]. Die subkutane Injektion von NNN bei Ratten verursachte überwiegend Nasenraumtumoren und nur in geringem Maß Tumoren im Ösophagus [90,91]. Nach NNN-Gabe per Schlundsonde verabreicht, entwickeln Ratten ebenfalls hauptsächlich Tumoren im Nasenraum, ähnlich wie bei der subkutanen Applikation [92]. Sowohl die Nasenschleimhaut, als auch der Ösophagus sind in der Lage, NNN metabolisch zu aktivieren, DNA-Addukte

konnten in beiden Geweben festgestellt werden. Autoradiographische Studien belegen, dass nach intravenöser Applikation NNN in beiden Geweben gebunden vorliegt, wobei die Konzentration in der Nasenschleimhaut gegenüber dem Ösophagusgewebe deutlich höher liegt [93,94]. Möglicherweise führt der direkte Kontakt mit dem Kanzerogen über das Trinkwasser dazu, dass der Ösophagus als Zielorgan besser erreicht wird, als durch subkutane oder intragastrale Applikation. Während sich NNN beim Hamster als relativ schwach wirksames Kanzerogen zeigte, erzeugte es bei Nerzen mit hoher Inzidenz Tumoren in der Nase und dem basalen Vorderhirn.

NNK erzeugt bei allen untersuchten Nagern (Ratten, Mäuse, Hamster) Lungenkrebs. Bei der A/J-Maus entwickeln sich praktisch nur Lungentumoren. Bei der F344-Ratte ergeben sich ebenfalls immer Lungentumoren, aber in kleinerem Ausmaß auch Leber- und Nasenhöhliertumoren, nach Gabe über das Trinkwasser, auch Pankreastumoren. Beim syrischen Goldhamster entwickeln sich neben Lungentumoren auch diverse Tumore im oberen Respirationstrakt. Bemerkenswerterweise erzeugen orale NNK-Gaben über das Trinkwasser bei Hamstern keinerlei Tumore [95]. Eine mögliche Erklärung dafür ist der hohe first-pass Metabolismus im Darm [96] durch den fast das gesamte oral aufgenommene NNK metabolisiert wird, ohne die Zielorgane Leber, Lunge und Pankreas zu erreichen. Für Nerze ist NNK ebenfalls ein starkes Kanzerogen, es erzeugt bei dieser Tierart allerdings spezifisch Nasenraumtumoren [97].

NNAL ist weit weniger aktiv als NNK [98,99]. Dies gilt vor allem für die Erzeugung von Lungentumoren bei der A/J-Maus [100]. Bei Ratten erzeugt NNAL keine Nasenraum- und weniger Lebertumoren. Für die Bauchspeicheldrüse scheint es dagegen ein stärkeres Kanzerogen zu sein als NNK [101]. So lässt sich auch erklären, dass NNK nur nach oraler und nicht nach subkutaner Gabe Pankreastumoren erzeugt. Während bei subkutaner Gabe das NNK über den venösen Kreislauf direkt das Zielorgan Lunge erreicht, wird es nach oraler Gabe in Dünndarm und Leber unter anderem sehr effektiv zu NNAL verstoffwechselt. Die α -Hydroxylierung von NNAL ist in der Lunge aber deutlich geringer als jene von NNK [102]. NNAL und seine Glucuronide können die Bauchspeicheldrüse nicht nur direkt über den Blutweg, sondern auch retrograd über die Galle erreichen [103]. Versuche mit verschiedenen, deuterierten NNAL-Derivaten zeigten, dass NNAL weitgehend durch die direkte, im Vergleich zu NNK in geringeren Umsatzraten erfolgende, α -Hydroxylierung biologisch aktiv ist und nicht erst durch die *in vivo* beobachtete Rückoxidation zu NNK sein volles biologisches Potenzial erreicht [104,105]. Orale NNAL-Gaben über das Trinkwasser erzeugen wie NNK bei Hamstern keinerlei Tumoren [106].

Die Mutagenität der TSNA wurde in zahlreichen Versuchen bestätigt. *In vitro* wurde der Ames-Test an verschiedenen Stämmen des Bakteriums *Salmonella typhimurium* mit oder

ohne enzyminduzierter metabolischer Aktivierung durchgeführt. In Abhängigkeit des verwendeten Stammes, der Konzentration des TSNA sowie des fakultativen Zusatzes eines exogenen metabolischen Systems erwiesen sich NNK, NNAL und NNN als mutagen [107-116]. Der an *Vibrio fischeri* durchgeführte Mutatox-Test, sowie der an verschiedenen Zelllinien durchgeführte HPRT-Genmutationstest ergab für NNK und NNN ebenfalls eine, von den Versuchsbedingungen abhängige mutagene Wirkung [109,117]. NNK entspricht dabei in seiner mutagenen Wirksamkeit dem NDMA [107,115]. Beim DNA-Repair-Test mit Rattenleberzellen war NNK aktiver als NNN und zeigte sich ebenfalls vergleichbar mit NDMA [66,118-120]. Für NNK und NNN wurden zudem versuchsabhängig DNA-Strangbrüche, Schwesterchromatidaustausch, sowie die Bildung von Mikronuklei nachgewiesen [88,108,121-129]. *In vivo* zeigte sich je nach Versuchsbedingung ebenfalls eine mutagene Wirkung von NNK und NNN in Form von Chromosomenaberrationen, DNA-Strangbrüchen, Schwesterchromatidaustausch und der Bildung von Mikronuklei [108,110,122,130,131].

1.4 Toxikokinetik

Als Toxikokinetik wird das Teilgebiet der Toxikologie bezeichnet, welches sich mit der zeitlichen Änderung der Konzentration von Xenobiotika im Organismus befasst. Unter Xenobiotika werden fremde Substanzen verstanden, die in den Körper gelangen, dort aber für gewöhnlich nicht vorhanden sind und keine physiologische Rolle spielen, oder die nach Aufnahme von einer externen Quelle physiologisch gesehen in viel zu hohen Konzentrationen im Körper vorliegen.

Die Wirkung eines Fremdstoffes ist dabei abhängig von der Konzentration des freien, unveränderten Wirkstoffs und/oder aktiver Metaboliten am Wirkort. Die für die zeitlichen Änderungen dieser Konzentrationen am Ort der Wirkung verantwortlichen Vorgänge werden unter der Abkürzung LADME zusammengefasst:

Liberation – Freisetzung

Absorption – Aufnahme in die Blutbahn

Distribution – Verteilung im Organismus

Metabolismus – Verstoffwechslung

Exkretion – Ausscheidung (biliär, renal, pulmonal)

Der Aufnahme, Verteilung (und gegebenenfalls Speicherung) und Ausscheidung liegen dabei schwache, reversible Interaktionen wie Membranpermeation, reversible Bindung an Makromoleküle und Transporter, sowie die Akkumulation im Fettgewebe und in Organellen zu Grunde. Bei der Verstoffwechslung hingegen kommt es zu Redoxreaktionen, Hydratisierung und Konjugation. Dabei können auch reaktive Metaboliten entstehen, die eine kovalente Bindung mit Proteinen, Nukleinsäuren oder Membranlipide eingehen können [132-134].

1.4.1 Der Fremdstoffmetabolismus

1.4.1.1 Schema des Fremdstoffmetabolismus

Xenobiotika mit lipophilen Eigenschaften können sich im Organismus anreichern. Um ihre Ausscheidung zu fördern müssen sie so verändert werden, dass sie eine höhere Wasserlöslichkeit erreichen. Bei allen Tiergruppen, unabhängig von ihrer Organisationsstufe und ihrem bevorzugten Lebensraum, haben sich in der Evolution Enzymsysteme entwickelt, die eine „Polarisierung“ von Fremdstoffen, aber auch endogener Stoffe bewirken und damit ihre Ausscheidung erleichtern. Substanzen, die nicht metabolisiert werden und eine hohe Lipophilie besitzen, können extrem lange im Organismus persistieren. Beispiele hierfür sind das Sevesogift 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin und halogenierte Pestizide wie Hexachlorbenzol und Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) mit seinen Metaboliten, die zu einer extremen Anreicherung und Speicherung im Fettgewebe führen.

Die Umwandlung lipophiler Fremdstoffe zu hydrophileren Metaboliten ist daher essentiell für die Entgiftung. Man bezeichnet diesen Vorgang als Biotransformation und gliedert ihn in zwei Phasen (Abb. 1-6):

Phase I, die Funktionalisierung: Hierunter versteht man Oxidation, Reduktion, Hydrolyse oder Hydratisierung lipophiler Substanzen. Diese Reaktionen dienen der Einführung oder Freilegung funktioneller Gruppen wie -OH, -SH, -NH₂ und -COOH, welche dann die Angriffspunkte für die Phase II-Enzyme darstellen. Die eingeführten funktionellen Gruppen führen entweder zu einer hohen Elektrophilie des substituierten C-Atoms und können mit den entsprechenden nukleophilen Gruppen der Konjugationsmoleküle reagieren, oder die eingeführten Gruppen besitzen eine hohe Nukleophilie und reagieren mit elektrophilen Gruppen der Konjugationsmoleküle. Die Natur des Substituenten entscheidet darüber, ob primär der elektrophile Kohlenstoff oder der nukleophile Substituent mit einer entsprechenden Gruppe eines Konjugationsmoleküls reagiert. Prinzipiell sind beide Reaktionstypen mit ein und demselben Molekül möglich.

Phase II, die Konjugation: Hier werden Stoffe, die in der Phase I die entsprechenden funktionellen Gruppen erhalten haben, durch Transferasen an verschiedene niedermolekulare Substanzen gebunden. Wichtige Reaktionen hierbei sind Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung oder die Konjugation mit Aminosäuren oder Glutathion. Die Wasserlöslichkeit wird so erhöht und die Exkretion über Niere und Leber gefördert.

Die in Phase I eingeführten funktionellen Gruppen sind oft Voraussetzung für nachfolgende Phase II. Die direkte Konjugation kann aber auch erfolgen, wenn bereits geeignete funktionelle Gruppen im Molekül vorliegen. In der Regel sind die Phase II-Metaboliten

unwirksam, da die gebildeten Konjugate sehr polar, gut wasserlöslich und somit schnell renal und biliär ausscheidbar sind.

Der Phase I- und II-Metabolismus ist entscheidend für die schnelle Elimination von lipophilen Fremdstoffen. Zusammen bilden sie ein Entgiftungs- und Inaktivierungssystem, da viele der Metaboliten unwirksam oder kaum wirksam sind. Es gibt jedoch auch Xenobiotika, bei denen der eigentliche Stoff unschädlich und erst der Phase I-Metabolit und in selteneren Fällen der Phase II-Metabolit eine toxische Wirkung hat.

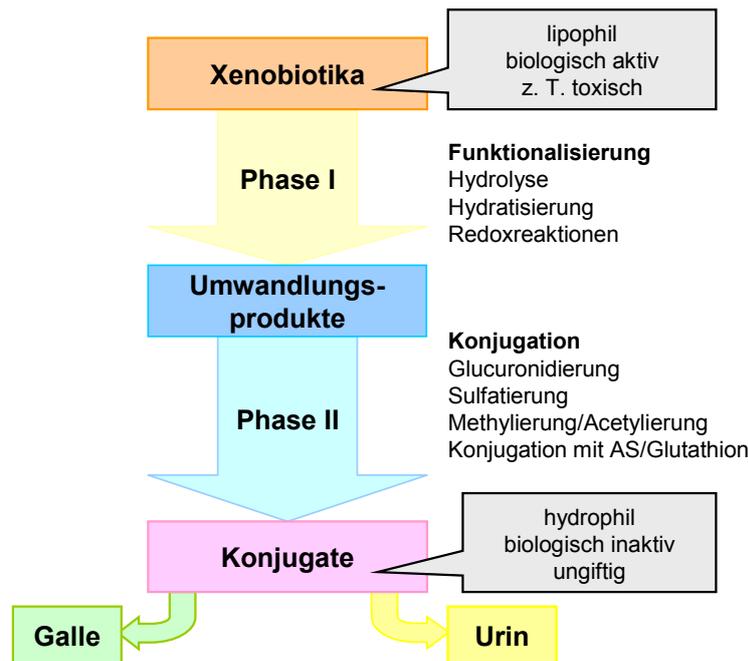


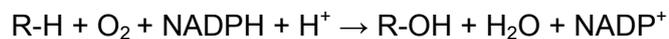
Abbildung 1-6 Schema des Fremdstoffmetabolismus (nach Koolmann und Röhm [135])

Fremdstoffmetabolisierende Enzyme finden sich bei Wirbeltieren hauptsächlich in der Leber, aber auch im Darm, in der Lunge und der Haut als Eintrittspforten der Xenobiotika. Der Leber kommt aufgrund ihrer Größe die Hauptbedeutung für den Metabolismus zu. Dies ist durchaus sinnvoll, weil die meisten Fremdstoffe mit der Nahrung aufgenommen und über die Pfortader vom Magen-Darm-Trakt der Leber zugeführt werden. Bevor die Stoffe mit dem Blut im gesamten Organismus verteilt werden, unterliegen sie einer Metabolisierung durch die Leber („first pass effect“). Die Metaboliten werden von der Leber wieder an das Blut abgegeben oder über die Galle in den Darm ausgeschieden. Da die Metabolisierung durch die Leber in der Regel zu einer starken Zunahme der Wasserlöslichkeit führt, erfolgt die Ausschleusung in die Galle oder ins Blut mit Hilfe von aktiven Transportsystemen. Entscheidend für die Art der Ausschleusung ist die Molekülgröße, das Ausschlussvolumen für die Abgabe in die Blutbahn liegt beim Menschen häufig über 400 Da [132-134,136].

1.4.1.2 Cytochrom P450-Enzyme (CYP)

Die Oxidationen der Phase I werden durch verschiedene Enzyme katalysiert, wie Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen, Aminooxidasen, Esterasen, flavinhaltige Monooxygenasen (FMO) und Epoxidhydrolasen. Die wichtigsten unter ihnen sind die CYP, bei denen es sich um mischfunktionelle Monooxygenasen handelt. CYP sind 45-55 kDa schwere Membranenzyme mit einer hydrophoben Aminosäuresequenz im N-Terminus, die im glatten endoplasmatischen Reticulum vieler Organe, besonders aber in der Leber (90-95%) lokalisiert sind. Die Bezeichnung P450 beruht auf den spektralen Eigenschaften der Enzyme, die auch zu deren Nachweis genutzt werden können. Im reduzierten Zustand und nach Begasung mit CO haben sie bei 450 nm ein Absorptionsmaximum. Es gibt eine Vielzahl von CYP-Isoenzymen, die entsprechend der Homologie der Aminosäure-Sequenz in unterschiedliche Familien eingeteilt werden. Beim Menschen sind mehr als 60 verschiedene Isoenzyme bekannt, die in 43 Subfamilien und 18 Familien eingeteilt wurden. Die enzymatische Ausstattung jedes einzelnen Menschen unterliegt dabei dem genetischen Polymorphismus.

Unter Monooxygenasen versteht man Enzyme, die ein Atom des molekularen Sauerstoffs auf das Fremdstoffsubstrat übertragen und das zweite Sauerstoffatom für die Bildung von Wasser verwenden. Dabei werden zwei Elektronen übertragen, wodurch die Entstehung aktiver Radikale verhindert wird. Der Einbau des O-Atoms in das Substrat geschieht an einer C-H-Bindung, Doppelbindung oder an freie Elektronenpaare. Die allgemeine Formel für Monooxygenase-katalysierte Reaktionen lautet:



Wie bei Hämoglobin befindet sich im aktiven Zentrum ein Protoporphyrin-IX-Ring aus 4 Pyrrolen (Tetrapyrrolring). Dieser ist relativ lose über hydrophobe, elektrostatische und kovalente Bindungen an das Protein gebunden. An den Porphyrinring gebunden sind 6 Eisenatome. Eines der Eisenatome ist über ein Cystein-Thiolat gebunden. Das sechste Eisenatom befindet sich zentral im Porphyrinring und ist für die Bindung des Sauerstoffs zur Oxidation des Substrats verantwortlich (Abb. 1-7).

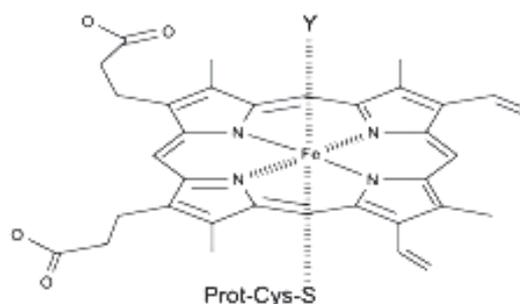


Abbildung 1-7 Struktur des aktiven Zentrums [136]

Co-assoziiert in der Membran und für die Aktivität der CYP essentiell ist die NADPH Cytochrom P450 Reduktase (POR). CYP und POR bilden eine funktionelle Einheit. Die POR überträgt die für die Oxidationsreaktionen benötigten Elektronen von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) auf das CYP. Im Gegensatz zu den CYP gibt es nur eine einzige POR, die alle verfügbaren CYP-Enzyme reduziert. Ihre Konzentration in der Membran beträgt nur etwa 10% der CYP-Konzentration. Diese Konzentration ist ausreichend, da die CYP-katalysierten Reaktionen relativ langsam ablaufen. Zusätzlich benötigt die Reaktion molekularen Sauerstoff, NADPH und Phospholipide, insbesondere Phosphatidylcholin.

Die Übertragung des Sauerstoffs auf ein Fremdstoffmolekül erfolgt nach einem spezifischen Mechanismus, bei dem zuerst das Substrat und dann der Sauerstoff gebunden werden (Abb. 1-8). Das CYP besitzt im aktiven Zentrum eine lipophile Bindungsstelle. Nach Bindung des Substrats an die oxidierte Form des Enzyms (1) wird ein Elektron von NADPH mit Hilfe der POR auf das zentrale Fe-Atom übertragen, welches dabei von Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert wird (2). Der Häm-Fe-Komplex bindet O_2 als sechsten Liganden (3). Nach Übertragung eines zweiten Elektrons entsteht aktivierter Sauerstoff und H_2O , das Häm- Fe^{2+} geht wieder in Fe^{3+} über (4, 5). Der aktivierte Sauerstoff wird auf das Substrat übertragen (6), als Reaktionsprodukt wird das oxidierte Substratmolekül freigesetzt (7). Danach kann der Zyklus von vorne beginnen [132,136].

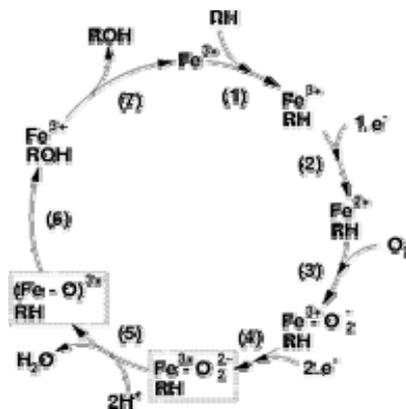


Abbildung 1-8 Mechanismus der CYP-vermittelten Monoxygenierung

Die Insertion von O_2 in die Substrate führt entweder zur Hydroxylierung oder zur oxidativen Dealkylierung des Substrats. Alkene und Alkine können dagegen auch zu Epoxiden umgesetzt werden. Durch die CYP-vermittelte Oxidation wird eine höhere Partialladung in die Substrate eingeführt (elektrophiler Kohlenstoff, nukleophiler Substituent), was eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgende Konjugation in der Phase II ist.

Wie bereits erwähnt, führt die durch CYP und andere Phase 1-Enzyme vermittelte Verstoffwechslung nicht immer zu einer Entgiftung. Viele Stoffe werden erst durch ihre Metabolisierung aktiviert, „gegiftet“. Die in der Folge entstehenden reaktiven (oder stabilen) Zwi-

schenstufen können mit Makromolekülen der Zelle, wie mit Lipiden, der DNA oder Proteinen reagieren bzw. interagieren. Die Reaktion mit Lipiden führt dabei zu Strukturveränderungen in der Membran, die Reaktion mit der DNA kann zu genotoxischen und kanzerogenen Effekten und die Reaktion mit Proteinen zu Funktionseinschränkungen, z.B. zur Hemmung von Enzymen führen.

1.4.2 Der Metabolismus von NNK

Der Metabolismus der TSNA wurde bereits eingehend *in vivo* und *in vitro* untersucht. Die Forschungen erstreckten sich von verschiedenen Nagetierarten über subhumane Primaten bis hin zum Menschen [40,137].

Für NNK konnten fünf verschiedene Typen der Metabolisierung nachgewiesen werden: Reduktion der Carbonylgruppe, Einführung von Hydroxylgruppen, Pyridin-*N*-Oxidation, Denitrosierung und Bildung von ADP-Addukten mit dem Pyridinstickstoff (Abb. 1-9). Die Hydroxylierung erfolgt überwiegend als so genannte α -Hydroxylierung an den zur Nitrosogruppe benachbarten Kohlenstoffatomen. Für eine β - oder γ -Hydroxylierung in der Butylseitenkette fehlt jeglicher Nachweis, die 6-Hydroxylierung wurde nur bei Ratten *in vivo* gefunden. Am oxidativen Metabolismus der TSNA sind vor allem CYP beteiligt, in geringerem Umfang auch FMO, freie Radikale und Peroxidasen [133,134,138]. Die Lipoxygenase der Lunge hingegen ist nicht, wie früher angenommen, an der Verstoffwechslung von NNK beteiligt [139].

Die Reduktion der Carbonylgruppe des NNK führt zum NNAL. In vielen Geweben ist NNAL der vorherrschende Metabolit von NNK. Es wird schnell gebildet und dominiert im Blut über NNK. Während NNK bei der Ratte mit einer Halbwertszeit von etwa einer halben Stunde eliminiert wird, beträgt die Halbwertszeit von NNAL 3-5 Stunden [140]. Bei Rhesusaffen erhöht sich diese Zeit bereits auf 2 Tage [141] und beim Menschen wurde sie auf eineinhalb Monate geschätzt [142]. Die Rückoxidation von NNAL zu NNK tritt in nur geringem Umfang auf [143]. NNAL ist ebenfalls kanzerogen und wird ähnlich wie NNK weiter verstoffwechselt. Zusätzlich wird NNAL an der Hydroxylgruppe wie auch am Pyridinstickstoff glucuronidiert. Beim Menschen werden die gebildeten *O*- und *N*-Glucuronide und auch NNAL selbst in höherem Maße im Urin ausgeschieden als bei Labornagern. Während bei Ratten nach niedriger NNK-Dosis weniger als 5% als NNAL und NNAL-Gluc im Urin ausgeschieden werden, machen diese Metaboliten nach Aufnahme noch wesentlich kleinerer NNK-Mengen im Affenurin 30% der Dosis aus [141,144]. Im menschlichen Urin wurde dieser Anteil zunächst mit bis zu 50% der geschätzten Dosis angegeben. Neuere Untersuchungen mit Zigaretten, denen deuteriertes NNK zugesetzt worden war, ergaben aber Werte von weniger als 10% [145]. Im Gegensatz zur CYP-vermittelten oxidativen Verstoffwechslung erfolgt die Reduktion von NNAL durch Carbonyl-Reduktasen, insbesondere durch die 11- β -Hydroxysteroid Dehydrogenase,

Die *N*-Oxidation im Pyridin-Ring von NNK und NNAL ist stark speziesabhängig. Beide *N*-Oxide werden bei Säugetieren renal ausgeschieden. Im menschlichen Urin wurde nur das NNAL-*N*-Oxid in geringen Mengen gefunden. In menschlichen Lungenschnitten wurde dagegen die Bildung beider *N*-Oxide nachgewiesen, allerdings auf einem sehr viel geringeren Niveau als bei Hamstern, Ratten und Mäusen [9]. In der perfundierten Rattenlunge war das NNK-*N*-Oxid sogar der Hauptmetabolit von NNK [147]. In Mikrosomen von Leber, Lunge und auch Niere konnte gezeigt werden, dass die Pyridin-*N*-Oxidation von NNK und NNAL hauptsächlich von CYP bewerkstelligt wird.

Die bei anderen Nitrosaminen gut charakterisierte Denitrosierung konnte bei NNK nicht eindeutig nachgewiesen werden. Sie sollte über Iminbildung zum Ketoaldehyd und letztlich zu Myosmin führen, welches jedoch nicht bestimmt werden konnte. Einziger Hinweis auf die Denitrosierung in enzymatischen Ansätzen ist die Bildung von Nitrit. Die Enzym-Beteiligung ist nicht genau untersucht, die Reaktion wird aber vermutlich durch CYP vermittelt.

Die physiologische Rolle der Addukte der *in vitro* am Pyridinstickstoff gebildeten Addukte von NNAL und NNK mit ADP⁺ bzw. ADPH (nur NNK) ist bis heute nicht geklärt. Die Bildung dieser Addukte wird ähnlich wie bei Nicotin und Cotinin durch Glycohydrolasen katalysiert.

Der für die kanzerogene Wirkung entscheidende Metabolismus von NNK und NNAL ist die α -Hydroxylierung, die zu instabilen Zwischenstufen führen, deren Endprodukte Ketosäure und Hydroxysäure im Urin von Mensch und Versuchstier die vorherrschenden Metaboliten nach NNK-Belastung darstellen [40,145]. Die α -Hydroxylierung lässt sich in die α -Methylen- und die α -Methyl-Hydroxylierung unterteilen. Die Hydroxylierung des zur *N*-Nitroso-Gruppe benachbarten Methylen-C-Atoms führt zum instabilen α -Methylenhydroxy-NNK, das spontan zu Methan-Diazohydroxid oder dem korrespondierenden Diazonium-Ion und dem Ketoaldehyd zerfällt. *In vitro* kann der Ketoaldehyd in mikrosomalen Systemen nur als das Bisulfit-Addukt nachgewiesen werden, da eine Weiteroxidation zur Ketosäure erfolgt. Das Methan-Diazohydroxid reagiert überwiegend mit Wasser zu Methanol ab, kann aber auch in geringem Umfang an Makromoleküle wie Proteine und DNA binden. Von anderen Nitrosaminen wie dem NDMA weiß man, dass die DNA-Methylierung einen wichtigen ersten Schritt in der Kanzerogenese darstellt. Die α -Methylenhydroxylierung von NNAL verläuft ähnlich und führt zum Diazohydroxid und einem Hydroxyaldehyd, welches über das im Gleichgewicht stehende Diol und Lactol weiter zur Hydroxysäure oxidiert wird. Bei asymmetrischen Nitrosaminen gibt es einen zweiten Weg der Aktivierung, der bei NNK durch Hydroxylierung der Methylgruppe zum α -Hydroxymethyl-NNK führt. Die Bildung dieses instabilen Metaboliten konnte anhand seines Glucuronids bei Ratten nachgewiesen werden. Überwiegend zerfällt er jedoch spontan in Formaldehyd und 4-(3-pyridyl)-4-oxobutan-1-diazohydroxid/Diazonium-Ion. Letzteres reagiert mit Wasser zum Ketoalkohol (HPB) und wird *in vivo* effektiv zur Ketosäure

oxidiert. Auch von dieser instabilen Zwischenstufe wurde ein Glucuronid nachgewiesen. Für die Kanzerogenität ist die Fähigkeit zur DNA-Pyridyloxobutylierung von Bedeutung, die Reaktion mit Hämoglobin eröffnet die Möglichkeit des Biomonitorings der Langzeitbelastung. Die α -Methylhydroxylierung von NNAL ergibt eine ähnliche Kaskade an Produkten mit Pyridyl-THF und Diol als Endprodukte in mikrosomalen Ansätzen und der Hydroxysäure *in vivo*. Neuerdings wurden auch DNA-Addukte dieses Aktivierungsweges bei Ratten nachgewiesen [148,149].

1.4.2.1 Der Metabolismus von NNK unter Verwendung humaner Mikrosomen

Der Metabolismus von NNK wurde an Mikrosomen unterschiedlicher Ursprungsgewebe verschiedener Spezies untersucht. Einen Überblick über die bis 2005 publizierten Arbeiten gibt *Jalas et al.* [10]. In den Versuchen an humanen Mikrosomen verschiedener Gewebe lagen die Substratkonzentrationen meist im mikromolaren Bereich (Tab. 1-5). Selbst die niedrigste Konzentration von 0,5 μM liegt für NNK sicher um viele Zehnerpotenzen über die beim Raucher im Blut zu erwartenden Konzentrationen. Das in höheren Konzentrationen beim Menschen vorliegende und bisher als einziges TSNA im Blut bestimmte NNAL lag bei starken Rauchern zwischen 1,7 und 88 pM [150].

Tabelle 1-5 Kinetische Parameter des NNK-Metabolismus in Humanmikrosomen

Gewebe	Bedingungen	Metabolit	V_{\max} [pmol/mg/min]	k_m [μM]	V_{\max}/k_m	Lit.
Lunge	7-200 μM NNK; 60 min Inkubation; 1,9 mg/mL Protein	Ketoaldehyd	4,6 \pm 0,3	653 \pm 48	0,007	[151]
		Hydroxysäure	2,9 \pm 0,1	526 \pm 31	0,006	
		NNK-N-Oxid	7,7 \pm 0,3	531 \pm 24	0,015	
		NNAL	335 \pm 12	573 \pm 41	0,585	
Leber	5-2000 μM NNK; 30 min Inkubation; 0,75 mg/mL Protein	Ketoaldehyd	60	367	0,16	[152]
		HPB	500	1200	0,42	
		NNAL-N-Oxid	19	53	0,36	
		NNAL	282	56	5,0	
Zervix-	5-6000 μM NNK; 60 min Inkubation; 0,31 mg/mL Protein	Ketosäure NNAL	650 1395	7075 739	0,092 1,9	[153]
fötale Nasen- schleim- haut	0,5-60 μM NNK; 60 min Inkubation; 0,167-0,25 mg/mL Protein	Ketoaldehyd HPB NNAL	3,0 \pm 0,1 0,85 \pm 0,03 2300	6,5 \pm 1,1 6,7 \pm 0,8 400	0,46 0,13 5,8	[154]

Neben den Bedingungen wie Inkubationszeit, Substrat- und Mikrosomenkonzentration spielt auch die Expression der beteiligten Enzyme im Ursprungsgewebe eine wichtige Rolle. Dadurch können selbst unter identischen Versuchsbedingungen die Ergebnisse sehr unterschiedlich ausfallen (Tab. 1-6).

Tabelle 1-6 Streubreite des NNK-Umsatzes in Humanmikrosomen unter verschiedenen Versuchsbedingungen; n.n., nicht nachgewiesen

Gewebe	Bedingungen	Metaboliten	min. Umsatz [pmol/mg/min]	max. Umsatz [pmol/mg/min]	Lit..
Lunge	10 μ M NNK; 20 min Inkubation; 1,25 mg/mL Protein	Ketoaldehyd + HPB NNAL	0,61 \pm 0,29 41 \pm 7	0,87 \pm 0,15 49 \pm 21	[155]
Lunge	4,2 μ M NNK; 30 min Inkubation; 1 mg/mL Protein	Σ α -Hydroxylierung Σ N-Oxidation NNAL	0,01 0,01 0,01	2,3 0,04 27	[156]
Lunge	4,2 μ M NNK; 15 min Inkubation; 1 mg/mL Protein	Σ α -Hydroxylierung Σ N-Oxidation NNAL	0,02 n.n. ¹ 5	0,057 0,064 13	[157]
Leber	80 μ M NNK; 30 min Inkubation; 0,3 mg/mL Protein	HPB Ketoaldehyd + -säure	4,8 \pm 1,5 0,3 \pm 0,4	28,7 \pm 16,4 8,8 \pm 6,2	[158]
Pankreas	5 μ M NNK; 60 min Inkubation; 1 mg/mL Protein	NNAL	0,13 \pm 0,12	3,8 \pm 1,6	[159]

¹n.n. = nicht nachweisbar

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 HPLC-System

- Online Degasser Degasys DG-1210, Gynkotec, Germering
- Gradientenpumpe P 5801 HPG, Gynkotec, Germering
- Automatischer Probengeber 233 XL, Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
- Samplersoftware 735 Sampler Software v 4.01, Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
- Online Radioaktivitätsdetektor RAMONA quattro, raytest, Straubenhardt
- Zumischpumpe für Szintillator HPLC LS-pump, raytest, Straubenhardt
- Auswertungssoftware GINA Star v 5.01, raytest, Straubenhardt
- HPLC-Vorsäule (NNK) Security Guard Cartridge C18, 4 x 3,0 mm, Phenomenex, Aschaffenburg
- HPLC-Säule (NNK) Luna (2) C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg

Im Rahmen der Methodenentwicklung kamen zusätzlich zum Einsatz:

- UV/Vis-Detektor Shimadzu SPD-10A, Shimadzu, Neufahrn
- Online Radioaktivitätsdetektor RAMONA Star, raytest, Straubenhardt

2.1.2 Laborgeräte

- Analysenwaage XS 205 DualRange, Mettler Toledo, Giessen
- β-Counter TriCarb 2500 TR, Packard, Dreieich mit WinSpectral 1414, Perkin Elmer, Rodgau-Jülich
- Magnetrührer IKA-Combimag RCT, Jahnke & Kunkel, Staufen i. Breisgau
- Messkolben 1000, 250, 200, 100 und 50 mL
- pH-Meter inolab pH Level 1 mit pH-Electrode SenTix 41, WTW, Weilheim
- Minizentrifuge Modell 22 R, Hettich, Tuttlingen
- Reinstwasseranlage Millipore Milli-Q, Millipore, Schwalbach
- Rüttler Vortex REAX 2000, Heidolph, Kehlheim
- Thermomixer Modell 5436, Eppendorf, Hamburg
- Varipetten 1 mL, 200 µL, 100 µL und 10 µL, Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- Einmalhandschuhe Vasco Sensitive, B. Braun, Melsungen
- Eppendorf Cups 1,5 mL, Eppendorf, Hamburg
- Papiertücher Kimwipe, Kimberley-Clark, Zefa, München
- Zentrifugen-Cups Nanosep 0,2 µm, Pall, Dreieich

- Pasteurpipetten 150 mm mit Pipettenhütchen, VWR, Darmstadt
- Spitzen für Varipetten 10 µL, 200 µL, 1 mL, Eppendorf, Hamburg
- Szintillationsgefäße 20 mL, Packard, Dreieich
- Vials für Autosampler 300 µL Crimp Top LV PP 12 x 32 mm, Alltech, Deerfield, USA. und Deckel, Chromacol, 11-PEC1, Trumbull, USA.
- Wheaton-Gläser 1,5 mL mit Schraubdeckel und Teflondichtung, Chromatographiehändler Müller, München

2.1.4 Zellfraktionen

- Humanlebermikrosomen 20 mg/mL Protein, Xenotech, Lenexa, USA
- Humanlungenmikrosomen 10 mg/mL Protein, Xenotech, Lenexa, USA

2.1.5 Chemikalien

- Acetonitril p.A., Merck, Darmstadt
- Ammoniumacetat p.A., Merck, Darmstadt
- Bariumhydroxid p.A., Merck, Darmstadt
- Bidest. Wasser, gereinigt durch Milli-Q, Millipore, Schwalbach
- Chlorzoxazon (CZ), Sigma-Aldrich, Steinheim
- Cotinin, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Dikaliumhydrogenphosphat p.A., Merck, Darmstadt
- Diol, TRC, North York, Canada
- EDTA p.A., Merck, Darmstadt
- Ethanol p.A., Merck, Darmstadt
- Glucose-6-Phosphat Natriumsalz, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Roche Diagnostics, Mannheim
- HPB, TRC, North York, Canada
- Ketosäure, TRC, North York, Canada
- Magnesiumchlorid p.A., Merck, Darmstadt
- Methanol p.A., Merck, Darmstadt
- 8-Methoxypsoralen (MOP), Sigma-Aldrich, Steinheim
- NADP di-Natriumsalz, Roche Diagnostics, Mannheim
- α-Naphthoflavon (NF), Sigma-Aldrich, Steinheim
- Natriumhydrogencarbonat p.A., Merck, Darmstadt
- Nicotin, Sigma-Aldrich, Steinheim
- NNAL, TRC, North York, Canada
- NNAL-N-Oxid, TRC, North York, Canada
- NNK, TRC, North York, Canada
- [Pyridyl-5-³H]-NNK, spez. Aktivität 21,7 Ci/mmol, Hartmann Analytik, Braunschweig

- NNK-N-Oxid, TRC, North York, Canada
- Ortho-Phosphorsäure, 85 %, Merck, Darmstadt
- Szintillator (β -Counter), Ultima Gold, Merck, Darmstadt
- Szintillator (HPLC), Quickszint Flow 302, Zinsser Analytik, Frankfurt
- Troleandomycin (TAO), Sigma-Aldrich, Steinheim
- Zinksulfat p.A., Merck, Darmstadt

2.1.6 Puffer und Lösungen

- Bariumhydroxid-Lösung gesättigt
20 g $\text{Ba}(\text{OH})_2$ mit bidest. Wasser auf 250 mL aufgefüllt
- Inkubationspuffer
Phosphatpuffer 50 mM pH 7,4, mit 3 mM Magnesiumchlorid und 1 mM EDTA: 0,8709 g di-Kaliumhydrogenphosphat, 0,0610 g Magnesiumchlorid und 0,0372 g EDTA auf 100 mL bidest. Wasser aufgefüllt und mit H_3PO_4 auf pH 7,4 eingestellt
- Natriumhydrogencarbonat-Lösung 2 %
2 g Natriumhydrogencarbonat auf 100 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt
- Regenerierendes System
20 mM Glucose-6-Phosphat, 4 mM NADP und 4 U/mL Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in 2%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung: 3 mg NADP, 5,64 mg Glucose-6-Phosphat und 34 μL Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit 2 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung auf 1 mL aufgefüllt
- Zinksulfat-Lösung 25%
62,5 g Zinksulfat auf 200 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt

2.1.6.1 Lösungen zur Bestimmung des NNK-Metabolismus

- Chlorzoxazon (CZ)-Lösungen
19,81 mM: 6,72 mg CZ auf 1 mL mit Methanol aufgefüllt
9,91 mM: CZ-Lösung 19,81 mM mit Methanol 1:2 verdünnt
3,96 mM: CZ-Lösung 9,91 mM mit Methanol 1:2,5 verdünnt
1,98 mM: CZ-Lösung 3,96 mM mit Methanol 1:2 verdünnt
0,40 mM: CZ-Lösung 1,98 mM mit Methanol 1:5 verdünnt
- Cotinin-Lösungen
56,7 M: 10 mg Cotinin auf 1 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt
5,7 mM: 10 μL Cotinin-Stammlösung auf 10 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt
- 8-Methoxypsoralen (MOP)-Lösungen
19,84 mM: 8,58 mg MOP auf 2 mL mit Methanol aufgefüllt
9,92 mM: 8-MOP-Lösung 19,84 mM mit Methanol 1:2 verdünnt
3,97 mM: 8-MOP-Lösung 9,92 mM mit Methanol 1:2,5 verdünnt
1,98 mM: 8-MOP-Lösung 3,97 mM mit Methanol 1:2 verdünnt
0,4 mM: 8-MOP-Lösung 1,98 mM mit Methanol 1:5 verdünnt
- α -Naphthoflavin (NF)-Lösungen
20,12 mM: 10,96 mg NF mit Methanol auf 2 mL aufgefüllt
10,06 mM: NF-Lösung 20,12 mM mit Methanol 1:2 verdünnt
4,02 mM: NF-Lösung 10,06 mM mit Methanol 1:2,5 verdünnt
2,01 mM: NF-Lösung 4,02 mM mit Methanol 1:2 verdünnt
0,4 mM: NF-Lösung 2,01 mM mit Methanol 1:5 verdünnt

- Nicotin-Lösungen
6,2 M: 1 mg Nicotin auf 1 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt
6,2 mM: 10 µL Nicotin-Stammlösung auf 10 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt
- [Pyridyl-5-³H]-NNK, 1:10 verdünnt
100 µL [pyridyl-5-³H]-NNK mit 450 µL Ethanol und 450 µL bidest. Wasser auf 1 mL aufgefüllt. Entspricht 4,61 µM
- NNK-Lösungen
15 mM: 31,1 mg auf 10 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt
1,5 mM: NNK-Lösung 15 mM mit bidest. Wasser 1:10 verdünnt
0,15 mM: NNK-Lösung 1,5 mM bidest. Wasser 1:10 verdünnt
0,015 mM: NNK-Lösung 0,15 mM mit bidest. Wasser 1:10 verdünnt
- Troleandomycin (TAO)-Lösungen
19,95 mM: 32,48 mg TAO mit Methanol auf 2 mL aufgefüllt
9,98 mM: TAO-Lösung 19,95 mM mit Methanol 1:2 verdünnt
3,99 mM: TAO-Lösung 9,98 mM mit Methanol 1:2,5 verdünnt
2,00 mM: TAO-Lösung 3,99 mM mit Methanol 1:2 verdünnt
0,4 mM: TAO-Lösung 2,00 mM mit Methanol 1:5 verdünnt

2.1.7 HPLC-Fließmittel

- Eluent A: Ammoniumacetat-Puffer 15 mM:
1,15 g auf 1 L mit bidest. Wasser aufgefüllt
- Eluent B: Acetonitril

2.2 Methoden

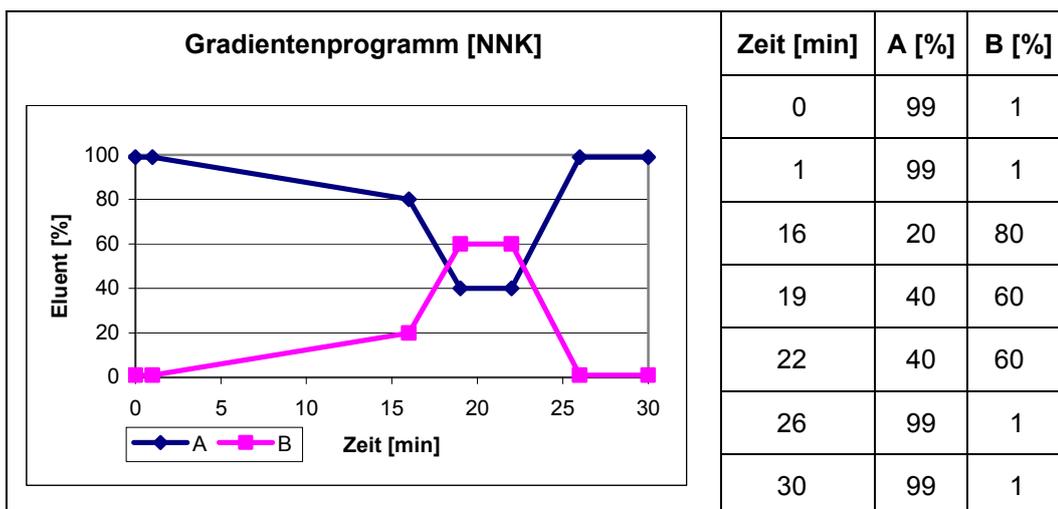
2.2.1 Vorversuche

2.2.1.1 HPLC-Analytik

Zur Entwicklung der HPLC-Methode wurden die, bei der mikrosomalen Verstoffwechslung von NNK zu erwartenden, nicht radioaktiv markierten Referenzsubstanzen chromatographiert und mit UV-Detektion bei 245 nm nachgewiesen. Dazu wurden je 1 µg der Substanzen Hydroxysäure, Ketosäure, NNAL-*N*-Oxid, Diol, NNK-*N*-Oxid, HPB, NNAL und NNK einzeln, sowie im Anschluss als Mischung vorliegend injiziert. Das HPLC-Programm wurde dahingehend modifiziert, dass eine optimale Trennung in kurzer Zeit erreicht wurde (Tab. 2-1). Dabei wurde berücksichtigt, dass der Abstand zwischen den Peaks ausreichend ist, da das Volumen der Zellen im Radioaktivitätsdetektor größer ist als im UV-Detektor. Die längere Verweildauer der Substanzen führt zu einer höheren Empfindlichkeit, aber auch zu breiteren Peaks bei der Radiodetektion.

Des Weiteren wurde ein neuer Radioaktivitätsdetektor etabliert, welcher sich durch vier, hintereinander liegende Messzellen auszeichnet. Das dazugehörige Auswertungsprogramm addiert die Chromatogramme der vier Kanäle zu einem fünften Summenkanal auf, wodurch die Nachweisempfindlichkeit erhöht wird.

Tabelle 2-1 Gradientenprogramm zur Bestimmung von NNK und seiner Metaboliten



2.2.1.2 Mikrosomaler Metabolismus

Zuerst wurden Vorversuche durchgeführt, um die optimalen Inkubationsbedingungen zu bestimmen. Dazu wurden vier verschiedene Konzentrationen des Substrates im nano- und mikromolaren Bereich mit verschiedenen Konzentrationen der Zellfraktionen für 5, 10, 20, 30 und 60 min inkubiert und in einer Dreifachbestimmung der optimale, lineare Bereich der Inkubation ermittelt.

Als optimale Bedingung über den gesamten Konzentrationsbereich wurde eine Proteinkonzentration von 0,2 mg/mL und eine Inkubationsdauer von 20 min festgelegt.

2.2.2 Mikrosomaler Metabolismus

Zur Bestimmung des mikrosomalen Umsatzes von NNK wurden die Mikrosomen zusammen mit dem Substrat in einem physiologischen Milieu mit pH 7,4 bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Die Versuchsansätze mit einem Gesamtvolumen von 400 µL enthielten 5 mM Glucose-6-Phosphat, 1 mM NADP, 1 U/mL Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 0,2 mg/mL Mikrosomen. Alle Ansätze wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt.

Das Substrat wurde mit oder ohne Hemmstoffe nach Abdampfen des Lösungsmittels mit dem Inkubationspuffer und dem regenerierenden System für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe der Mikrosomen gestartet. Nach 20 min wurde die Reaktion durch die neutrale Fällung der Proteine mit 50 µL gesättigter Ba(OH)₂-Lösung und 50 µL 25%iger ZnSO₄-Lösung gestoppt. Der Niederschlag wurde 15 min bei 14000 rpm abzentrifugiert, der Überstand in Nanosep-Cups (0,2 µm) überführt und 10 min bei 8000 rpm weiter aufgereinigt. Der Überstand wurde in HPLC-Vials überführt und davon je 400 µL injiziert.

2.2.2.1 Kinetik

Zur Bestimmung der Kinetik wurde NNK in einem Konzentrationsbereich von 6 nM – 500 µM sowohl mit humanen Leber-, als auch Lungenmikrosomen für einen gleich bleibenden Zeitraum inkubiert (Tab. 2-2 und 2-3).

Tabelle 2-2 Pipettierschema zur Bestimmung der Kinetik mit humanen Lebermikrosomen (LeM)

c (NNK) [µM]	³ H-NNK 1:10 [µL]	0,015 mM NNK [µL]	0,15 mM NNK [µL]	1,5 mM NNK [µL]	15 mM NNK [µL]	Puffer [µL]	reg. Sys. [µL]	LeM [µL]
0,00576	0,5					296	100	4
0,01152	1					296	100	4
0,02304	4					296	100	4
0,04608	4					296	100	4
0,09108	4	1,2				294,8	100	4
0,18483	4	3,7				292,3	100	4
0,36858	4	8,6				287,4	100	4
0,72108	4		1,8			294,2	100	4
1,47108	4		3,8			292,2	100	4
2,93358	4		7,7			288,3	100	4
6,04608	4			1,6		294,4	100	4
12,79608	4			3,4		292,6	100	4
48,79608	4				1,3	294,7	100	4
101,24608	4				2,7	293,3	100	4
251,29608	4				6,7	289,3	100	4
498,79608	4				13,3	282,7	100	4

2.2.2.2 Hemmversuche

Um Aussagen über mögliche Unterschiede bei hohen und niedrigen Konzentrationen machen zu können, wurden die Hemmversuche mit 46 nM bzw. 49 µM NNK durchgeführt. Zur Charakterisierung der an der Verstoffwechslung beteiligten Enzyme wurden dem Assay Inhibitoren zugesetzt, die in der Literatur als weitgehend spezifisch beschrieben werden. Zur

Hemmung von CYP1A1/2 wurde α -Naphthoflavin (NF), von CYP 2A6/13 8-Methoxypsoralen (MOP), von CYP 2E1 Chlorzoxazon (CZ) und von CYP 3A4/5 Troleandomycin (TAO) verwendet. Zusätzlich wurde eine Reihe mit allen 4 Inhibitoren inkubiert. Von den Inhibitoren wurden jeweils 1, 5, 10, 25 und 50 μ M zugesetzt.

Tabelle 2-3 Pipettierschema zur Bestimmung der Kinetik mit humanen Lungenmikrosomen (LuM)

c (NNK) [μ M]	³ H-NNK 1:10 [μ L]	0,015 mM NNK [μ L]	0,15 mM NNK [μ L]	1,5 mM NNK [μ L]	15 mM NNK [μ L]	Puffer [μ L]	reg. Sys. [μ L]	LuM [μ L]
0,00576	0,5					292	100	8
0,01152	1					292	100	8
0,02304	4					292	100	8
0,04608	4					292	100	8
0,09108	4	1,2				290,8	100	8
0,18483	4	3,7				288,3	100	8
0,36858	4	8,6				283,4	100	8
0,72108	4		1,8			290,2	100	8
1,47108	4		3,8			288,2	100	8
2,93358	4		7,7			284,3	100	8
6,04608	4			1,6		290,4	100	8
12,79608	4			3,4		288,6	100	8
48,79608	4				1,3	290,7	100	8
101,24608	4				2,7	289,3	100	8
251,29608	4				6,7	285,3	100	8
498,79608	4				13,3	278,7	100	8

2.2.2.3 Einfluss von Nicotin und Cotinin

Zur Ermittlung des Einflusses von Nicotin und Cotinin auf den Metabolismus von NNK wurden 46 nM bzw. 49 μ M NNK mit der 300-fachen Konzentration an Nicotin (entsprechend 15,41 μ M bzw. 15,41 mM) bzw. der 3000-fachen Konzentration an Cotinin (entsprechend 141,86 μ M bzw. 141,86 mM) inkubiert. Zusätzlich wurde einer Reihe sowohl Nicotin, als auch Cotinin zugesetzt.

2.2.3 Auswertung der Daten

Die prozentuale Verteilung der im HPLC-Chromatogramm detektierten Metaboliten wurde in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft für Windows Excel 2003 (Microsoft, Seattle, USA) eingetragen und daraus die prozentuale Beteiligung jedes Metaboliten am Gesamtumsatz, der Umsatz in pmol sowie der relative Umsatz in pmol/mg Protein/min berechnet. Anhand dieser Basisdaten wurden die Absolutwerte, Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD = standard deviation), Standardabweichungen vom Mittelwert der Standardfehler (SEM = standard error of the mean) und die Medianwerte berechnet.

Die statistischen Analysen und die Abbildungen wurden mit GraphPad Prism V.4.01 (GraphPad Inc., San Diego, USA) nach Übertragung der Daten der prozentualen Beteiligung am Gesamtumsatz bzw. des relativen Umsatzes erstellt. In den Abbildungen werden die Ergebnisse als Mittelwert mit Standardabweichung von jeweils drei Werten dargestellt. Der statistische Vergleich der Gruppen auf signifikante Unterschiede wurde mit dem gepaarten t-Test durchgeführt. Dabei wurden jeweils die Werte einer Serie miteinander verglichen. Die Anpassung an die Michaelis-Menten-Kinetik erfolgte für jeden Metaboliten durch nicht-lineare Regression an die Gleichung

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

wobei V das Integral der pro Zeiteinheit t umgesetzten Substratmenge M darstellt. Die Umsatzgeschwindigkeit wird in pmol/min/mg Protein bei einer Substratkonzentration $[S]$ in μM ausgedrückt. Aus der Gleichung ergeben sich die Konstanten V_{max} (maximale Umsatzgeschwindigkeit in pmol/min/mg Protein) und k_m (Substratkonzentration in μM , bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halb so groß ist wie die maximale). Für den Grad der Anpassung der Daten an die berechnete Kurve gibt das Programm neben dem Korrelationskoeffizienten auch die Standardabweichung vom Mittelwert der Standardfehler für die k_m - und V_{max} -Werte an. Zusätzlich zu den Kinetiken wurde die katalytische Effizienz durch Division des V_{max} -Wertes in pmol/min/mg Protein durch den k_m -Wert in $\mu\text{mol/l}$ errechnet.

Im Ergebnisteil steht die Angabe mg bei den Umsätzen und V_{max} für mg Protein.

3 Ergebnisse

3.1 HPLC-Analytik

3.1.1 Etablierung der Methode

Der neue Radioaktivitätsdetektor Ramona quattro™ mit seinen vier hintereinander liegenden Messzellen und dem integrierten Additionsverfahren bietet die Möglichkeit, selbst kleine, im einzelnen Kanal nur knapp über der Nachweisgrenze (LOD) liegende Peaks im Summenkanal deutlich darzustellen (Abb. 3-1).

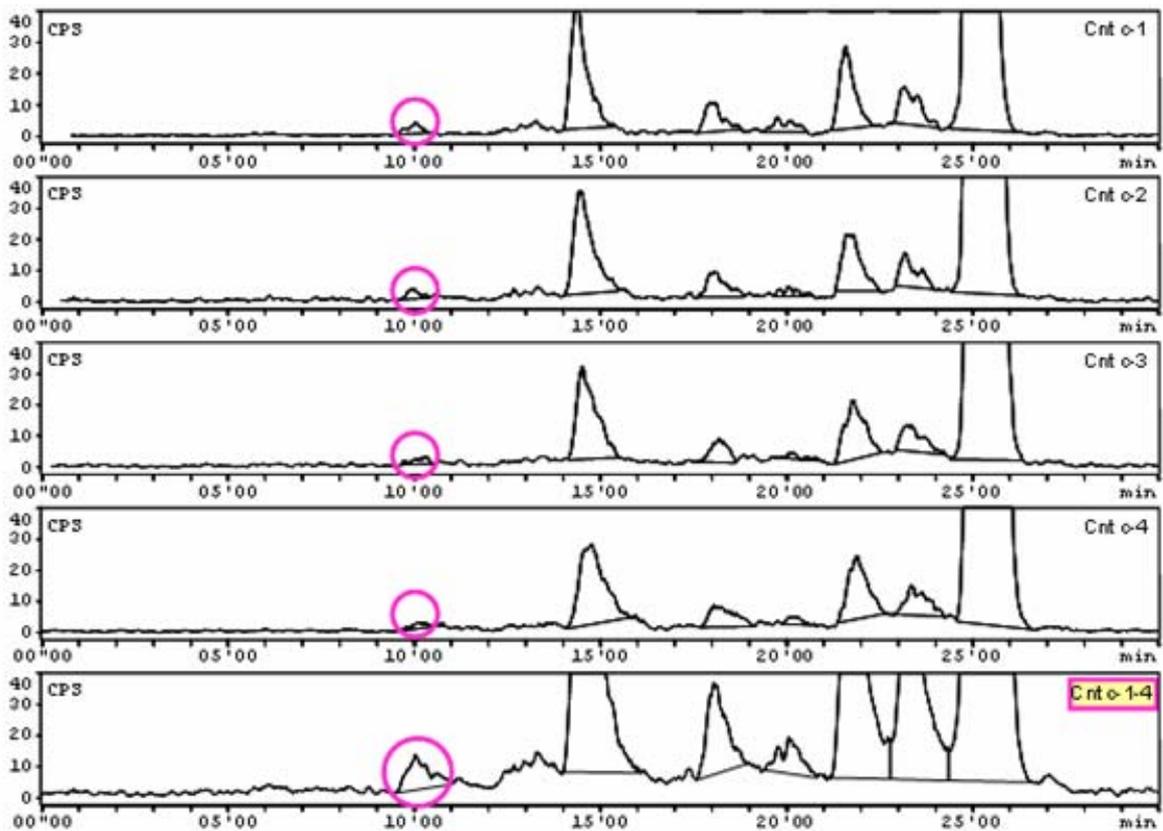


Abbildung 3-1 Darstellung der vier einzelnen Kanäle sowie des Summenkanals und der damit verbundenen erhöhten Nachweisempfindlichkeit am Beispiel des NNK-Metabolismus

Tabelle 3-1 Vergleich der LOD von Ramona STAR™ und Ramona quattro™ am Beispiel des NNK-Metabolismus

Metabolit	Ramona STAR™ [ppm]	Ramona quattro™ [ppm]
Hydroxysäure	37,2	3,4
Ketosäure	33,3	3,1
Diol	42,2	3,9
NNK-N-Oxid	50,1	4,6
HPB	36,1	3,5
NNAL	71,4	2,4

Im Vergleich zu dem alten Detektor Ramona STAR™ konnte die LOD der einzelnen Metaboliten durchschnittlich um den Faktor 10 reduziert werden. In Tabelle 3-1 sind die Nachweisgrenzen des alten Detektors denen des neuen gegenübergestellt.

3.1.2 NNK und seine Metaboliten

Um die im Versuch ermittelten Metaboliten des NNK-Stoffwechsels zu identifizieren, wurde anhand von nicht radioaktiv markierten Referenzmetaboliten durch UV-Detektion bei 245 nm ein Musterchromatogramm erstellt (Abb. 3-2).

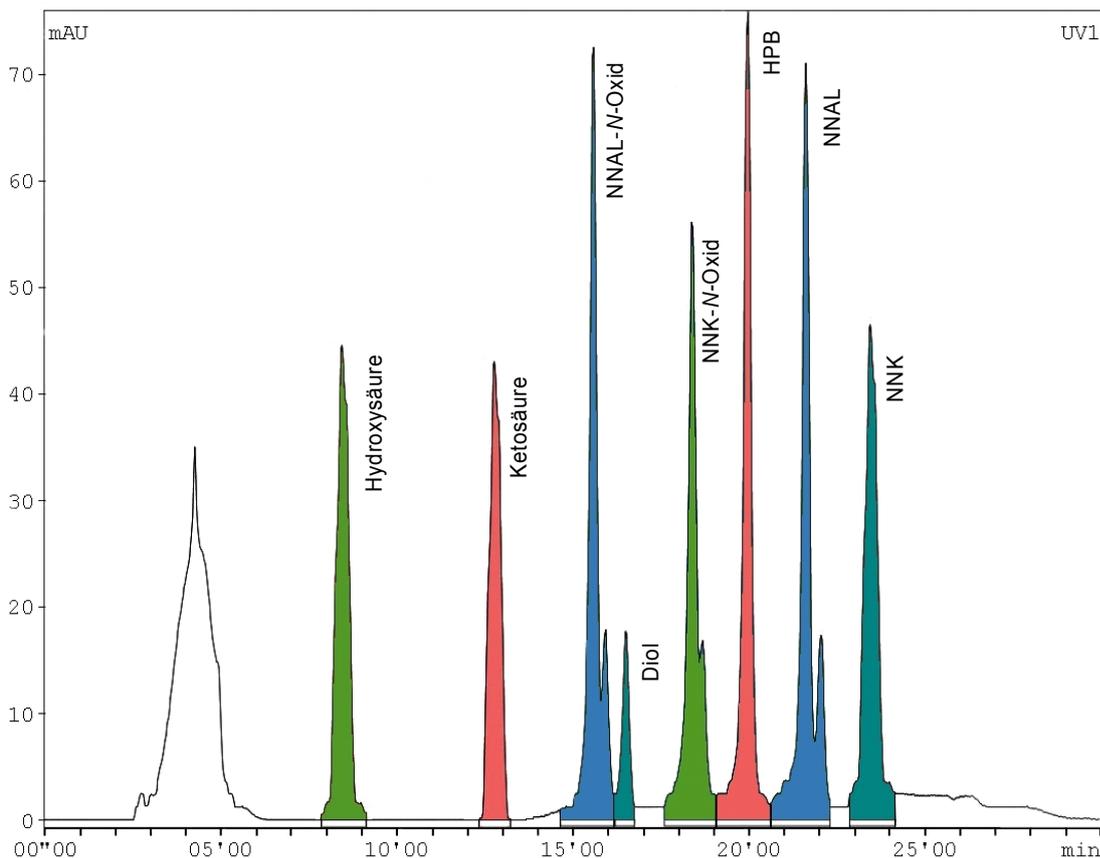


Abbildung 3-2 UV-Chromatogramm der beim mikrosomalen NNK-Metabolismus zu erwartenden Metaboliten anhand von Referenzsubstanzen

Aus dem Referenzchromatogramm konnten die Retentionszeiten der einzelnen Metaboliten und des NNK ermittelt werden. Dabei wurde eine Verschiebung um 30 s im Radioaktivitätsdetektor aufgrund der längeren Wege berücksichtigt. Die Retentionszeiten der wichtigsten Metaboliten, sowie für NNK, sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Die Abweichungen der jeweiligen Peaks von den bestimmten Retentionszeiten betragen in der Regel nicht mehr als eine halbe Minute. Anfang und Ende der Peaks wurden manuell festgelegt und der prozentuale Flächenanteil des jeweiligen Metaboliten mit Hilfe des Integrationsprogramms berechnet.

Tabelle 3-2 Retentionszeiten von NNK und seinen Hauptmetaboliten

Substanz	Retentionszeit [min]
Hydroxysäure	9'00
Ketosäure	13'20
NNAL- <i>N</i> -Oxid	16'00
Diol	17'00
NNK- <i>N</i> -Oxid	18'50
HPB	20'30
NNAL	22'00
NNK	24'20

3.2 Mikrosomaler Metabolismus von NNK

3.2.1 Kinetik

Der NNK-Metabolismus wurde mit humanen Leber- und Lungenmikrosomen untersucht. Je nach Ursprungsorgan der Mikrosomen konnten nicht alle bei der mikrosomalen Verstoffwechslung von NNK identifizierten Metaboliten nachgewiesen werden.

Aus den Chromatogrammen wurden anhand der prozentualen Flächenverteilung der einzelnen Metaboliten zugehörigen Peaks im Verhältnis zur Gesamtfläche, die Umsätze in pg/mg/min für jeden Metaboliten berechnet (siehe Tab. A1 und A2 im Anhang). Die Gesamtfläche entsprach dabei der eingesetzten Konzentration an NNK.

Die Umsätze der verschiedenen Konzentrationen wurden für jeden Metaboliten einer Reaktionskinetik nach Michaelis-Menten angepasst. Dabei wurde sowohl der gesamte Konzentrationsbereich von 6 nM bis 500 μ M, als auch nur der niedrige, nanomolare Bereich für die Berechnung herangezogen, um Unterschiede in der Kinetik darstellen zu können. Bei den Metaboliten, bei denen eine Anpassung sowohl für den hohen, als auch für den niedrigen Konzentrationsbereich möglich war, ergaben sich große Differenzen in den k_m - und V_{max} -Werten. Zusätzlich zu den k_m - und V_{max} -Werten wurde die katalytische Effizienz in beiden Konzentrationsbereichen anhand des Quotienten aus V_{max} und k_m bestimmt (Tab. 3–3). Diese war bei den hohen Konzentrationsbereichen meist etwas höher als bei den niedrigen, eine Ausnahme stellt dabei die Bildung von Hydroxysäure und NNK-*N*-Oxid bei Verwendung von Lungenmikrosomen dar.

3.2.1.1 Lebermikrosomen

Die Carbonylreduktion von NNK führte zu NNAL. Als Metaboliten der α -Methyl- und α -Methylenhydroxylierung von NNK konnte bei den Lebermikrosomen HPB bzw. Ketosäure

und für den Stoffwechselweg der *N*-Oxidation NNK-*N*-Oxid nachgewiesen werden (Abb. 3-3). Die weitere Metabolisierung von NNAL führte zur Hydroxysäure. Diol und NNAL-*N*-Oxid konnten hingegen nicht detektiert werden.

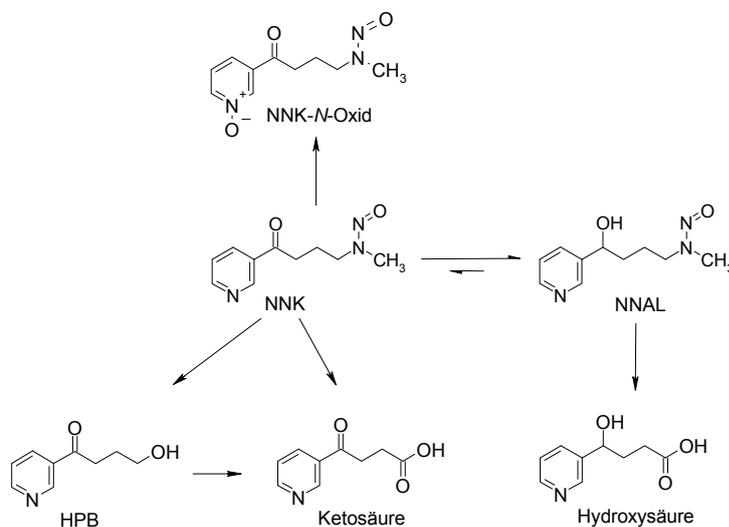


Abbildung 3-3 Metaboliten der Verstoffwechslung von NNK durch humane Lebermikrosomen

Als Hauptmetabolit wurde zu 70-80% NNAL gebildet, gefolgt von HPB (10-14%), Keto-säure (3-8%), Hydroxysäure (3-5%) und NNK-*N*-Oxid (2-4%). Eine Kinetik konnte für alle Metaboliten über den gesamten Konzentrationsbereich angepasst werden. Im nanomolaren Bereich gelang die Anpassung je nach Metabolit für einen größeren bzw. kleineren Konzentrationbereich (Tab. 3-3).

3.2.1.1.1 NNAL

Die Anpassung der Kinetik für die Bildung von NNAL ergab für den gesamten Konzentrationsbereich von 6 nM bis 499 μ M k_m - und V_{max} -Werte von 681 μ M und 30962 pmol/mg/min (Abb. 3-4). Im nanomolaren Bereich von 6 nM bis 1,5 μ M ergaben sich mit 27 μ M und 1649 pmol/mg/min erheblich niedrigere Werte. Die Kurve für den niedrigen Konzentrationsbereich wich von der Kurve für den gesamten Konzentrationsbereich deutlich ab. Die katalytische Effizienz war in den beiden Konzentrationsbereichen kaum verschieden. Sie betrug über den gesamten Konzentrationsbereich 7,3 gegenüber 9,8 im nanomolaren Bereich.

3.2.1.1.2 HPB

Die Kinetik für die Bildung von HPB zeigte im niedrigen Konzentrationsbereich keine Abweichung von der Anpassung an den gesamten Konzentrationsbereich (6 nM - 499 μ M), die einen k_m -Wert von 820 μ M und einen V_{max} -Wert von 7183 pmol/mg Protein/min ergab (Abb. 3-5). Die katalytische Effizienz betrug 1,4.

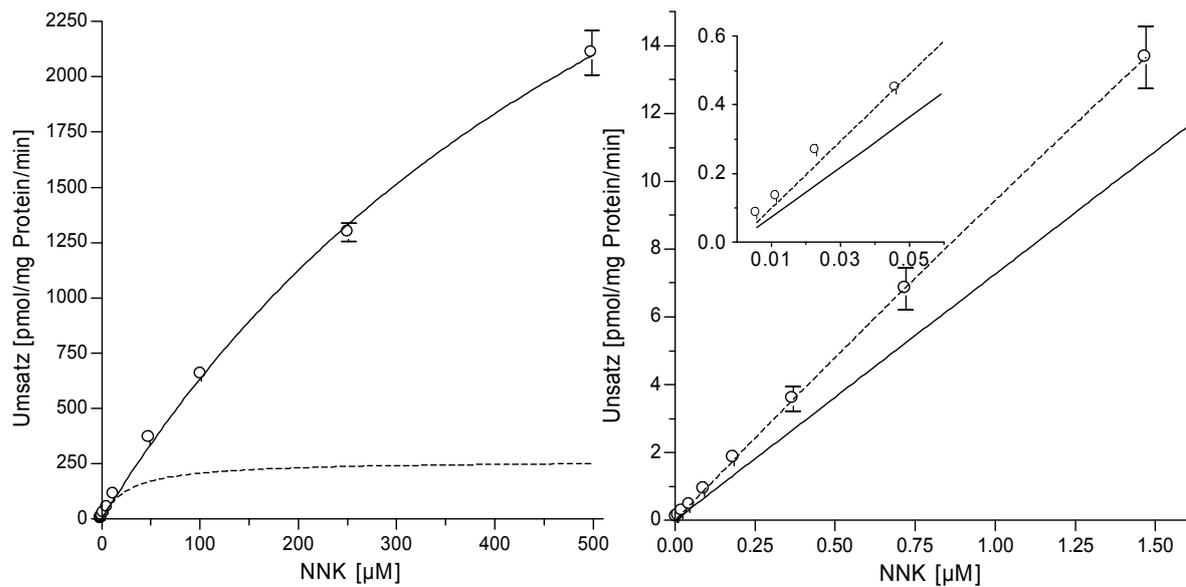


Abbildung 3-4 Lebermikrosomen: Michaelis-Menten-Kinetik von NNAL (MW \pm SD; N = 3)
(— gesamter Konzentrationsbereich; --- nanomolarer Konzentrationsbereich)

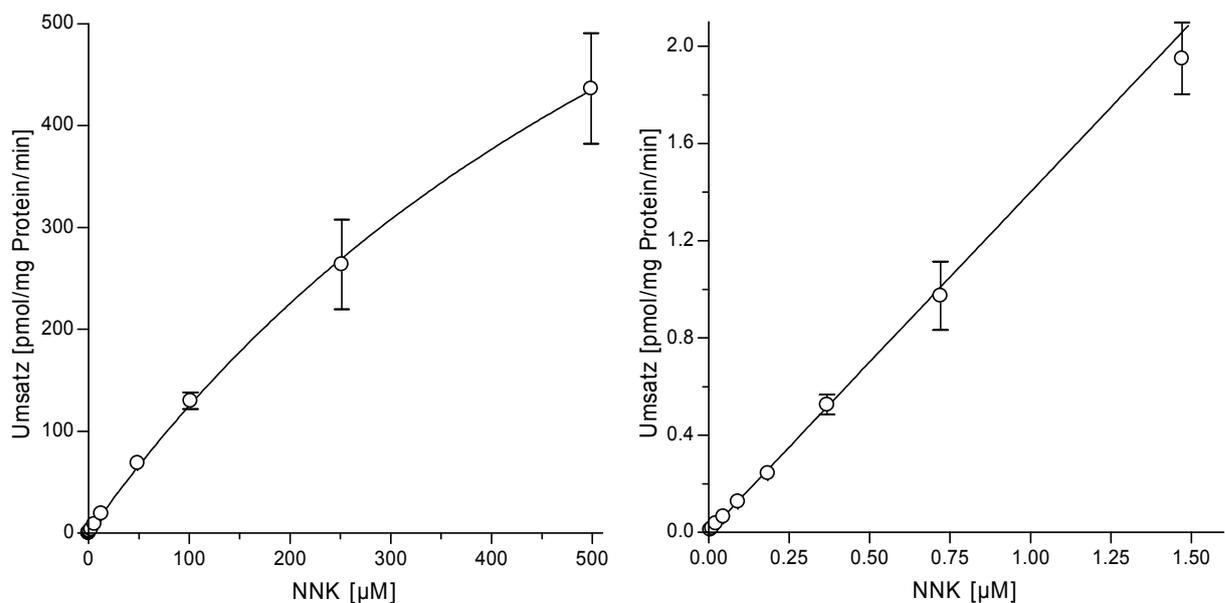


Abbildung 3-5 Lebermikrosomen: Michaelis-Menten-Kinetik von HPB (MW \pm SD; N = 3)

3.2.1.1.3 Ketosäure

Auch die Kinetik für die Ketosäurebildung konnte über den gesamten Konzentrationsbereich (6 nM - 499 μ M) mit k_m - und V_{max} -Werten von 1428 μ M und 6933 pmol/mg Protein/min angepasst werden und wich im niedrigen Konzentrationsbereich nicht davon ab (Abb. 3-6). Die katalytische Effizienz betrug 0,78.

3.2.1.1.4 Hydroxysäure

Die Anpassung der Kinetik für die Hydroxysäurebildung ergab für den gesamten Konzentrationsbereich (6 nM - 251 μ M) k_m - und V_{max} -Werte von 1452 μ M und 4185 pmol/mg/min

(Abb. 3-7). Eine Anpassung für den nanomolaren Bereich gelang für den Bereich 6 - 180 nM und ergab k_m - und V_{max} -Werte von 0,54 μM und 1,72 pmol/mg/min. Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigte sich eine Abweichung weniger Punkte von der Kurve des gesamten Konzentrationsbereichs. Ein Vergleich der katalytischen Effizienz in beiden Konzentrationsbereichen ergab einen geringen Unterschied, sie betrug über den gesamten Konzentrationsbereich 0,46 gegenüber 0,52 im nanomolaren Bereich.

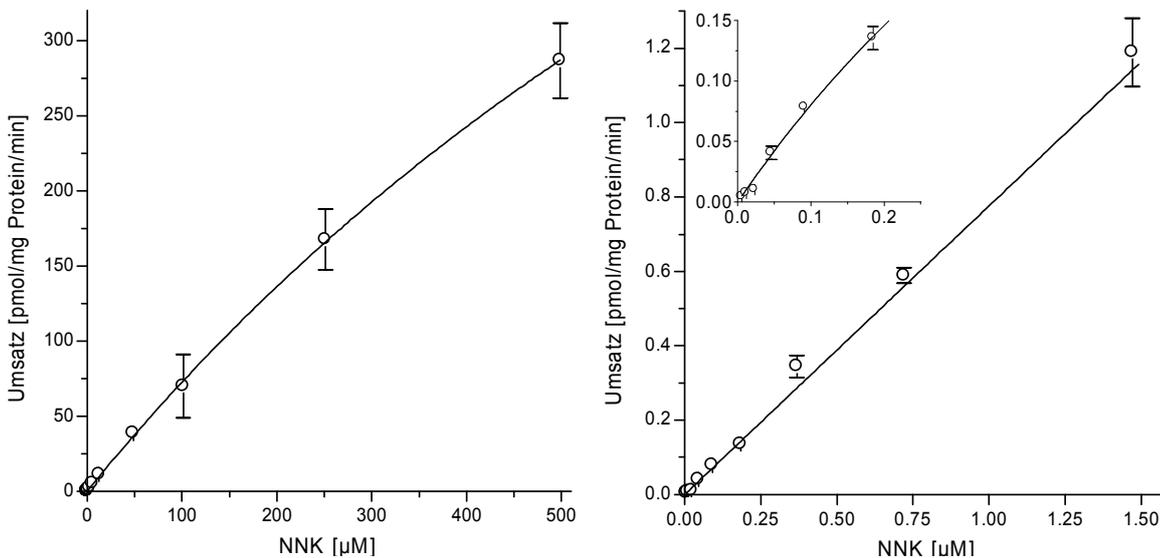


Abbildung 3-6 Lebermikrosomen: Michaelis-Menten-Kinetik von Ketosäure (MW \pm SD; N = 3)

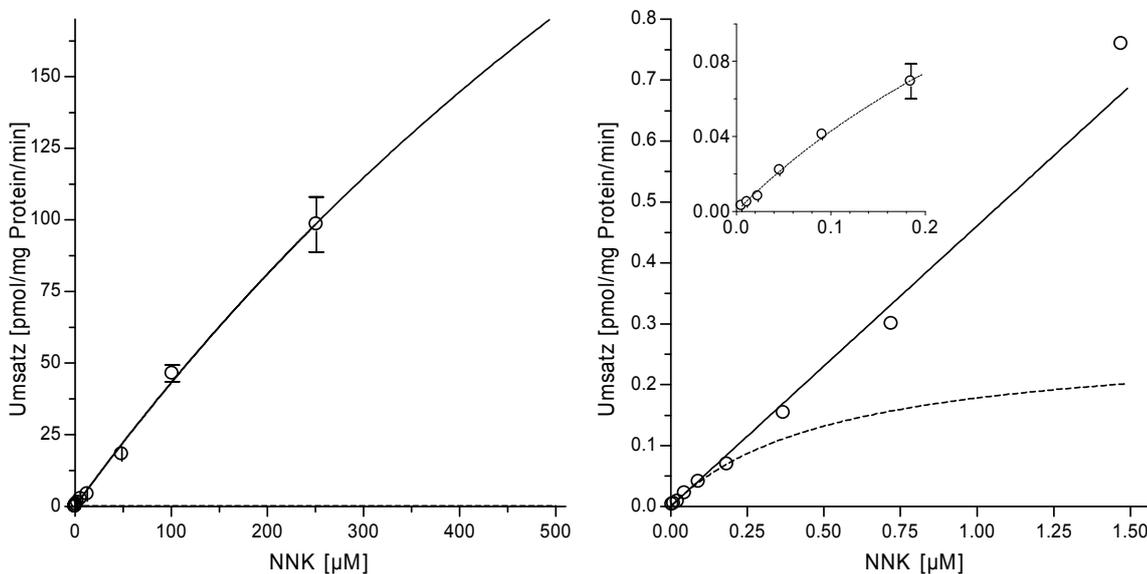


Abbildung 3-7 Lebermikrosomen: Michaelis-Menten-Kinetik von Hydroxysäure (MW \pm SD; N = 3)
(— gesamter Konzentrationsbereich; --- nanomolarer Konzentrationsbereich)

3.2.1.1.5 NNK-N-Oxid

Die Bildung von NNK-N-Oxid konnte über den gesamten Konzentrationsbereich von 23 nM bis 251 μM einer Kinetik mit k_m - und V_{max} -Werten von 1016 μM und 1773 pmol/mg/min

(Abb. 3-8) angepasst werden. Für den nanomolaren Bereich von 23 - 370 nM ergaben sich k_m - und V_{max} -Werte von 1,13 μM und 2,03 pmol/mg/min , die sich in der Abweichung weniger Punkte von der Kurve des gesamten Konzentrationsbereichs widerspiegelte. Die katalytische Effizienz unterschied sich mit 0,28 für den gesamten Konzentrationsbereich und 0,29 für den nanomolaren Bereich nicht.

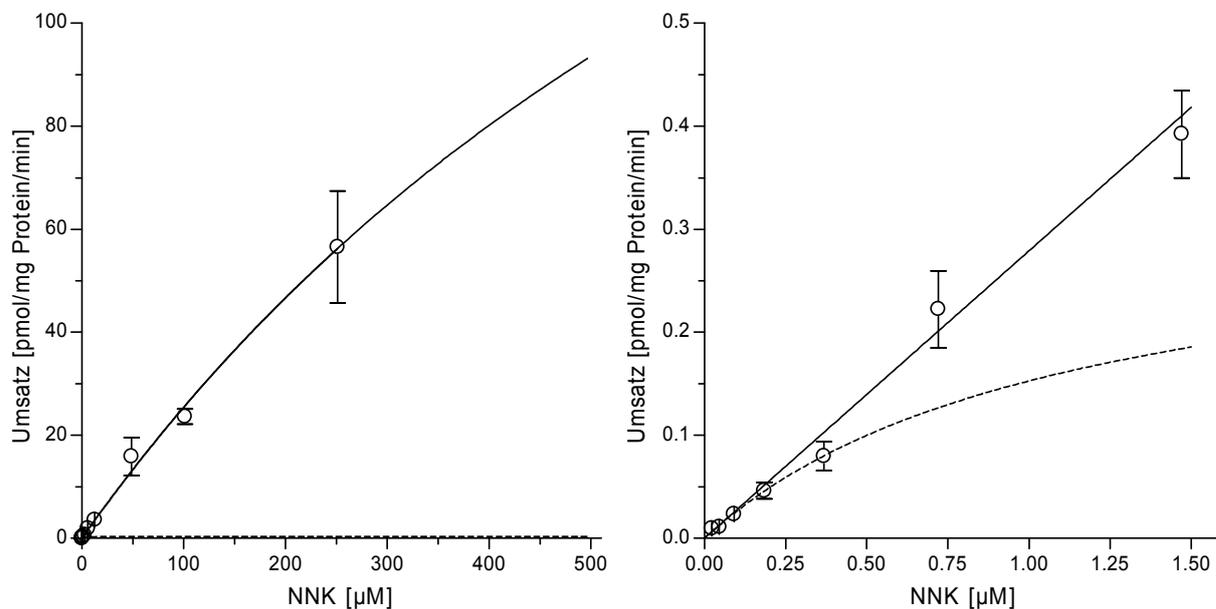


Abbildung 3-8 Lebermikrosomen: Michaelis-Menten-Kinetik von NNK-*N*-Oxid (MW \pm SD; N = 3) (— gesamter Konzentrationsbereich; --- nanomolarer Konzentrationsbereich)

Tabelle 3-3 k_m -Werte, V_{max} -Werte (MW \pm SE) und Mittelwerte der katalytischen Effizienz (V_{max}/k_m) in Abhängigkeit von der NNK-Konzentration und des Organs

Organ	Metabolit	Konzentration [µM]	k_m [µM]	V_{max} [pmol/mg/min]	V_{max}/k_m
Leber	NNAL	0,006 - 499	681 \pm 62	4954 \pm 295	7,3
		0,006 - 1,5	27 \pm 25	264 \pm 231	9,8
Lunge	NNAL	0,006 - 499	1136 \pm 99	5354 \pm 348	4,7
		0,006 - 1,5	23 \pm 18	122 \pm 89	5,3
Leber	Hydroxysäure	0,006 - 251	1452 \pm 797	670 \pm 320	0,46
		0,006 - 0,18	0,54 \pm 0,22	0,28 \pm 0,09	0,52
Lunge	Hydroxysäure	0,012 - 499	970 \pm 163	611 \pm 74	0,63
		0,012 - 0,37	33 \pm 218	16 \pm 104	0,48
Leber	Ketosäure	0,006 - 499	1428 \pm 319	1109 \pm 193	0,78
Lunge	Ketosäure	0,006 - 499	1425 \pm 384	647 \pm 136	0,45
Leber	NNK- <i>N</i> -Oxid	0,023 - 251	1016 \pm 759	284 \pm 176	0,28
		0,023 - 0,37	1,13 \pm 0,80	0,33 \pm 0,18	0,29
Lunge	NNK- <i>N</i> -Oxid	0,023 - 499	2224 \pm 1296	569 \pm 280	0,26
		0,023 - 1,5	2,35 \pm 0,86	0,59 \pm 0,15	0,25
Leber	HPB	0,006 - 499	820 \pm 150	1149 \pm 144	1,40

3.2.1.2 Lungenmikrosomen

Die Carbonylreduktion von NNK führte zu NNAL. Als Metaboliten der α -Methylenhydroxylierung von NNK und NNAL konnten bei den Lebermikrosomen Ketosäure bzw. Hydroxysäure nachgewiesen werden, für den Stoffwechselweg der *N*-Oxidation von NNK das NNK-*N*-Oxid (Abb. 3-9). Diol, HPB und NNAL-*N*-Oxid konnten hingegen nicht detektiert werden.

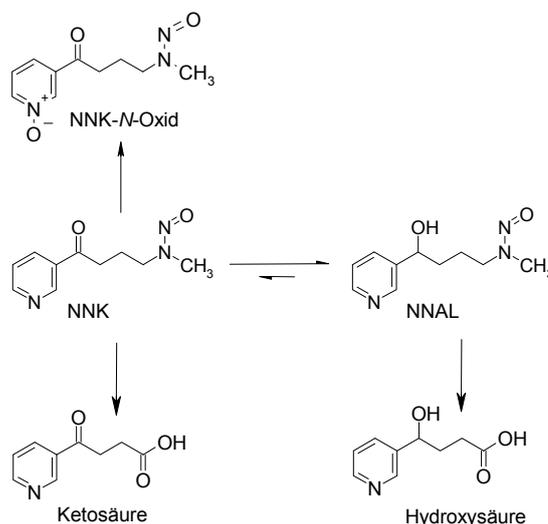


Abbildung 3-9 Metaboliten der Verstoffwechslung von NNK durch humane Lungenmikrosomen

Als Hauptmetabolit wurde zu 80-90% NNAL gebildet, gefolgt von Hydroxysäure (6-11%), Ketosäure (3-10%) und NNK-*N*-Oxid (3-5%). Eine Kinetik konnte für alle Metaboliten über den gesamten Konzentrationsbereich angepasst werden. Im nanomolaren Bereich gelang die Anpassung je nach Metabolit für einen größeren bzw. kleineren Konzentrationsbereich (Tab. 3-3).

3.2.1.2.1 NNAL

Die Anpassung der Kinetik ergab für den gesamten Konzentrationsbereich von 6 nM bis 499 μ M k_m - und V_{max} -Werte von 1136 μ M und 33460 pmol/mg/min (Abb. 3-10). Eine Anpassung für den nanomolaren Bereich gelang zwischen 6 nM und 1,5 μ M und ergab k_m - und V_{max} -Werte von 23 μ M und 761 pmol/mg/min. Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigte sich eine Abweichung der Punkte von der Kurve des gesamten Konzentrationsbereichs. Die katalytische Effizienz war mit 5,3 im nanomolaren Bereich gegenüber 4,7 im gesamten Konzentrationsbereich leicht erhöht.

3.2.1.2.2 Hydroxysäure

Die Anpassung der Kinetik der Hydroxysäure ergab für den gesamten Konzentrationsbereich (11,5 nM - 499 μ M) k_m - und V_{max} -Werte von 970 μ M und 3816 pmol/mg/min (Abb. 3-11). Eine Anpassung für den nanomolaren Bereich gelang für den Bereich 11,5 – 369 nM

und ergab einen k_m -Wert von 33 μM und einen V_{max} -Wert von 99 $\text{pmol}/\text{mg Protein}/\text{min}$. Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigte sich eine starke Abweichung der Punkte von der Kurve des gesamten Konzentrationsbereichs. Die katalytische Effizienz war im gesamten Konzentrationsbereich mit 0,63 gegenüber 0,48 im nanomolaren Bereich erhöht.

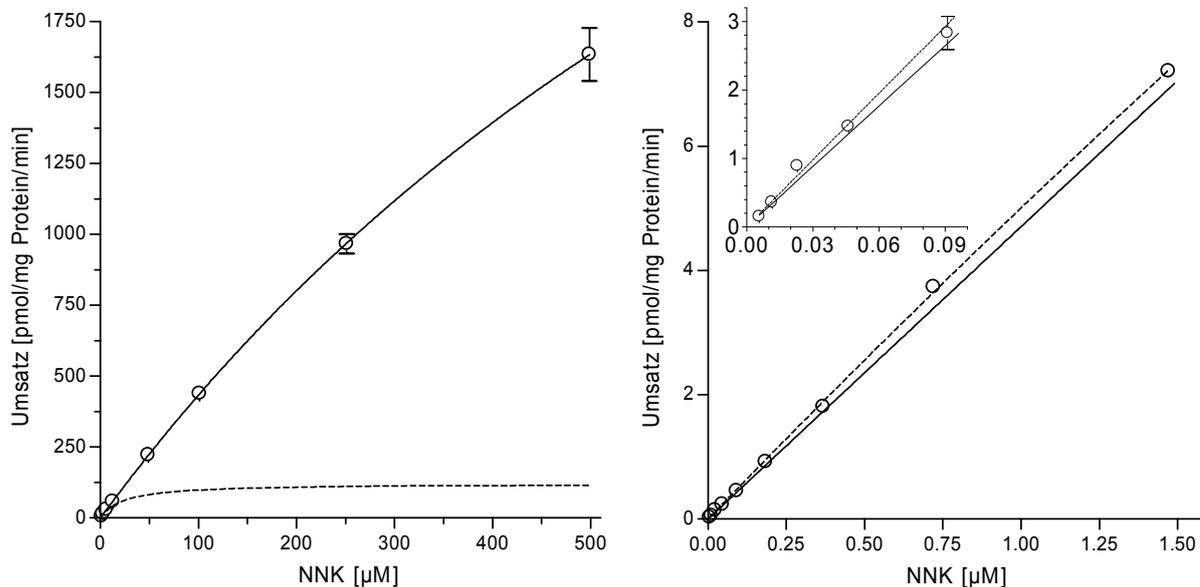


Abbildung 3-10 Lungenmikrosomen: Michaelis-Menten-Kinetik von NNAL (MW \pm SD; N = 3)
(— gesamter Konzentrationsbereich; --- nanomolarer Konzentrationsbereich)

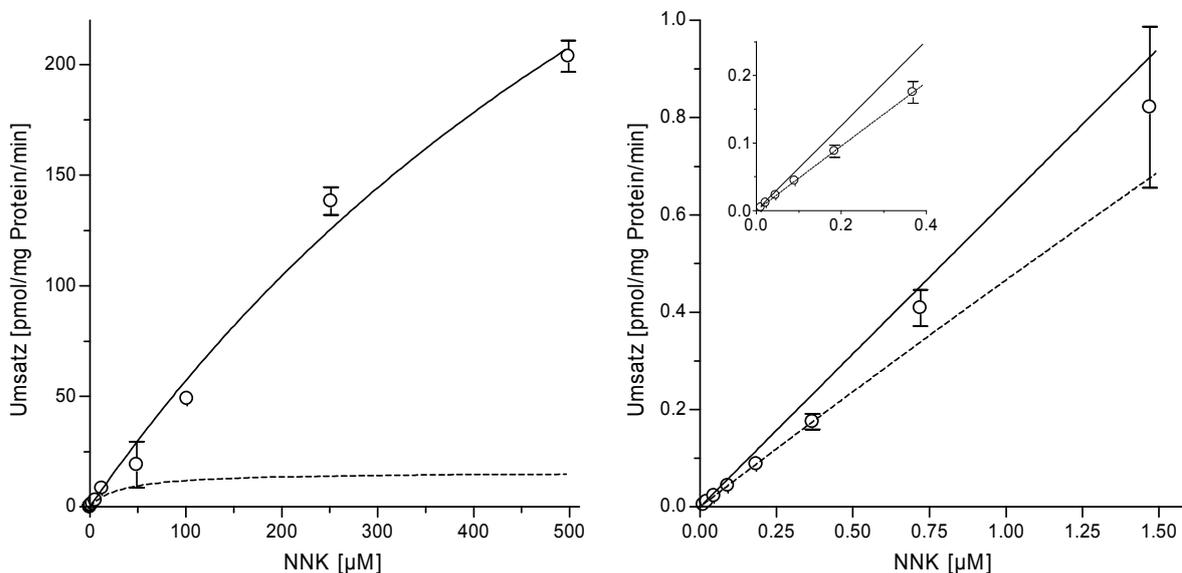


Abbildung 3-11 Lungenmikrosomen: Michaelis-Menten-Kinetik von Hydroxysäure (MW \pm SD; N = 3)
(— gesamter Konzentrationsbereich; --- nanomolarer Konzentrationsbereich)

3.2.1.2.3 Ketosäure

Die Bildung der Ketosäure konnte für den gesamten Konzentrationsbereich (6 nM – 499 μM) einer Kinetik mit k_m - und V_{max} -Werten von 1425 μM und 4042 $\text{pmol}/\text{mg}/\text{min}$

angepasst werden (Abb. 3-12). Im niedrigen Konzentrationsbereich ergab sich keine Abweichung, die katalytische Effizienz betrug 0,45.

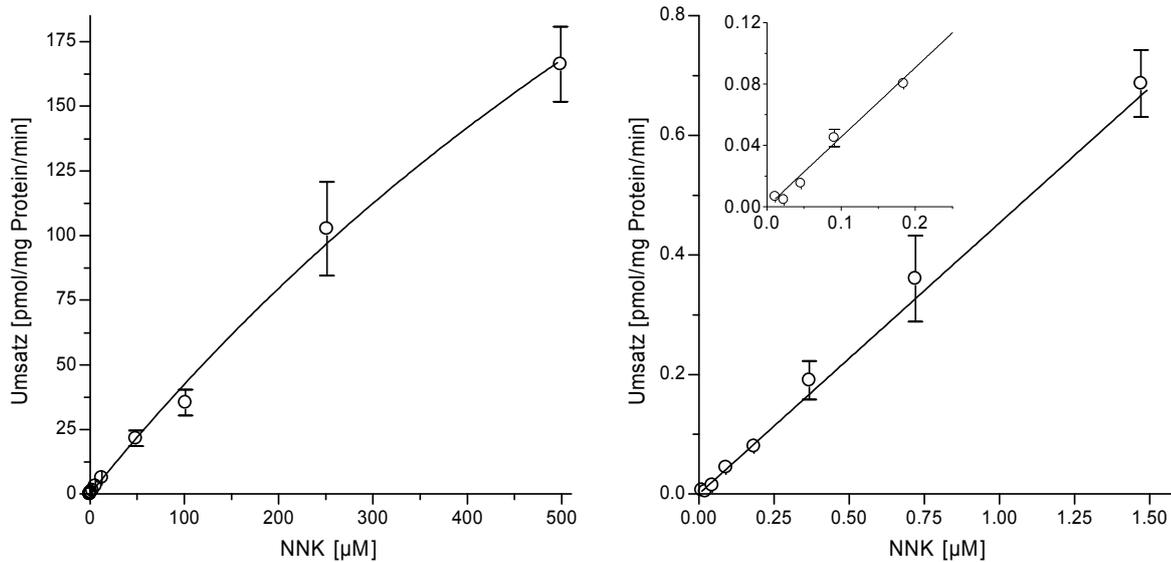


Abbildung 3-12 Lungenmikrosomen: Michaelis-Menten-Kinetik von Ketosäure (MW \pm SD; N = 3)

3.2.1.2.4 NNK-N-Oxid

Die Anpassung der Kinetik ergab für NNK-N-Oxid im gesamten Konzentrationsbereich (23 nM - 251 μ M) k_m - und V_{max} -Werte von 2224 μ M und 3554 pmol/mg/min (Abb. 3-13). Im nanomolaren Bereich von 23 nM bis 1,5 μ M wurden k_m - und V_{max} -Werte von 2,35 μ M und 3,66 pmol/mg/min errechnet. Im niedrigen Konzentrationsbereich wichen die Messwerte deutlich von der Kurve des gesamten Konzentrationsbereichs ab. Die katalytische Effizienz unterschied sich jedoch kaum, sie betrug über den gesamten Konzentrationsbereich 0,26 gegenüber 0,25 im nanomolaren Bereich.

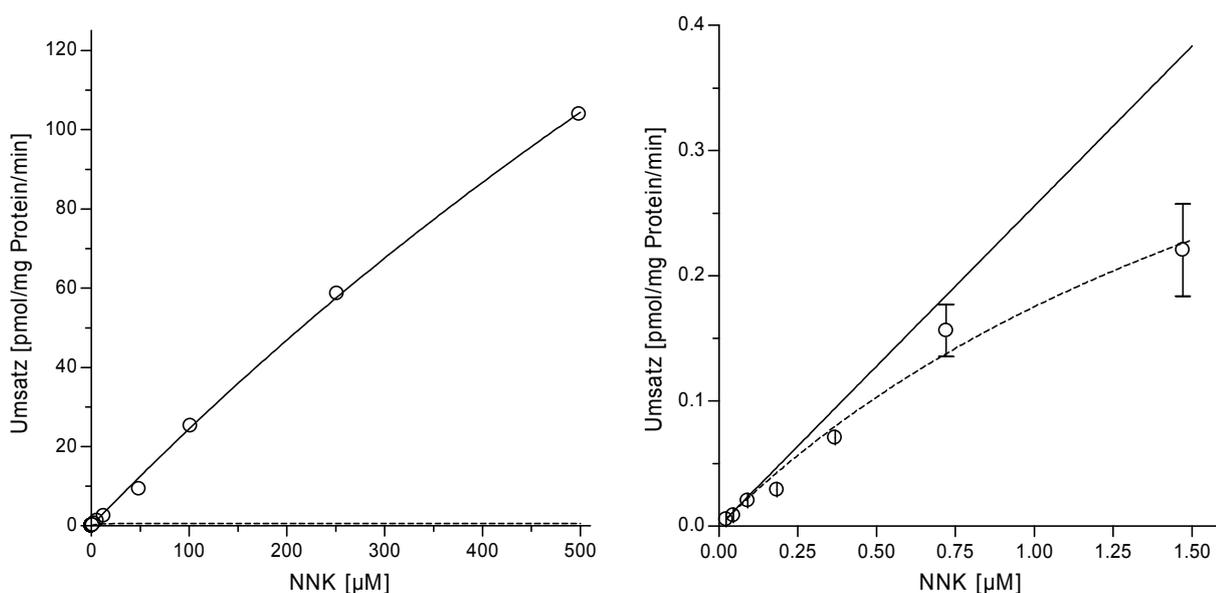


Abbildung 3-13 Lungenmikrosomen: Michaelis-Menten-Kinetik von NNK-N-Oxid (MW \pm SD; N = 3)
(— gesamter Konzentrationsbereich; --- nanomolarer Konzentrationsbereich)

3.2.2 Hemmversuche

Die Wirkung spezifischer Hemmstoffe auf den NNK-Metabolismus wurde in den humanen Leber- und Lungenmikrosomen bei je einer Konzentration aus dem nanomolaren und dem mikromolaren Bereich (46 nM bzw. 49 μ M NNK) mit 5 verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen untersucht.

Aus den Chromatogrammen wurde der prozentuale Flächenanteil jedes einzelnen Metaboliten sowie der Summe der Metaboliten der einzelnen Stoffwechselwege (Carbonylreduktion, α -Hydroxylierung, *N*-Oxidation) bestimmt (Tab. A4-27) und mittels gepaartem t-Test auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle geprüft.

3.2.2.1 Lebermikrosomen

3.2.2.1.1 Hemmung von CYP 1A1/2 durch α -Naphthoflavin (NF)

Der Gesamtmetabolismus von NNK wurde im nanomolaren Bereich bereits durch 1 μ M NF signifikant gehemmt, im mikromolaren Bereich deutlich schwächer und mit 86% der Kontrolle nur bei 5 μ M NF statistisch signifikant (Tab. 3-4). Am stärksten wurde der Stoffwechsel von 46 nM NNK bei 5 und 10 μ M NF um 29% und 36% der Kontrolle gehemmt. Von den NNK-Metaboliten war die Bildung von HPB am stärksten betroffen (Abb. 3-14), sie reduzierte sich bis auf ein Viertel (46 nM NNK) bzw. ein Drittel des Kontrollwertes (49 μ M NNK) und war durchgehend signifikant. Die anderen NNK-Metaboliten waren mit wenigen Ausnahmen nur im nanomolaren Bereich erniedrigt und Signifikanzniveau wurde frühestens ab 5 μ M NF (NNAL), oder nur bei 50 μ M NF (Hydroxysäure) erreicht.

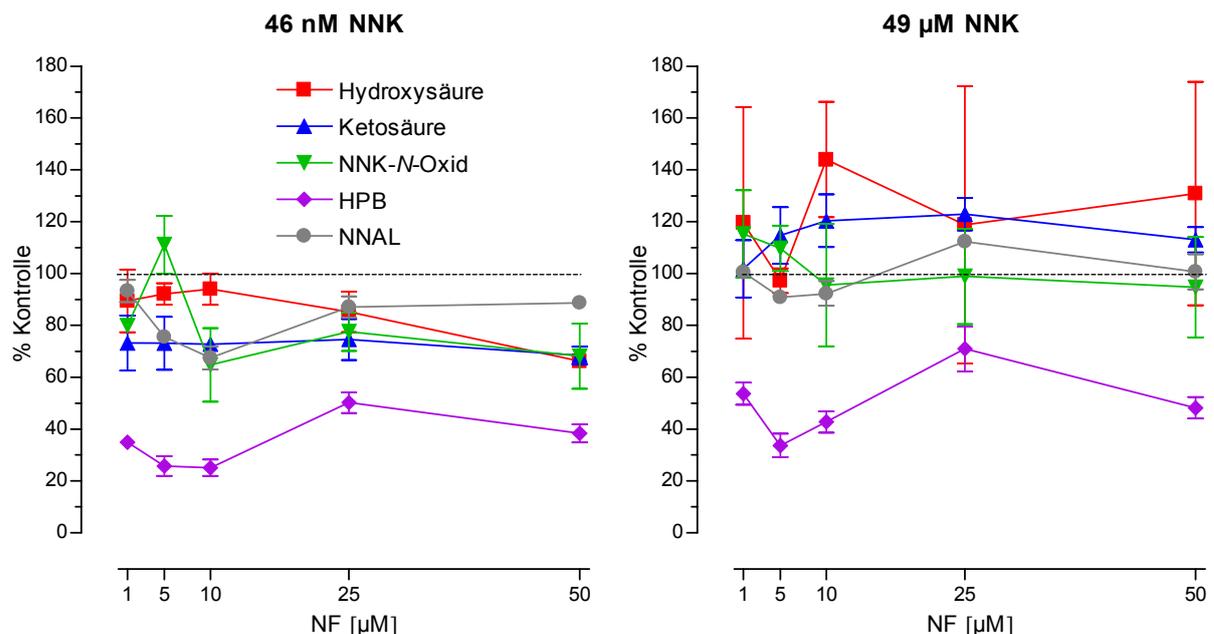


Abbildung 3-14 Lebermikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus durch NF; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-4 Lebermikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch NF bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Gesamt	84 / 0,05 96 / n.s.	71 / 0,001 86 / 0,05	64 / 0,01 91 / n.s.	81 / 0,01 108 / n.s.	80 / 0,001 96 / n.s.
Hydroxysäure	89 / n.s. 120 / n.s.	92 / n.s. 97 / n.s.	94 / n.s. 144 / 0,05	85 / n.s. 119 / n.s.	66 / 0,01 131 / n.s.
Ketosäure	73 / n.s. 102 / n.s.	73 / n.s. 115 / n.s.	73 / 0,05 120 / n.s.	75 / n.s. 123 / 0,05	68 / 0,05 113 / 0,05
NNK-N-Oxid	80 / 0,001 115 / n.s.	111 / n.s. 110 / n.s.	65 / n.s. 96 / n.s.	78 / n.s. 99 / n.s.	68 / n.s. 95 / n.s.
HPB	36 / 0,001 54 / 0,01	26 / 0,01 34 / 0,01	25 / 0,001 43 / 0,01	50 / 0,01 71 / 0,05	38 / 0,01 48 / 0,01
NNAL	93 / n.s. 100 / n.s.	76 / 0,001 91 / 0,05	67 / 0,01 92 / n.s.	87 / 0,05 112 / 0,01	89 / 0,01 101 / n.s.

Das Verhältnis der Hauptstoffwechselwege des NNK wurde durch NF signifikant zu Gunsten der Reduktion zu NNAL verschoben, der Anteil von NNAL nahm im nanomolaren Bereich um 5-11% und im mikromolaren Bereich um 2-5% zu (Abb. 3-15; Tab. 3-5). Die α -Hydroxylierung (Σ Alpha) von NNK wurde in Humanlebermikrosomen durch NF gehemmt. Der Effekt war jedoch nicht dosisabhängig und war bei 46 nM NNK mit 14-32% deutlicher ausgeprägt als bei 49 μ M NNK mit 5-18%. Die Veränderungen bei der N-Oxidation zeigten keine einheitliche Tendenz, eine statistisch signifikante Zunahme des Anteils um das 1,5-fache konnte bei der niedrigen NNK-Konzentration durch 5 μ M NF beobachtet werden.

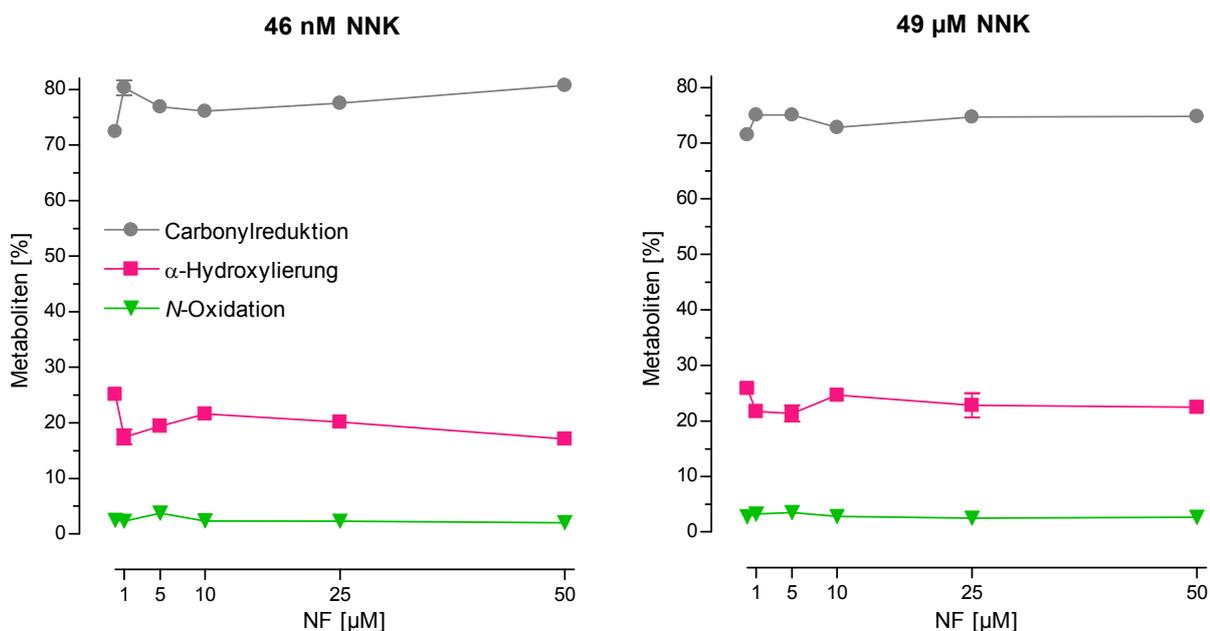


Abbildung 3-15 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von NF auf die Stoffwechselwege von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Die Darstellung der einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung zeigen bei beiden NNK-Konzentrationen ein qualitativ ähnliches Bild (Abb. 3-16; Tab. 3-5). Während sich bei NF-Konzentrationen von 5 und 10 μM NF der Anteil von HPB signifikant um 38-64% reduzierte, erhöhte sich in diesem Bereich der Anteil der Hydroxysäure zunehmend bis um das 1,6-fache und nahm mit weiter steigender InhibitorKonzentration wieder ab. Der Anteil der Ketosäure nahm bei 46 nM NNK nur mit 10 μM NF geringfügig zu und lag sonst auf oder leicht unter dem Niveau der Kontrolle, ohne dass statistische Signifikanz erreicht wurde. Mit 49 μM NNK erhöhte sich der Anteil der Ketosäure bei 5 und 10 μM NF um das 1,3-fache, der Effekt schwächte sich bei höheren Konzentrationen des Inhibitors wieder ab.

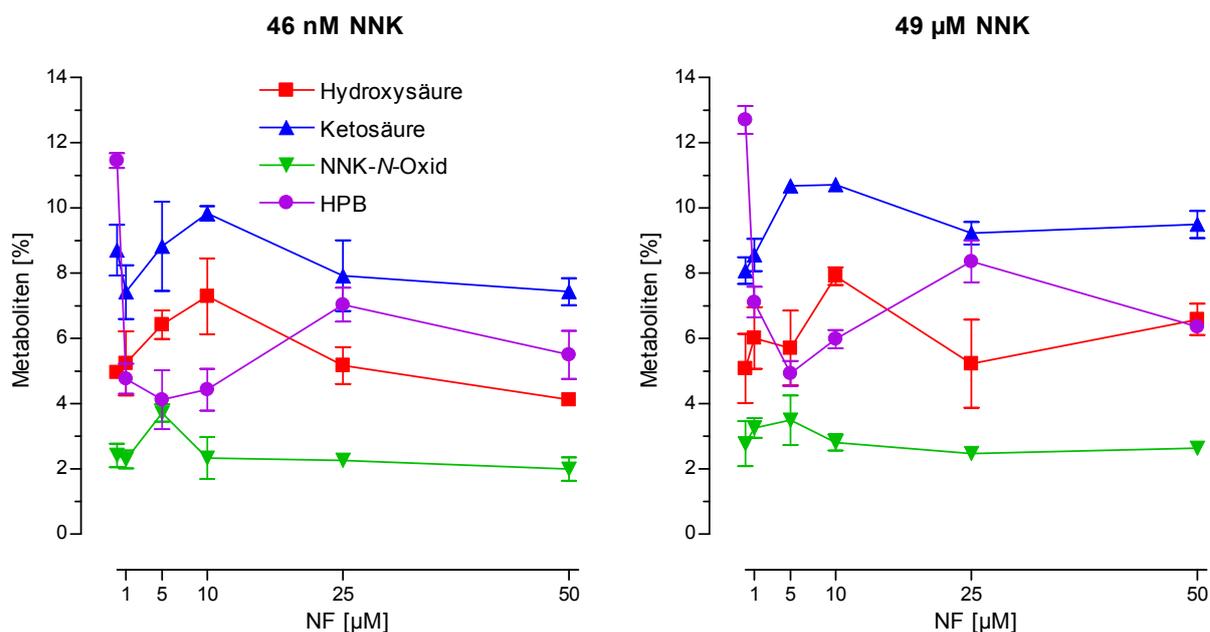


Abbildung 3-16 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von NF auf die Bildung der einzelnen Metaboliten von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-5 Lebermikrosomen: Einfluss von NF bei 46 nM NNK und 49 μM NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μM]	1	5	10	25	50
Hydroxysäure	105 / n.s. 124 / n.s.	130 / 0,05 112 / 0,05	147 / n.s. 160 / 0,05	104 / n.s. 109 / n.s.	83 / 0,05 134 / n.s.
Ketosäure	86 / n.s. 106 / n.s.	103 / n.s. 132 / 0,01	114 / n.s. 133 / 0,01	92 / n.s. 114 / 0,05	86 / n.s. 118 / n.s.
NNK-N-Oxid	95 / n.s. 121 / n.s.	156 / 0,05 127 / 0,05	99 / n.s. 105 / n.s.	95 / n.s. 93 / n.s.	85 / n.s. 100 / n.s.
HPB	42 / 0,01 56 / 0,01	36 / 0,01 39 / 0,01	39 / 0,01 47 / 0,01	62 / 0,01 66 / 0,05	48 / 0,01 50 / 0,01
NNAL	111 / 0,05 105 / n.s.	106 / 0,05 105 / 0,05	105 / 0,01 102 / 0,05	107 / 0,01 105 / n.s.	111 / 0,01 105 / 0,05
Σ Alpha	69 / 0,05 84 / n.s.	77 / 0,05 82 / 0,05	86 / 0,05 95 / n.s.	80 / 0,01 88 / n.s.	68 / 0,001 87 / 0,05

3.2.2.1.2 Hemmung von CYP 2A6 durch 8-Methoxypsoralen (MOP)

Der Gesamtmetabolismus von NNK wurde im mikromolaren Bereich bereits durch 1 μM MOP signifikant gehemmt, im nanomolaren Bereich deutlich schwächer und erst ab 25 μM MOP wurde statistische Signifikanz erreicht (Tab. 3-6). Bis 25 μM MOP zeigte sich keinerlei Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors. Bei 50 μM MOP nahm die Hemmung sprunghaft zu und war bei 46 nM NNK mit 32% stärker ausgeprägt als bei 49 μM NNK mit 27%. Von den einzelnen NNK-Metaboliten wurde die Bildung von HPB am stärksten gehemmt. Bereits 1 μM MOP hemmte den Umsatz von 46 nM und 49 μM NNK signifikant auf 37% bzw. 27% der Kontrolle (Abb. 3-17). Während im mikromolaren Bereich die Hemmung mit steigender Inhibitorkonzentration nicht weiter zunahm, zeigte sich im nanomolaren Bereich eine konzentrationsabhängige Abnahme. Bei 50 μM MOP konnte kein HPB mehr nachgewiesen werden. Die Bildung der Ketosäure war nur leicht um 9-21% gehemmt, bei der höchsten MOP-Konzentration allerdings um ein Viertel (49 μM NNK) bis ein Drittel (46 nM NNK). Die Bildung von NNAL und seinem Aktivierungsprodukt Hydroxysäure schwankte bei beiden NNK-Konzentrationen. Auch der Einfluss auf die NNK-*N*-Oxid-Bildung war uneinheitlich, bei 46 nM NNK lag die Bildungsrate leicht über Ausgangsniveau mit Ausnahme von 10 und 25 μM MOP, dort wurde eine Hemmung um 39 bzw. 78% erreicht. Im mikromolaren Bereich lag die Bildungsrate unterhalb des Ausgangsniveaus, eine signifikante Hemmung um 42 bzw. 44% wurde mit 25 bzw. 50 μM MOP beobachtet.

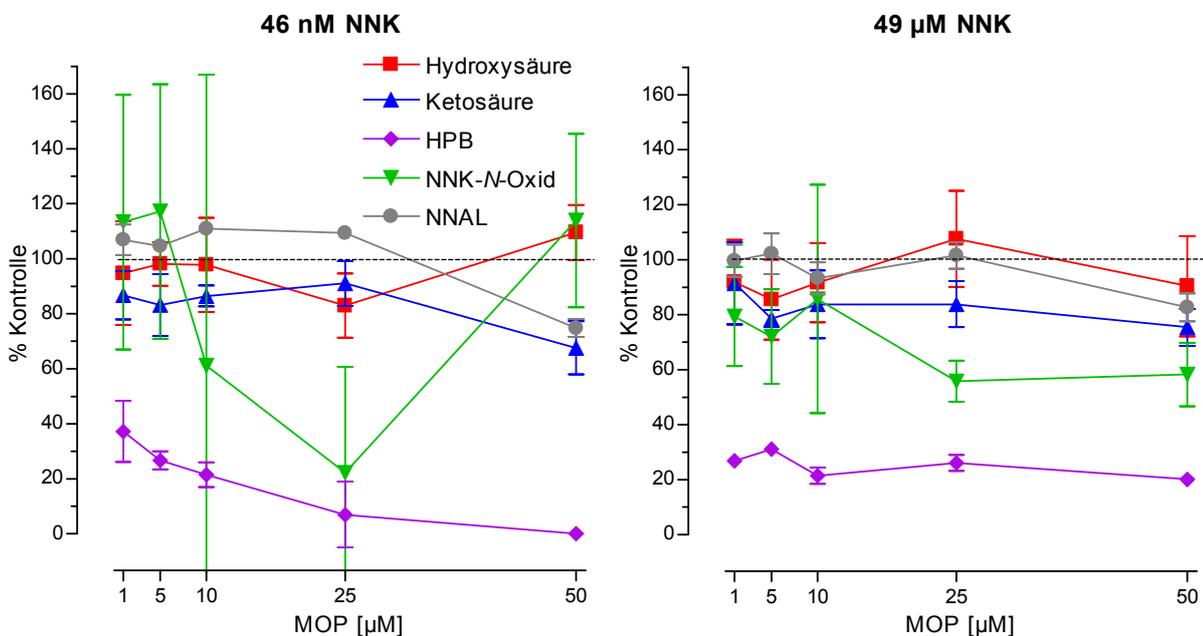
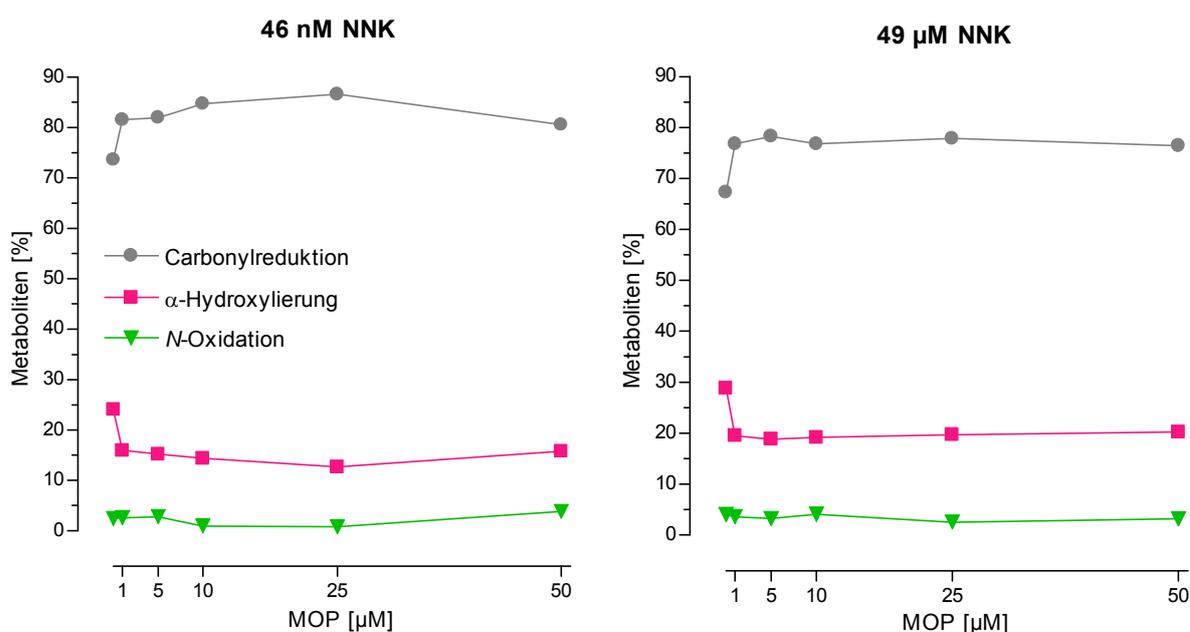


Abbildung 3-17 Lebermikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus durch MOP; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-6 Lebermikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch MOP bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Gesamt	97 / n.s. 87 / 0,05	94 / n.s. 88 / 0,05	96 / n.s. 82 / 0,05	93 / 0,05 88 / 0,05	68 / 0,01 73 / 0,01
Hydroxysäure	95 / n.s. 92 / n.s.	98 / n.s. 86 / n.s.	98 / n.s. 92 / n.s.	83 / n.s. 108 / n.s.	110 / n.s. 90 / n.s.
Ketosäure	87 / n.s. 91 / n.s.	83 / n.s. 79 / 0,01	86 / 0,05 84 / n.s.	91 / n.s. 84 / n.s.	68 / 0,05 75 / 0,05
NNK-N-Oxid	113 / n.s. 79 / n.s.	117 / n.s. 72 / n.s.	61 / n.s. 86 / n.s.	22 / n.s. 56 / 0,01	114 / n.s. 58 / 0,05
HPB	37 / 0,05 27 / 0,01	27 / 0,01 31 / 0,01	22 / 0,01 21 / 0,01	7 / 0,01 26 / 0,001	0 / 0,01 20 / 0,01
NNAL	107 / n.s. 100 / n.s.	105 / n.s. 102 / n.s.	111 / 0,05 93 / n.s.	109 / 0,05 102 / n.s.	75 / 0,01 83 / 0,05

Bei beiden NNK-Konzentrationen nahm die Carbonylreduktion zu NNAL signifikant zu, im nanomolaren Bereich um 9-18% und im mikromolaren Bereich um 14-16%. Der Anteil der α -Hydroxylierung wurde signifikant reduziert, bei 46 nM NNK war dies mit 34-48% stärker ausgeprägt als bei 49 μ M NNK mit 30-36% (Abb. 3-18, Tab. 3-7). Die N-Oxidation verlief uneinheitlich. Im nanomolaren Bereich lag der Anteil der N-Oxidation über dem Kontrollwert mit Ausnahme einer Hemmung um 39 bzw. 76% bei 10 bzw. 25 μ M MOP. Im mikromolaren Bereich lag der Anteil um 9-20% unterhalb des Kontrollwertes, mit Ausnahme einer Steigerung um 4% bei 10 μ M MOP und einer stärkeren Hemmung um 36% bei 25 μ M MOP.

Abbildung 3-18 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von MOP auf die Stoffwechselwege von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Die Daten der einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung zeigen bei beiden NNK-Konzentrationen ein ähnliches Bild (Abb. 3-19). Der Anteil an HPB wurde signifikant gehemmt. Bei 46 nM NNK nahm die Hemmung in Abhängigkeit der MOP-Konzentration zu, bei 50 μ M MOP konnte kein HPB mehr detektiert werden. Bei 49 μ M NNK wurde die HPB-Bildung um 65-74% gehemmt, ohne dass eine Steigerung der Hemmung in Abhängigkeit der MOP-Konzentration auftrat (Tab. 3-7). Der Einfluss von MOP auf die Bildung von Hydroxysäure und Ketosäure schwankte sowohl im nano- als auch im mikromolaren Bereich und zeigte keine Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration. Die Hemmung war bei der Hydroxysäure etwas stärker ausgeprägt.

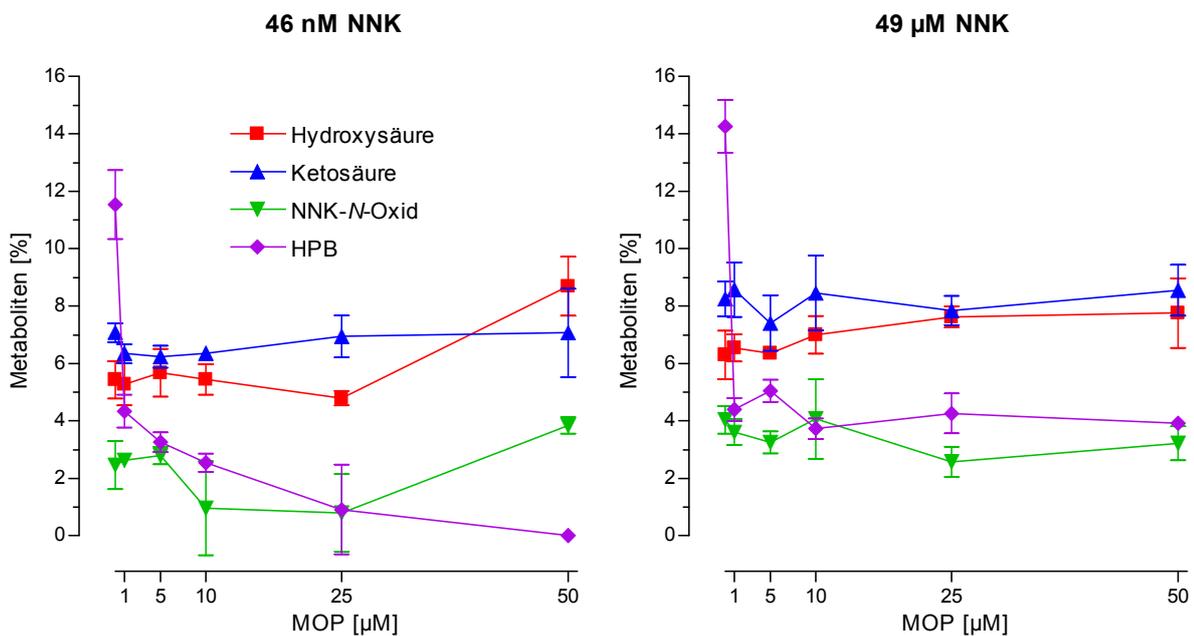


Abbildung 3-19 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von MOP auf die Bildung der einzelnen Metaboliten von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-7 Lebermikrosomen: Einfluss von MOP bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / $p <$

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Hydroxysäure	99 / n.s. 106 / n.s.	104 / n.s. 98 / n.s.	101 / n.s. 113 / n.s.	89 / 0,05 123 / n.s.	160 / 0,05 125 / n.s.
Ketosäure	90 / n.s. 104 / n.s.	88 / n.s. 90 / n.s.	90 / 0,05 103 / n.s.	98 / n.s. 95 / n.s.	99 / n.s. 104 / n.s.
NNK-N-Oxid	119 / n.s. 91 / n.s.	125 / n.s. 82 / n.s.	61 / n.s. 104 / n.s.	24 / n.s. 64 / 0,05	168 / 0,05 80 / n.s.
HPB	38 / 0,05 31 / 0,01	28 / 0,01 35 / 0,01	22 / 0,01 26 / 0,01	7 / 0,01 30 / 0,001	0 / 0,01 28 / 0,01
NNAL	111 / 0,01 114 / 0,05	111 / 0,01 116 / 0,05	115 / 0,01 114 / 0,01	118 / 0,01 116 / 0,01	109 / 0,001 114 / 0,01
Σ Alpha	66 / 0,01 68 / 0,01	63 / 0,05 64 / 0,01	60 / 0,01 67 / 0,05	52 / 0,01 68 / 0,01	66 / 0,001 70 / 0,05

3.2.2.1.3 Hemmung von CYP 2E1 durch Chlorzoxazon (CZ)

Der Gesamtmetabolismus von NNK wurde im nanomolaren Bereich durch 1-10 μM CZ um 10-14% signifikant gehemmt, bei 25 und 50 μM CZ nahm der Metabolismus wieder zu und lag auf Ausgangsniveau. Im mikromolaren Bereich blieb die Hemmung bei 7-11% und erreichte bei 1, 25 und 50 μM Signifikanz (Tab. 3-8). Von den einzelnen NNK-Metaboliten war die Bildung von HPB und Ketosäure am stärksten gehemmt. Bereits 1 μM CZ hemmte die Bildung von HPB signifikant um 48% und 39% im nanomolaren bzw. mikromolaren Bereich (Abb. 3-20). Bei beiden NNK-Konzentrationen nahm die Hemmung mit steigender CZ-Konzentration bis auf 58% bei 50 μM CZ zu. Die Bildung der Ketosäure wurde im nanomolaren Bereich stärker gehemmt als im mikromolaren Bereich. Bei 46 nM NNK war die Hemmung bei allen CZ-Konzentrationen mit 35-55% signifikant, zeigte aber keine Konzentrationsabhängigkeit. Bei 49 μM NNK nahm die Hemmung durch CZ zunächst kontinuierlich zu und blieb ab 10 μM CZ gleich bleibend signifikant bei 32-37%. Die Bildung von NNAL nahm bei 46 nM NNK zuerst um 5-7% ab und überstieg ab 25 μM CZ um 8% den Kontrollwert. Bei 49 μM zeigte der Einfluss von CZ keine Regelmäßigkeit. Für die Metaboliten Hydroxysäure und NNK-*N*-Oxid ergab sich bei den beiden NNK-Konzentrationen ein unterschiedliches Bild. Unabhängig von der CZ-Konzentration war bei 46 nM NNK die Bildung von Hydroxysäure und NNK-*N*-Oxid um 6-13% bzw. 30-43% gesteigert, bei 49 μM NNK dagegen um 5-20% bzw. 2-16% vermindert. Statistische Signifikanz wurde nur zum Teil erreicht.

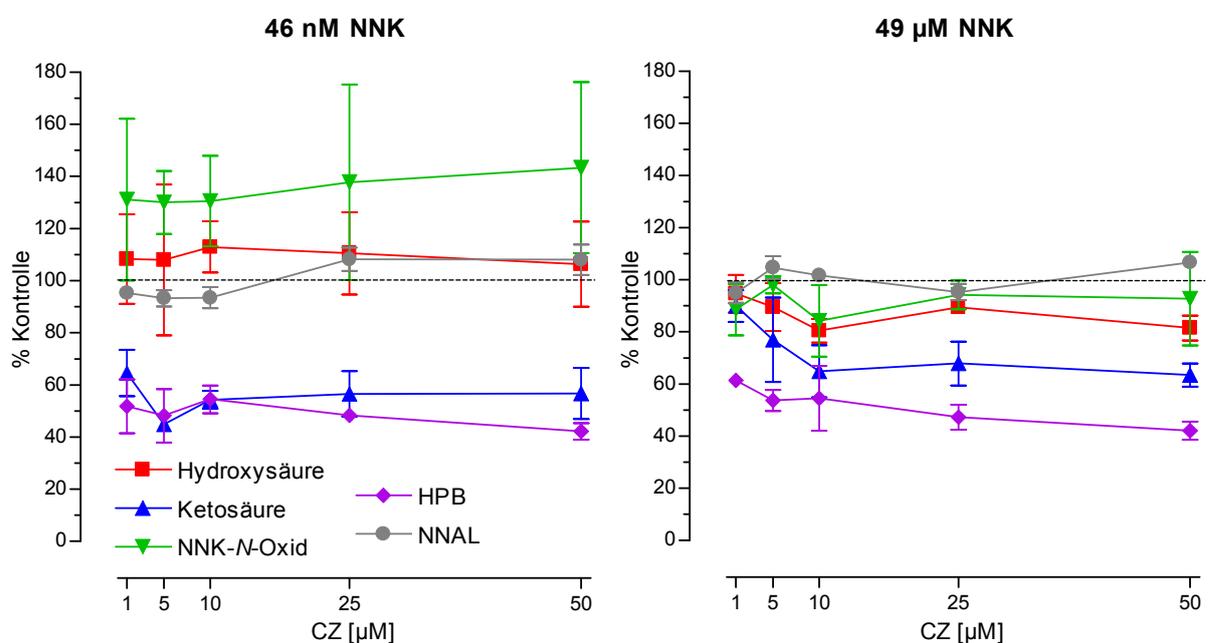


Abbildung 3-20 Lebermikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus durch CZ; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-8 Lebermikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch CZ bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Gesamt	90 / 0,01 89 / 0,05	86 / 0,05 93 / n.s.	88 / 0,05 89 / n.s.	98 / n.s. 86 / 0,05	97 / n.s. 91 / 0,05
Hydroxysäure	108 / n.s. 95 / n.s.	108 / n.s. 90 / n.s.	113 / n.s. 80 / 0,05	111 / n.s. 89 / 0,05	106 / n.s. 81 / 0,05
Ketosäure	65 / 0,05 90 / n.s.	45 / 0,01 77 / n.s.	54 / 0,01 65 / 0,05	57 / 0,05 68 / 0,05	57 / 0,05 63 / 0,05
NNK-N-Oxid	131 / n.s. 89 / n.s.	130 / 0,05 98 / n.s.	131 / n.s. 84 / n.s.	138 / n.s. 94 / n.s.	143 / 0,05 93 / n.s.
HPB	52 / 0,05 61 / 0,01	48 / 0,05 54 / 0,01	54 / 0,01 55 / 0,01	48 / 0,01 47 / 0,01	42 / 0,01 42 / 0,01
NNAL	95 / 0,05 95 / n.s.	93 / n.s. 105 / n.s.	93 / n.s. 102 / n.s.	108 / n.s. 95 / n.s.	108 / n.s. 107 / 0,05

Die Reduktion von NNK zu NNAL nahm unter Einfluss von CZ im nanomolaren und mikromolaren Bereich um 6-11% bzw. 6-17% signifikant zu (Abb. 3-21; Tab. 3-9). Die α -Hydroxylierung von NNK wurde dosisabhängig durch CZ im nanomolaren und mikromolaren Bereich um 20-34% bzw. 12-35% signifikant gehemmt und war bei 50 μ M CZ am stärksten ausgeprägt. Die N-Oxidation nahm bei 46 nM NNK um das bis zu 1,5-fache zu, bei 49 μ M NNK blieb der Anteil dieses Stoffwechselweges auf Ausgangsniveau.

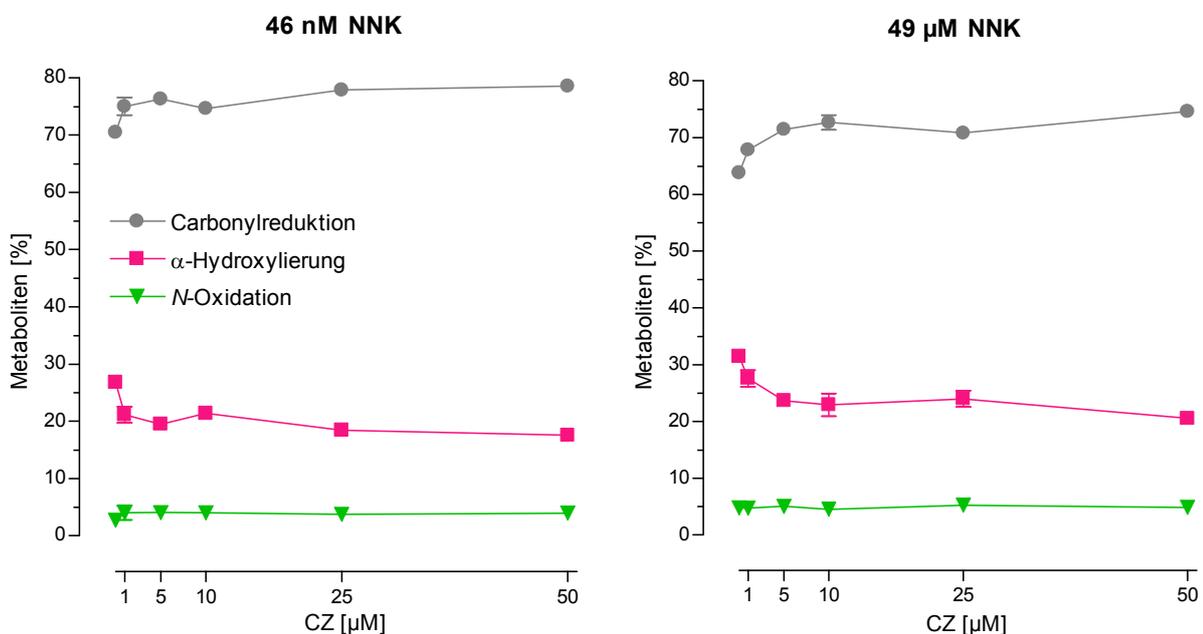


Abbildung 3-21 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von CZ auf die Stoffwechselwege von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Die Darstellung der einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung zeigt bei beiden NNK-Konzentrationen ein ähnliches Bild (Abb. 3-22; Tab. 3-9). Der Anteil von HPB reduzierte sich

bei 46 nM NNK signifikant um 38-56%, bei 49 µM um 31-54%. Der Anteil der Ketosäure verringerte sich im nanomolaren Bereich statistisch signifikant um 28-48%, im mikromolaren Bereich war die Hemmung mit 18-31% schwächer ausgeprägt und setzte erst ab 5 µM CZ ein und war nur bei 10 und 50 µM CZ signifikant. Für die Bildung von Hydroxysäure ergaben sich Unterschiede zwischen den Konzentrationsbereichen. Mit 46 nM NNK nahm der Anteil an Hydroxysäure signifikant um 10-28% zu, der Anstieg war bei 1-10 µM CZ am stärksten ausgeprägt. Bei 49 µM NNK schwankte die Bildung der Hydroxysäure von -10% bis +6% um den Kontrollwert. Die geringfügigen Unterschiede erreichten mit Ausnahme von 50 µM CZ Signifikanz.

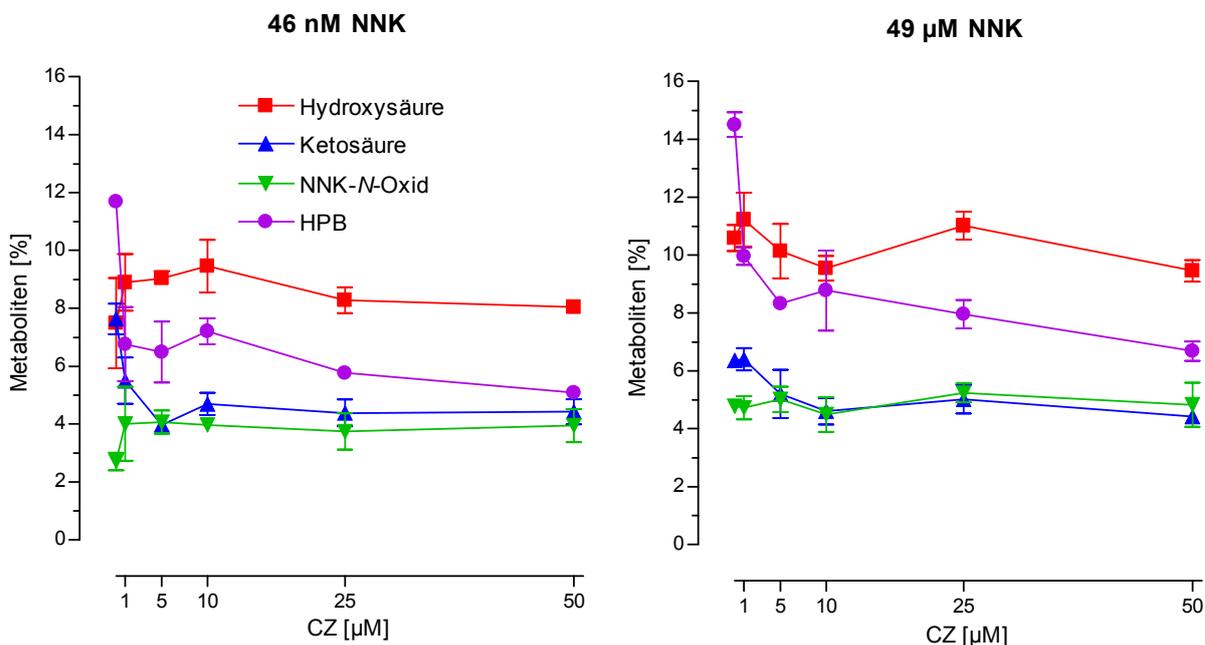


Abbildung 3-22 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von CZ auf die Bildung der einzelnen Metaboliten von NNK (MW ± SD; N = 3)

Tabelle 3-9 Lebermikrosomen: Einfluss von CZ bei 46 nM NNK und 49 µM NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [µM]	1	5	10	25	50
Hydroxysäure	121 / n.s. 106 / 0,01	124 / n.s. 96 / 0,01	128 / 0,05 90 / 0,001	113 / n.s. 104 / 0,05	110 / n.s. 90 / n.s.
Ketosäure	72 / 0,05 101 / n.s.	52 / 0,05 82 / n.s.	62 / 0,01 72 / 0,05	58 / 0,05 79 / n.s.	58 / 0,05 69 / 0,01
NNK-N-Oxid	146 / n.s. 99 / n.s.	151 / 0,01 105 / n.s.	149 / 0,05 94 / n.s.	141 / n.s. 110 / n.s.	149 / n.s. 101 / n.s.
HPB	58 / 0,05 69 / 0,01	56 / 0,05 57 / 0,01	62 / 0,01 61 / 0,05	49 / 0,001 55 / 0,01	44 / 0,001 46 / 0,01
NNAL	106 / 0,05 106 / 0,05	108 / 0,05 112 / 0,001	106 / 0,01 114 / 0,05	111 / 0,05 111 / 0,05	111 / 0,01 117 / 0,01
Σ Alpha	79 / 0,01 88 / 0,05	73 / 0,05 75 / 0,001	80 / 0,001 73 / 0,05	69 / 0,001 76 / 0,05	66 / 0,01 65 / 0,001

3.2.2.1.4 Hemmung von CYP 3A4/5 durch Troleandomycin (TAO)

Der Gesamtmetabolismus von NNK wurde im mikromolaren Bereich durch TAO signifikant um 12-20% gehemmt, am stärksten bereits bei 1 μM TAO. Im nanomolaren Bereich blieb der Umsatz bis 10 μM TAO auf Ausgangsniveau, eine nicht signifikante Hemmung um 8 bzw. 9% setzte erst bei 25 und 50 μM TAO ein (Tab. 3-10). Von den einzelnen NNK-Metaboliten wurde die Bildung von HPB am stärksten gehemmt. Bereits 1 μM TAO hemmte den Umsatz von 46 nM und 49 μM NNK signifikant um 55 bzw. 49% (Abb. 3-23). Mit steigender TAO-Konzentration konnte keine weitere Zunahme der Hemmung beobachtet werden. Die Ketosäurebildung war bei 46 nM NNK mit 15-35% ausgeprägter gehemmt als bei 49 μM NNK mit 10-33%. Im nanomolaren Bereich wurde die stärkste Hemmung mit 25 μM TAO, im mikromolaren Bereich mit 10 μM TAO erzielt. Die Bildung von NNAL und seinem Aktivierungsprodukt Hydroxysäure verlief bei beiden NNK-Konzentrationen unter Einfluss von TAO unterschiedlich. Im nanomolaren Bereich war die Bildung der Hydroxysäure um 6-36% erhöht oder blieb auf Ausgangsniveau, es wurde um 4-11% mehr NNAL gebildet. Im mikromolaren Bereich wurde dagegen die Hydroxysäurebildung um 11-29% gehemmt bzw. blieb nahezu auf Ausgangsniveau, NNAL wurde um 4-11% weniger gebildet. Der Umsatz zu NNK-N-Oxid war bei beiden NNK-Konzentrationen bereits durch 1 μM TAO um 24 bzw. 33% gehemmt, stieg dann aber wieder mit höheren TAO-Konzentrationen auf 92 bzw. 83% der Kontrolle an. Bei 46 nM NNK nahm die Hemmung ab 25 μM TAO, bei 49 μM NNK ab 50 μM TAO wieder auf 45 bzw. 75% der Kontrolle zu.

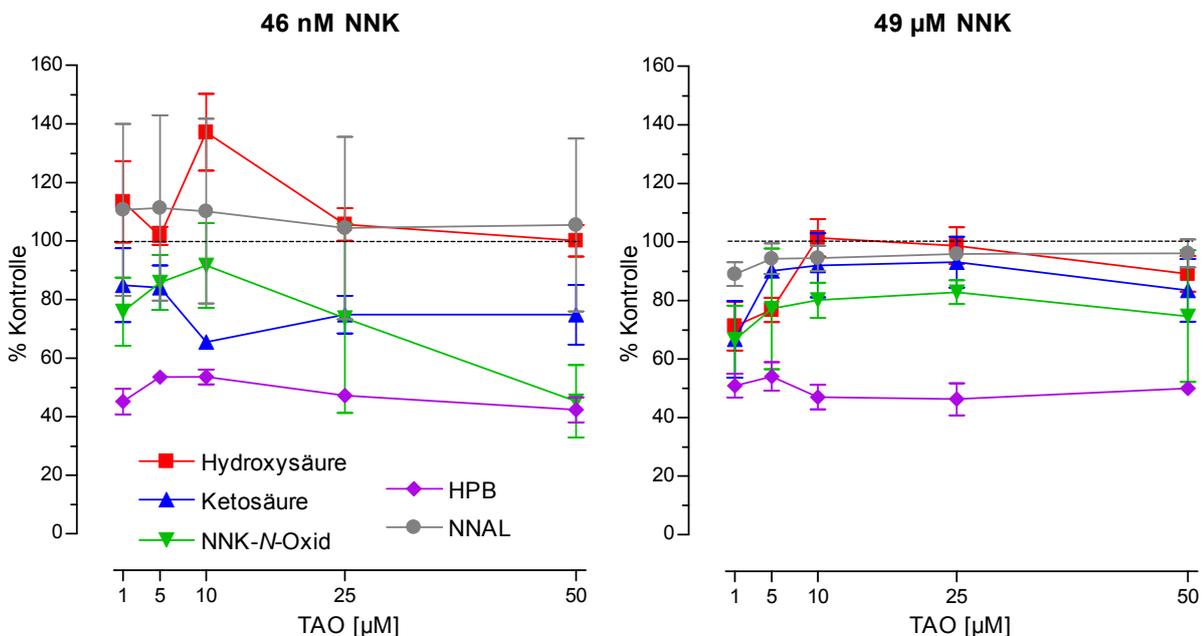
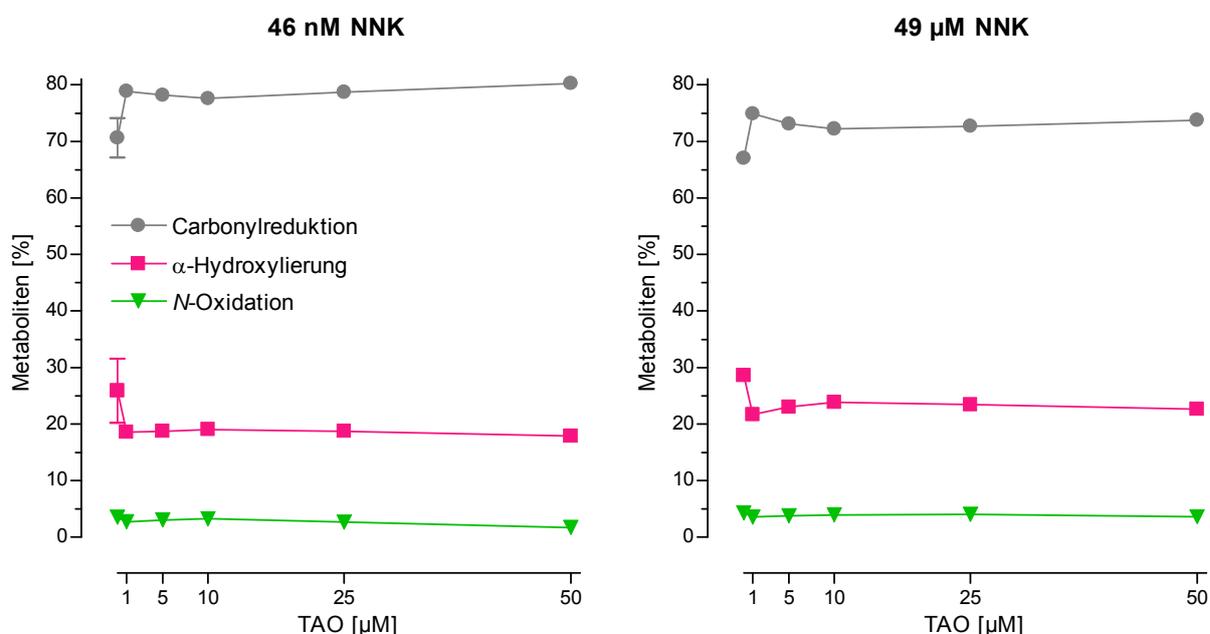


Abbildung 3-23 Lebermikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus durch TAO; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-10 Lebermikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch TAO bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Gesamt	98 / n.s. 80 / 0,05	99 / n.s. 86 / 0,05	99 / n.s. 88 / 0,05	92 / n.s. 88 / 0,01	91 / n.s. 87 / 0,05
Hydroxysäure	113 / n.s. 71 / 0,05	102 / n.s. 77 / 0,05	136 / 0,05 101 / n.s.	106 / n.s. 99 / n.s.	100 / n.s. 89 / n.s.
Ketosäure	85 / n.s. 67 / n.s.	84 / n.s. 90 / 0,05	65 / 0,001 92 / n.s.	75 / 0,05 93 / n.s.	75 / n.s. 83 / n.s.
NNK-N-Oxid	76 / n.s. 67 / n.s.	86 / n.s. 77 / n.s.	92 / n.s. 80 / 0,05	74 / n.s. 83 / 0,05	45 / n.s. 75 / n.s.
HPB	45 / 0,01 51 / 0,01	54 / 0,001 54 / 0,01	54 / 0,01 47 / 0,01	47 / 0,01 46 / 0,01	42 / 0,01 50 / 0,01
NNAL	111 / n.s. 89 / n.s.	111 / n.s. 94 / n.s.	110 / n.s. 94 / n.s.	104 / n.s. 96 / n.s.	105 / n.s. 96 / n.s.

Bei beiden NNK-Konzentrationen nahm die NNAL-Bildung zu. Im nanomolaren Bereich erhöhte sich der Anteil nicht signifikant um 10-14%, im mikromolaren Bereich signifikant um 8-12%. Die α -Hydroxylierung nahm um 19-24% bei 46 nM NNK und signifikant um 19-24% bei 49 μ M NNK ab. (Abb. 3-24, Tab. 3-11). Der Anteil N-Oxidation nahm bei beiden NNK-Konzentrationen mit 1 μ M TAO um 22% (46 nM NNK) bzw. 17% (49 μ M NNK) ab, stieg dann wieder auf 94% der Kontrolle an und nahm erst ab 25 μ M TAO auf 50% der Kontrolle (46 nM NNK) bzw. ab 50 μ M TAO auf 15% der Kontrolle (49 μ M NNK) ab.

Abbildung 3-24 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von TAO auf die Stoffwechselwege von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Die Daten der einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung zeigen, dass sich der Anteil an HPB weitgehend unabhängig von der TAO-Konzentration im nano- und mikromolaren Bereich um 44-53% bzw. 36-48% verringerte (Abb. 3-25, Tab. 3-11). Der Anteil an Hydroxysäure nahm bei 46 nM NNK um 5-19% zu. Bei 49 μ M NNK war der Anteil mit 1 und 5 μ M TAO um 10 bzw. 11% verringert und stieg bei den höheren TAO-Konzentrationen auf 102-116% der Kontrolle an. Der Anteil an Ketosäure nahm im nanomolaren Bereich um 11-16% ab. Eine Ausnahme zeigte sich bei 10 μ M TAO, hier verringerte sich der Anteil um 32%. Im mikromolaren Bereich blieb der Anteil knapp über oder unter Ausgangsniveau, mit Ausnahme von 1 μ M TAO, hier war der Anteil um 16% verringert.

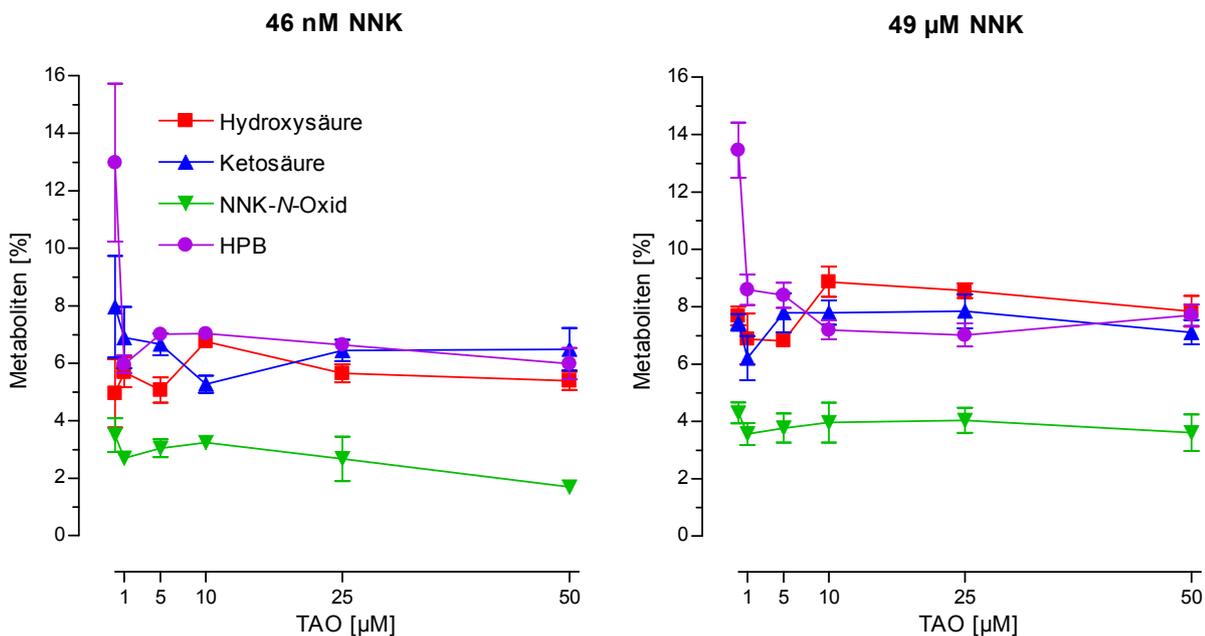


Abbildung 3-25 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von TAO auf die Bildung der einzelnen Metaboliten von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-11 Lebermikrosomen: Einfluss von TAO bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Hydroxysäure	119 / n.s. 90 / n.s.	105 / n.s. 89 / n.s.	141 / n.s. 116 / n.s.	119 / n.s. 112 / n.s.	113 / n.s. 102 / n.s.
Ketosäure	89 / n.s. 84 / n.s.	87 / n.s. 104 / n.s.	68 / n.s. 105 / n.s.	84 / n.s. 105 / n.s.	84 / n.s. 95 / n.s.
NNK-N-Oxid	78 / n.s. 83 / n.s.	88 / n.s. 89 / n.s.	94 / n.s. 92 / n.s.	79 / n.s. 94 / n.s.	50 / 0,05 85 / n.s.
HPB	47 / n.s. 64 / 0,05	55 / n.s. 63 / 0,05	56 / n.s. 54 / n.s.	53 / n.s. 52 / 0,05	47 / 0,05 57 / 0,01
NNAL	112 / n.s. 112 / 0,001	111 / n.s. 109 / 0,01	110 / n.s. 108 / 0,05	112 / n.s. 108 / 0,05	114 / n.s. 110 / 0,01
Σ Alpha	74 / n.s. 76 / 0,05	75 / n.s. 81 / 0,05	76 / n.s. 84 / 0,05	75 / n.s. 82 / 0,05	71 / n.s. 79 / 0,05

3.2.2.1.5 Hemmung durch alle vier Enzyminhibitoren

Der Gesamtmetabolismus von NNK wurde im nanomolaren Bereich durch 1, 10 und 25 μM der vier Inhibitoren signifikant um 5-11% gehemmt. Im mikromolaren Bereich war die Hemmung stärker ausgeprägt, und nahm mit steigender Hemmstoffkonzentration bis auf 18% zu (Tab. 3-12). Von den einzelnen NNK-Metaboliten wurde die Bildung von HPB signifikant um 47-65% im nanomolaren und um 43-100% im mikromolaren Bereich gehemmt (Abb. 3-26). Die Bildung der Ketosäure wurde im nanomolaren Bereich um 14-27% und im mikromolaren Bereich um 14-40% reduziert. Bei 49 μM NNK setzte die Hemmung jedoch erst ab 5 μM der Hemmstoffe ein, die stärkste Wirkung wurde mit je 10 μM der Hemmstoffe erreicht. Die Bildung von NNAL nahm dosisunabhängig bei beiden NNK-Konzentrationen zu oder blieb auf Ausgangsniveau. Die Veränderungen bei der Hydroxysäure waren im nanomolaren Bereich nicht signifikant, trotz Reduktion um 13% bei 5 μM und Stimulation um 37% bei 50 μM . Im mikromolaren Bereich war die Bildung der Hydroxysäure mit einer Ausnahme bei 25 μM (-10%) um 15-28% erhöht. Die Bildung von NNK-*N*-Oxid wurde bei der niedrigen und hohen NNK-Konzentration mit 1-10 μM der Inhibitoren um 38% bzw. 23-30% gehemmt. Bei 46 nM NNK nahm die Bildung bei 25 μM weiter bis auf 49% der Kontrolle ab und stieg dann aber bei 50 μM sprunghaft auf 165% an. Bei 49 μM NNK konnte ab 25 μM der Hemmstoffe kein NNK-*N*-Oxid mehr nachgewiesen werden. Die Veränderungen waren bis auf Ausnahme von 10 μM der Hemmstoffe bei 49 μM NNK signifikant.

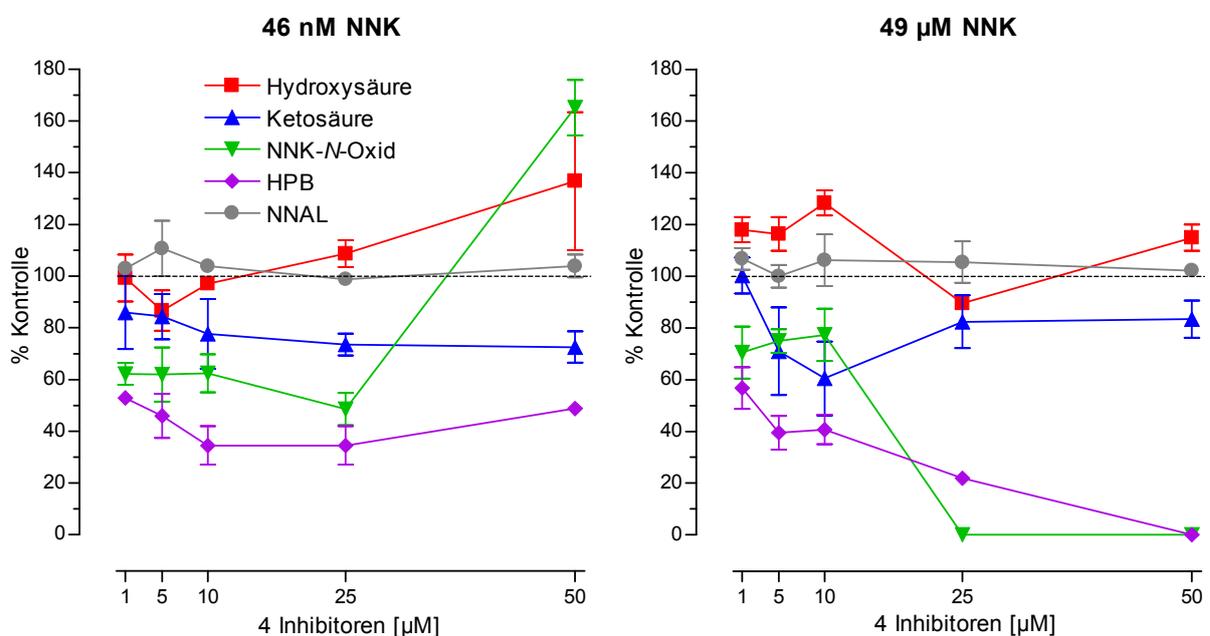


Abbildung 3-26 Lebermikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus durch alle vier Hemmstoffe; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Bei beiden Konzentrationen von NNK nahm der Anteil der Carbonylreduktion am Gesamtmetabolismus signifikant zu (Abb. 3-27, Tab. 3-13). Im nanomolaren Bereich zeigte

sich ab 10 μM keine Dosisabhängigkeit, im mikromolaren Bereich stieg der Umsatz kontinuierlich von 8% bei 1 μM bis auf 25% bei 50 μM an. Die α -Hydroxylierung nahm bei beiden Konzentrationen signifikant ab. Auch hier beschränkte sich die Dosisabhängigkeit im nanomolaren Bereich auf 1-10 μM der Hemmstoffe, während im mikromolaren Bereich die Hemmung auch bei höheren Konzentrationen weiter zunahm, von 16% bei 1 μM auf 42% bei 50 μM . Der Anteil an der *N*-Oxidation nahm bei 46 nM NNK bis auf 54% der Kontrolle ab und stieg dann sprunghaft auf 166% an. Bei 49 μM NNK nahm sie mit 1-10 μM der Hemmstoffe um 16-28% ab, ab 25 μM konnte keine *N*-Oxidation mehr nachgewiesen werden.

Tabelle 3-12 Lebermikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch alle vier Hemmstoffe bei 46 nM NNK und 49 μM NNK; Prozent der Kontrolle / $p <$

Inhibitor [μM]	1	5	10	25	50
Gesamt	95 / 0,01 98 / n.s.	99 / n.s. 89 / 0,05	93 / 0,05 93 / n.s.	89 / 0,01 86 / 0,05	100 / n.s. 82 / 0,01
Hydroxysäure	99 / n.s. 118 / 0,05	87 / n.s. 116 / n.s.	97 / n.s. 128 / 0,05	109 / n.s. 90 / 0,05	137 / n.s. 115 / 0,05
Ketosäure	86 / n.s. 100 / n.s.	84 / n.s. 71 / n.s.	78 / n.s. 60 / n.s.	74 / 0,05 82 / n.s.	73 / 0,05 83 / n.s.
NNK- <i>N</i> -Oxid	62 / 0,01 70 / 0,05	62 / 0,05 75 / 0,01	62 / 0,05 77 / n.s.	49 / 0,01 0 / 0,001	165 / 0,01 0 / 0,001
HPB	53 / 0,01 57 / 0,05	46 / 0,05 39 / 0,05	35 / 0,05 41 / 0,05	35 / 0,05 22 / 0,01	49 / 0,01 0 / 0,01
NNAL	103 / 0,01 107 / n.s.	111 / n.s. 100 / n.s.	104 / n.s. 106 / n.s.	99 / n.s. 105 / n.s.	104 / n.s. 102 / n.s.

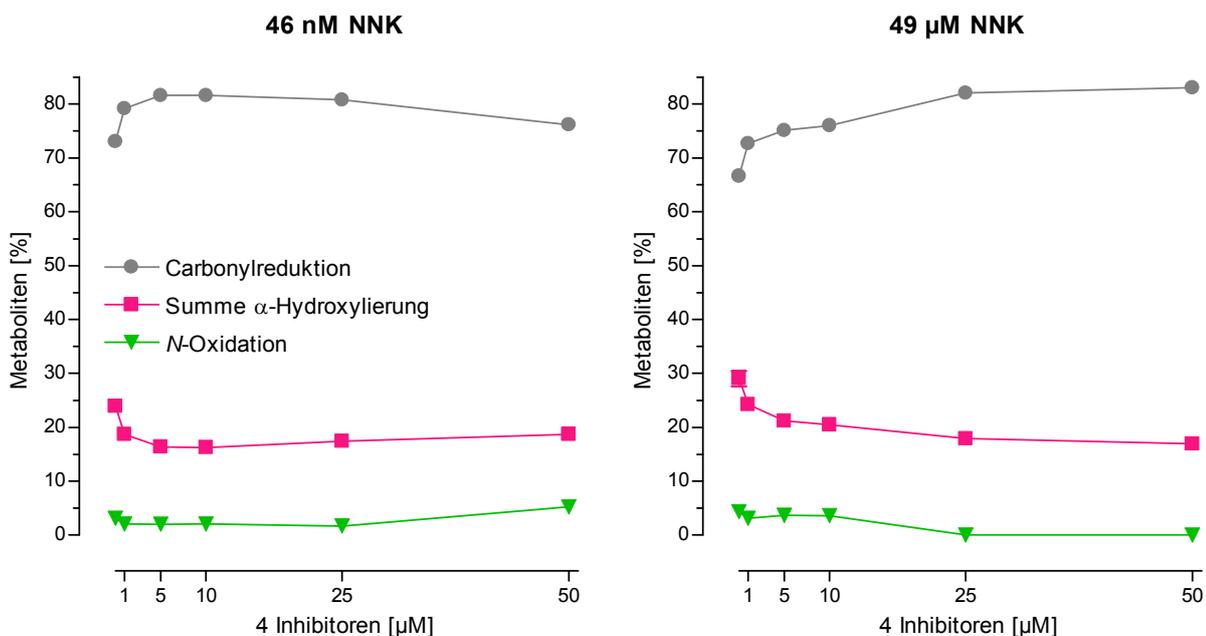


Abbildung 3-27 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung aller vier Hemmstoffe in Kombination auf die Stoffwechselwege von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Die Daten der einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung zeigen, dass die HPB-Bildung am stärksten beeinflusst wurde. Bei 46 nM NNK nahm der Anteil signifikant und dosisabhängig bis 10 μ M der Hemmstoffe um 44-63% ab. (Abb. 3-28, Tab. 3-13). Bei 49 μ M NNK war die signifikante Hemmung um 42-100% über den gesamten Konzentrationsbereich der Hemmstoffe dosisabhängig. Der Anteil an Ketosäure nahm bei 46 nM NNK zunehmend um 10-27% ab. Bei 49 μ M NNK beschränkte sich die Dosisabhängigkeit auf den Bereich bis 10 μ M, in dem die Ketosäurebildung um 4-35% abnahm. Der Anteil an Hydroxysäure nahm bei beiden NNK-Konzentrationen um 4-37% zu, mit Ausnahme einer Abnahme um 12% bei 46 nM NNK und je 5 μ M der Hemmstoffe.

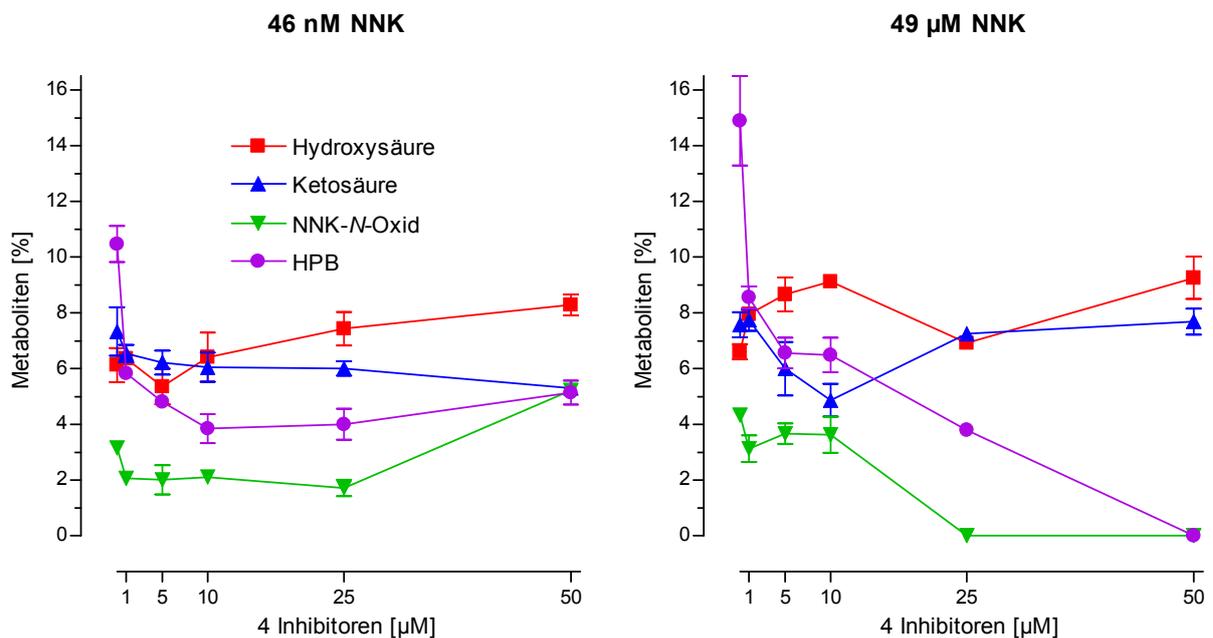


Abbildung 3-28 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung aller vier Inhibitoren in Kombination auf die Bildung der einzelnen Metaboliten von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-13 Lebermikrosomen: Einfluss aller vier Inhibitoren bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Hydroxysäure	105 / n.s. 121 / 0,05	88 / n.s. 131 / 0,01	104 / n.s. 138 / 0,01	122 / 0,05 105 / n.s.	137 / n.s. 140 / 0,05
Ketosäure	90 / n.s. 102 / n.s.	86 / n.s. 80 / n.s.	84 / n.s. 65 / 0,05	82 / n.s. 96 / n.s.	73 / n.s. 102 / n.s.
NNK-N-Oxid	65 / 0,01 72 / 0,05	63 / 0,05 85 / n.s.	67 / 0,05 84 / n.s.	54 / 0,01 0 / 0,001	166 / 0,01 0 / 0,001
HPB	56 / 0,01 58 / 0,05	46 / 0,01 45 / 0,05	37 / 0,05 44 / 0,05	39 / 0,05 26 / 0,01	49 / 0,001 0 / 0,01
NNAL	108 / 0,001 109 / 0,05	112 / 0,01 113 / 0,01	112 / 0,001 114 / 0,05	111 / 0,001 123 / 0,01	104 / 0,01 125 / 0,001
Σ Alpha	78 / 0,001 84 / n.s.	69 / 0,01 73 / 0,001	68 / 0,01 71 / 0,01	73 / 0,01 62 / 0,01	78 / 0,001 58 / 0,001

3.2.2.2 Lungenmikrosomen

3.2.2.2.1 Hemmung von CYP 1A1/2 durch α -Naphthoflavon (NF)

Der Gesamtmetabolismus von NNK wurde im nanomolaren Bereich dosisabhängig nur leicht gehemmt und erreichte keine statistische Signifikanz. Im mikromolaren Bereich hingegen nahm der Gesamtumsatz leicht zu, um 9% nur bei 10 μ M NF signifikant (Tab. 3-14). Von den NNK-Metaboliten war die Bildung von Ketosäure am stärksten beeinflusst (Abb. 3-29), sie reduzierte sich, weitgehend unabhängig von der NF-Konzentration, bis auf ein Viertel (46 nM NNK) bzw. die Hälfte des Kontrollwertes (49 μ M NNK). NNK-*N*-Oxid wurde im nanomolaren Bereich bei 1-25 μ M NF ähnlich stark und ebenfalls dosisunabhängig gehemmt, ohne Signifikanz zu erreichen. Im mikromolaren Bereich war die Hemmung nur bei 1 und 5 μ M NF mit 27% und 19% signifikant. Die Bildung von NNAL und seinem Aktivierungsprodukt Hydroxysäure nahm unter dem Einfluss von NF im mikromolaren Bereich dosisunabhängig um 10-15% für NNAL bzw. 36-43% für Hydroxysäure zu, signifikant bei NNAL nur mit 1 und 50 μ M NF, bei Hydroxysäure signifikant mit Ausnahme von 10 μ M NF. Im nanomolaren Bereich hingegen nahm die NNAL-Bildung nicht signifikant um 1-10% ab, die Bildung von Hydroxysäure hingegen um 1-12% zu, signifikant nur bei 1 μ M NF. Bei beiden Metaboliten zeigte sich keine Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration.

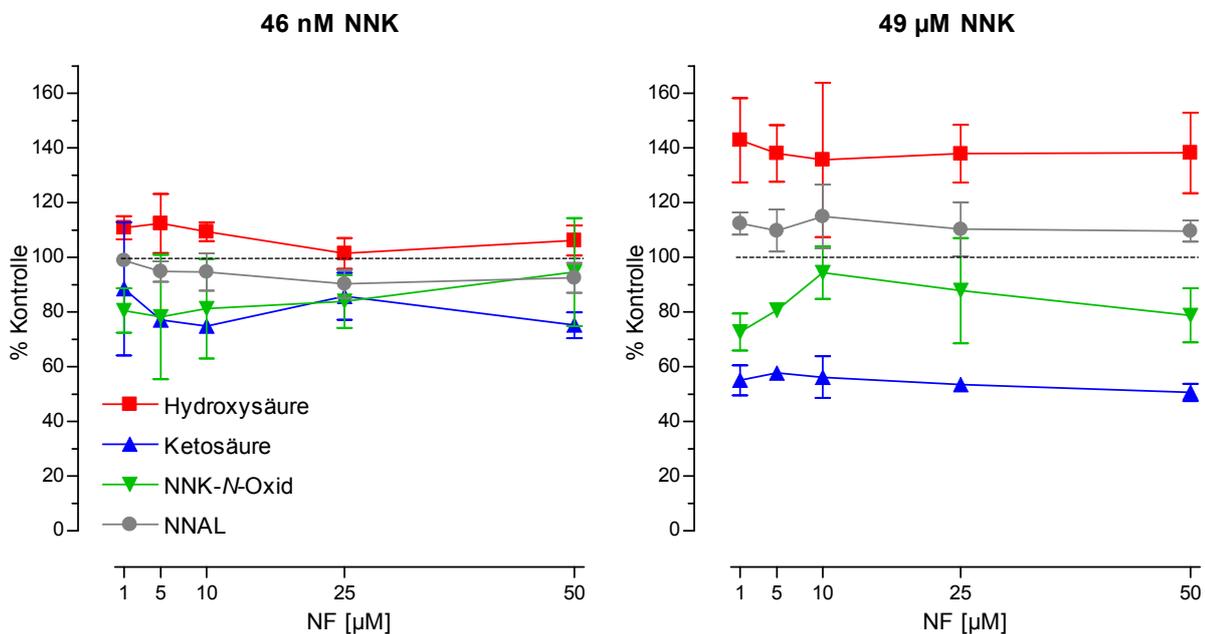


Abbildung 3-29 Lungenmikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus durch NF; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Der Anteil der Carbonylreduktion an den Hauptstoffwechselwegen des NNK blieb im nanomolaren Bereich auf Ausgangsniveau. Im mikromolaren Bereich erreichte die geringfügige Steigerung um 5-6% Signifikanz (Abb. 3-30; Tab. 3-15). Die α -Hydroxylierung nahm bei 46 nM NNK um 2-6% zu, signifikant nur bei 25 μ M NF. Bei 49 μ M NNK hingegen nahm sie

um 9-14% ab, signifikant bei 10 und 50 μM NF. Eine eindeutige Abhängigkeit von der NF-Konzentration lag in keinem der beiden Konzentrationsbereiche vor. Der Anteil der *N*-Oxidation nahm im nanomolaren Bereich um bis zu 18% bei 1 und 5 μM NF ab, stieg dann aber dosisabhängig bis auf den Kontrollwert bei 50 μM NF an. Im mikromolaren Bereich wurde die *N*-Oxidation unabhängig von der Inhibitorkonzentration um 18-32% gehemmt.

Tabelle 3-14 Lungenmikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch NF bei 46 nM NNK und 49 μM NNK; Prozent der Kontrolle / $p <$

Inhibitor [μM]	1	5	10	25	50
Gesamt	99 / n.s. 106 / n.s.	95 / n.s. 105 / n.s.	92 / n.s. 109 / 0,05	91 / n.s. 105 / n.s.	93 / n.s. 104 / n.s.
Hydroxysäure	111 / 0,05 143 / 0,05	112 / n.s. 138 / 0,05	109 / n.s. 136 / n.s.	101 / n.s. 138 / 0,05	106 / n.s. 138 / 0,05
Ketosäure	89 / n.s. 55 / 0,01	77 / 0,01 58 / 0,001	75 / 0,001 56 / 0,01	86 / n.s. 53 / 0,001	75 / 0,05 51 / 0,001
NNK- <i>N</i> -Oxid	81 / n.s. 73 / 0,05	78 / n.s. 81 / 0,05	81 / n.s. 94 / n.s.	84 / n.s. 88 / n.s.	95 / n.s. 79 / n.s.
NNAL	99 / n.s. 112 / 0,05	95 / n.s. 110 / n.s.	95 / n.s. 115 / n.s.	90 / n.s. 110 / n.s.	93 / n.s. 110 / 0,05

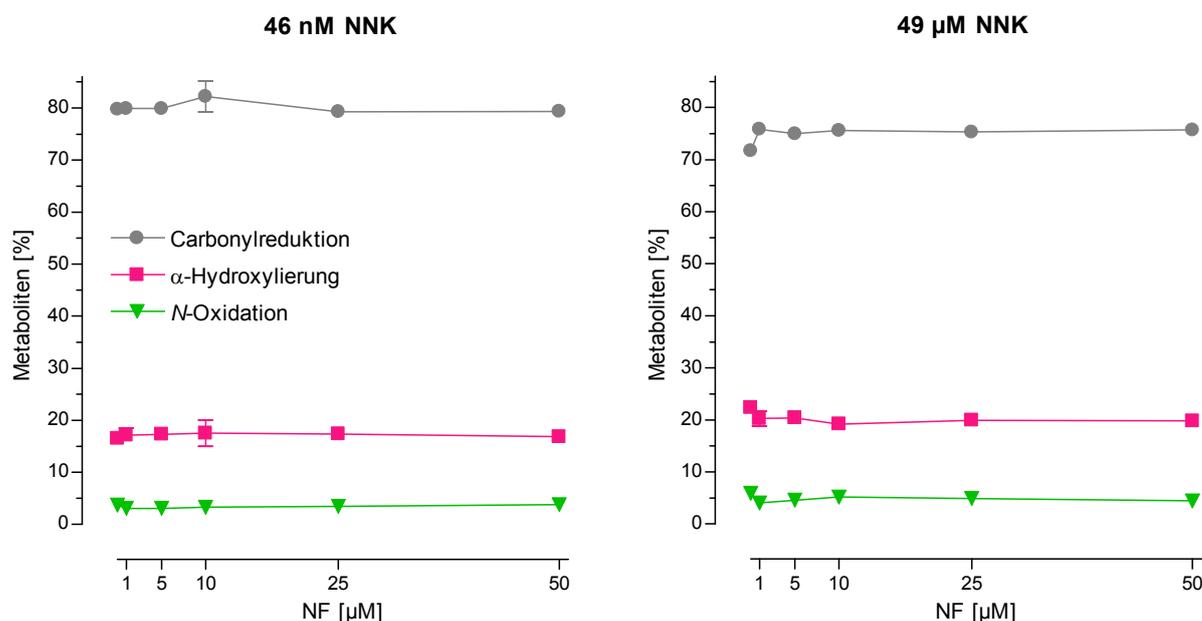


Abbildung 3-30 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von NF auf die Stoffwechselwege von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Die Darstellung der einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung zeigt bei beiden NNK-Konzentrationen ein qualitativ gleiches Bild (Abb. 3-31; Tab. 3-15). Der Anteil an Hydroxysäure nahm in beiden Konzentrationsbereichen zu, wobei die Zunahme im mikromolaren Bereich deutlicher ausfiel. Bei 46 nM NNK war eine Zunahme um 12-20%, bei 49 μM NNK um 24-34% zu verzeichnen. Die Erhöhung des Anteils war bei beiden NNK-Konzentrationen

signifikant, mit Ausnahme der Werte bei 10 μM NF. Der Anteil an Ketosäure wurde bei beiden NNK-Konzentrationen reduziert. Im nanomolaren Bereich verringerte er sich um 6-19%, im mikromolaren Bereich verringerte sich der Anteil signifikant um 45-51%. Bei beiden NNK-Konzentrationen bestand keine Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration.

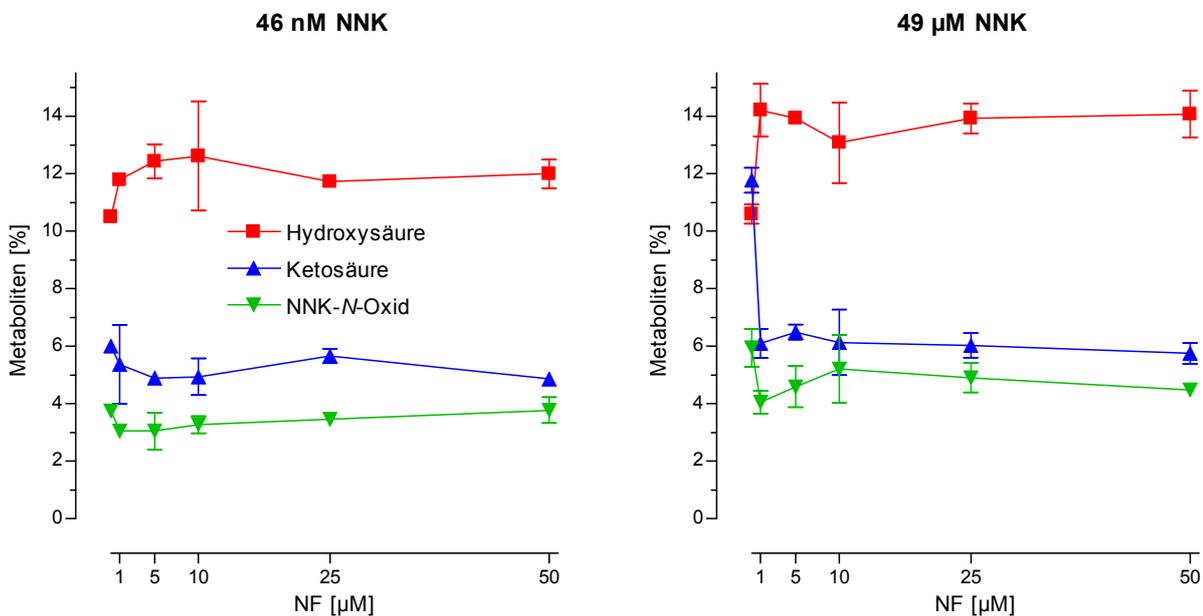


Abbildung 3-31 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von NF auf die Bildung der einzelnen Metaboliten von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-15 Lungenmikrosomen: Einfluss von NF bei 46 nM NNK und 49 μM NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / $p <$

Inhibitor [μM]	1	5	10	25	50
Hydroxysäure	112 / 0,05 134 / 0,05	118 / 0,05 132 / 0,01	120 / n.s. 124 / n.s.	112 / 0,01 131 / 0,01	114 / 0,05 133 / 0,05
Ketosäure	89 / n.s. 52 / 0,001	82 / 0,05 55 / 0,01	82 / n.s. 52 / 0,05	94 / n.s. 51 / 0,01	81 / 0,01 49 / 0,01
NNK-N-Oxid	82 / 0,05 68 / 0,05	82 / n.s. 77 / 0,01	88 / n.s. 87 / n.s.	92 / n.s. 83 / n.s.	101 / n.s. 76 / 0,05
NNAL	100 / n.s. 106 / 0,05	100 / n.s. 105 / 0,05	103 / n.s. 105 / 0,01	99 / n.s. 105 / 0,01	100 / n.s. 106 / 0,05
Σ Alpha	104 / n.s. 91 / n.s.	105 / n.s. 91 / n.s.	106 / n.s. 86 / 0,05	105 / 0,01 89 / n.s.	102 / n.s. 89 / 0,05

3.2.2.2.2 Hemmung von CYP 2A6/13 durch 8-Methoxypsoralen (MOP)

Der Gesamtmetabolismus von NNK nahm bei beiden Konzentrationen dosisunabhängig zu, im nanomolaren Bereich mit 104-111% der Kontrolle etwas stärker als im mikromolaren Bereich mit 103-109% (Tab. 3-16). Von den einzelnen NNK-Metaboliten wurde die Bildung von NNK-N-Oxid am stärksten durch MOP beeinflusst. Mit Ausnahme der Werte bei 5 μM

MOP erhöhte sich die N-Oxidation weitgehend dosisunabhängig bei 46 nM NNK um 23-58%, bei 49 µM NNK um 8-37%. Bei 5 µM MOP wurde im nanomolaren Bereich 2,5 mal mehr NNK-N-Oxid gebildet, im mikromolaren Bereich hingegen 12% weniger. (Abb. 3-32). Die Bildung von NNAL wurde bei 46 nM NNK durch MOP nicht beeinflusst. Die Bildung von NNAL wurde bei beiden NNK-Konzentrationen leicht aber z.T. signifikant um 4-11% gesteigert. Sein Aktivierungsprodukt Hydroxysäure wurde im nanomolaren Bereich mit 1-25 µM MOP um 5-9% vermehrt gebildet und sank bei 50 µM MOP wieder auf Ausgangsniveau. Im mikromolaren Bereich schwankte die Bildung zwischen 90 und 110% des Kontrollwertes. Die Bildung von Ketosäure nahm bei beiden NNK-Konzentrationen unabhängig von der MOP-Konzentration ab. Bei 46 nM NNK war die Hemmung von 7-22% unabhängig von der Dosis. Bei 49 µM NNK erhöhte sich die Hemmung bis 25 µM MOP dosisabhängig auf 20%.

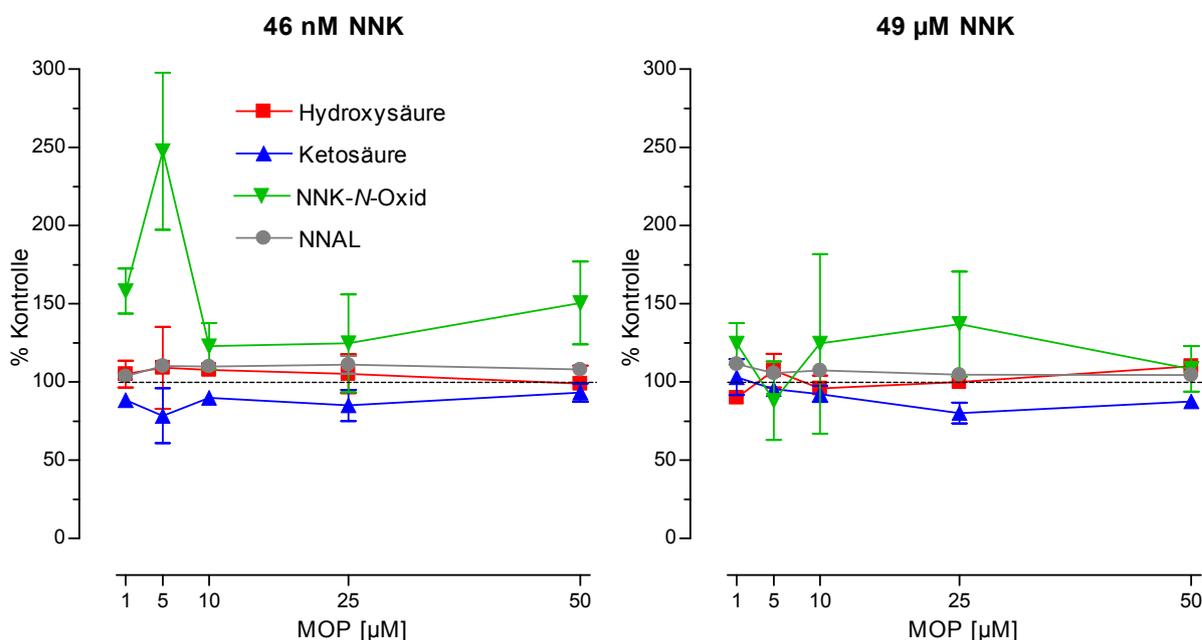


Abbildung 3-32 Lungenmikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus durch MOP; Prozent der Kontrolle (MW ± SD; N = 3)

Tabelle 3-16 Lungenmikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch MOP bei 46 nM NNK und 49 µM NNK; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [µM]	1	5	10	25	50
Gesamt	104 / 0,01 109 / 0,05	111 / 0,01 104 / n.s.	109 / 0,01 105 / 0,05	109 / n.s. 103 / n.s.	107 / 0,05 103 / n.s.
Hydroxysäure	105 / n.s. 90 / 0,05	109 / n.s. 107 / n.s.	108 / 0,05 96 / n.s.	105 / n.s. 100 / n.s.	99 / n.s. 110 / 0,05
Ketosäure	88 / 0,05 103 / n.s.	78 / n.s. 95 / n.s.	90 / 0,05 92 / n.s.	85 / n.s. 80 / 0,05	93 / n.s. 88 / 0,05
NNK-N-Oxid	158 / 0,05 125 / n.s.	248 / 0,05 88 / n.s.	123 / n.s. 125 / n.s.	125 / n.s. 137 / n.s.	150 / 0,05 108 / n.s.
NNAL	104 / n.s. 111 / 0,05	110 / 0,01 106 / 0,05	110 / 0,01 107 / n.s.	111 / n.s. 105 / n.s.	108 / n.s. 104 / 0,05

Die Reduktion zu NNAL schwankte bei beiden NNK-Konzentrationen nur geringfügig um den Kontrollwert. Der Anteil der α -Hydroxylierung reduzierte sich unabhängig von der Dosis bei beiden Konzentrationsbereichen um 4-15% (Abb. 3-33, Tab. 3-17). Die *N*-Oxidation nahm bei beiden NNK-Konzentrationen zu. Im nanomolaren Bereich stieg der Anteil dosisunabhängig um 13-52% an, im mikromolaren Bereich um 5-34% mit Ausnahme der Werte bei 5 μ M MOP. Hier nahm der Anteil an der *N*-Oxidation bei 46 nM NNK deutlich um 123% zu, bei 49 μ M NNK dagegen leicht um 16% ab.

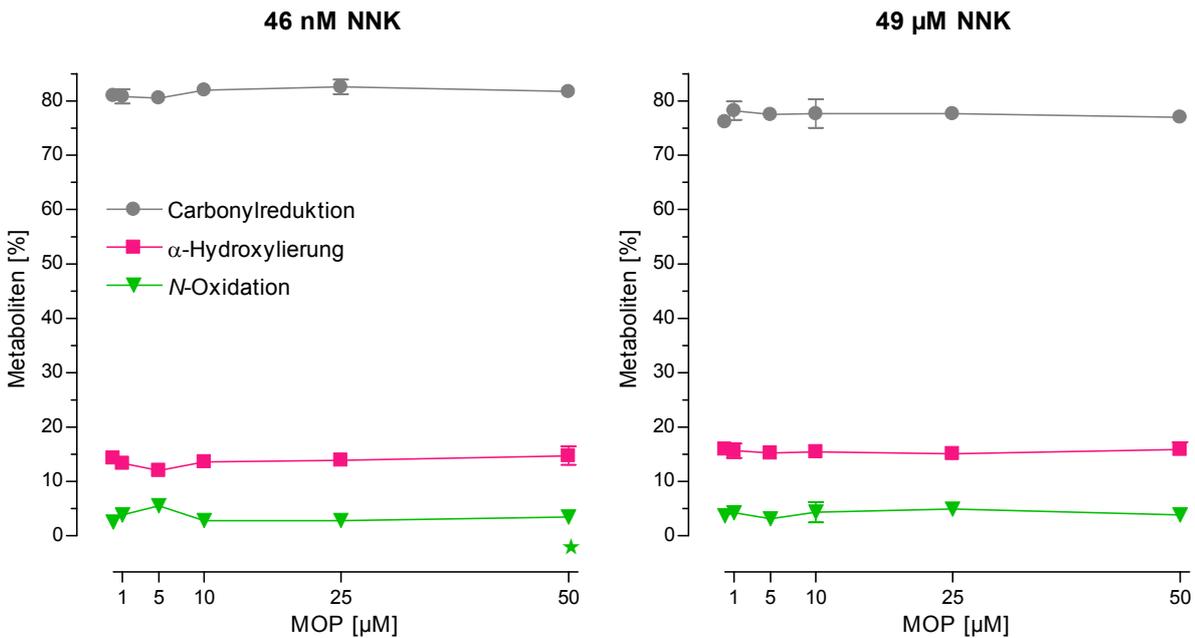


Abbildung 3-33 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von MOP auf die Stoffwechselwege von NNK (MW \pm SD; N = 3)

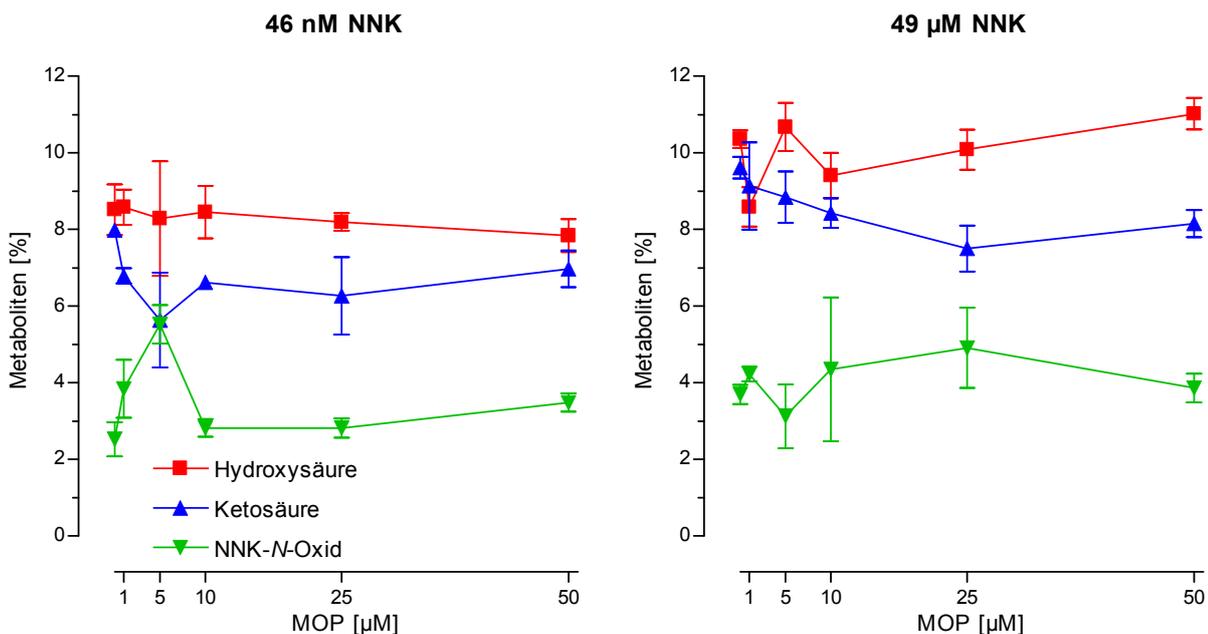


Abbildung 3-34 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von MOP auf die Bildung der einzelnen Metaboliten von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Die Daten der einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung zeigen bei beiden NNK-Konzentrationen ein ähnliches Bild (Abb. 3-34). Der Anteil an Hydroxysäure blieb im nanomolaren Bereich mit 1-10 μ M MOP auf Ausgangsniveau und sank mit steigender MOP-Konzentration auf 93% des Kontrollwertes bei 50 μ M MOP (Tab. 3-17). Im mikromolaren Bereich schwankte der Anteil dosisunabhängig zwischen 83 und 106% des Kontrollwertes. Der Anteil an Ketosäure nahm bei beiden NNK-Konzentrationen ab. Bei 46 nM NNK war eine dosisunabhängige Hemmung um 13-29% zu verzeichnen. Bei 49 μ M NNK nahm der Anteil an Ketosäure mit steigender Hemmstoffkonzentration bis 25 μ M MOP um 22% ab und stieg mit 50 μ M MOP wieder auf 85% des Kontrollwertes an.

Tabelle 3-17 Lungenmikrosomen: Einfluss von MOP bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / $p <$

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Hydroxysäure	101 / n.s. 83 / 0,05	99 / n.s. 103 / n.s.	99 / n.s. 91 / n.s.	97 / n.s. 97 / n.s.	93 / n.s. 106 / n.s.
Ketosäure	85 / 0,05 95 / n.s.	71 / n.s. 92 / n.s.	83 / 0,01 88 / 0,05	78 / n.s. 78 / 0,05	87 / n.s. 85 / 0,001
NNK-N-Oxid	152 / 0,05 115 / n.s.	223 / 0,05 84 / n.s.	113 / n.s. 118 / n.s.	115 / n.s. 134 / n.s.	141 / 0,05 105 / n.s.
NNAL	100 / n.s. 103 / n.s.	99 / n.s. 102 / n.s.	101 / 0,05 102 / n.s.	102 / n.s. 102 / n.s.	101 / n.s. 101 / n.s.
Σ Alpha	93 / n.s. 89 / n.s.	85 / 0,05 98 / n.s.	91 / 0,01 89 / n.s.	88 / 0,05 88 / 0,05.	90 / n.s. 96 / 0,05

3.2.2.2.3 Hemmung von CYP 2E1 durch Chlorzoxazon (CZ)

Der Gesamtmetabolismus von NNK schwankte bei beiden NNK-Konzentrationen nur geringfügig um den Kontrollwert (Tab. 3-18). Die Bildung der einzelnen NNK-Metaboliten verlief mit Ausnahme der von NNAL bei beiden Konzentrationsbereichen unterschiedlich. Bei 46 nM NNK erhöhte sich die NNAL-Bildung außer bei 5 μ M CZ nicht signifikant um bis zu 5% (Abb. 3-35). Bei 49 μ M NNK erreichte die leichte Erhöhung von NNAL lediglich bei 25 μ M CZ mit 8% Signifikanz. Die Werte für die Hydroxysäure schwanken im nanomolaren Bereich um -20% bis +11% nicht signifikant um den Kontrollwert. Im mikromolaren Bereich nahm die Bildung der Hydroxysäure dosisunabhängig um 15-23% ab, signifikant nur bei 50 μ M CZ. Die Zunahme der Ketosäure bei 46 nM NNK um maximal 17% war nur bei 1 μ M CZ signifikant. Bei 49 μ M NNK erreicht die Abnahme um bis zu 9% keine Signifikanz. Die Bildung von NNK-N-Oxid war im nanomolaren Bereich bei 1 μ M CZ zunächst leicht gesteigert, sank bei 5 und 10 μ M CZ leicht ab und war bei 25 und 50 μ M CZ nicht mehr nachweisbar. Im mikromolaren Bereich wurde die Bildung mit 1 μ M CZ bereits um 78% reduziert, schwankte dann nicht signifikant um den Kontrollwert und war bei 50 μ M CZ wiederum nicht mehr nachweisbar.

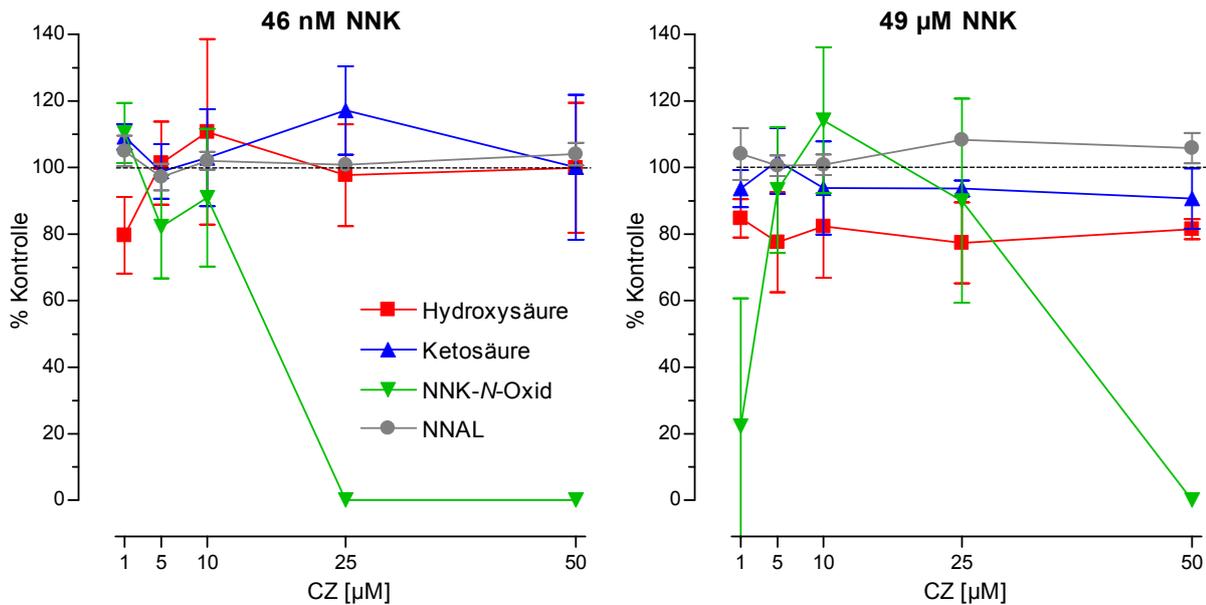


Abbildung 3-35 Lungenmikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus durch CZ; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-18 Lungenmikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch CZ bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Gesamt	104 / n.s. 98 / n.s.	97 / n.s. 98 / n.s.	102 / n.s. 99 / n.s.	99 / n.s. 103 / 0,05.	100 / n.s. 98 / n.s.
Hydroxysäure	80 / n.s. 85 / n.s.	101 / n.s. 77 / n.s.	111 / n.s. 82 / n.s.	98 / n.s. 77 / n.s.	100 / n.s. 81 / 0,05
Ketosäure	109 / 0,05 94 / n.s.	99 / n.s. 102 / n.s.	103 / n.s. 94 / n.s.	117 / n.s. 94 / n.s.	100 / n.s. 91 / n.s.
NNK-N-Oxid	110 / n.s. 22 / 0,05	82 / n.s. 93 / n.s.	91 / n.s. 114 / n.s.	0 / 0,01 90 / n.s.	0 / 0,01 0 / 0,01
NNAL	105 / n.s. 104 / n.s.	97 / n.s. 101 / n.s.	102 / n.s. 101 / n.s.	101 / n.s. 108 / 0,05	104 / n.s. 106 / n.s.

Der Anteil der Carbonylreduktion von NNK am Gesamtmetabolismus erhöhte sich im nanomolaren Bereich dosisunabhängig und nicht signifikant um maximal 4%. Im mikromolaren Bereich nahm er um 2-8% zu, signifikant bei 1 und 50 μ M CZ mit 106% bzw. 108% der Kontrolle (Abb. 3-36; Tab. 3-19). Der Anteil der α -Hydroxylierung wurde bei 46 nM NNK nur bei 1 μ M CZ signifikant um 8% reduziert, bei steigender CZ-Konzentration dagegen nicht signifikant auf maximal 109% der Kontrolle gesteigert. Bei 49 μ M NNK blieb sie durchwegs um 9-18% unter Kontrollniveau, signifikant nur bei 25 μ M CZ. Der Anteil der N-Oxidation nahm im nanomolaren Bereich nach leichter Erhöhung um 6% bei 1 μ M CZ zuerst leicht ab und war bei 25 und 50 μ M CZ nicht mehr nachweisbar. Im mikromolaren Bereich nahm der Anteil mit 1 μ M CZ stark ab und war bei 50 μ M CZ wiederum nicht nachweisbar. Dazwischen schwankte der Anteil nicht signifikant um den Kontrollwert.

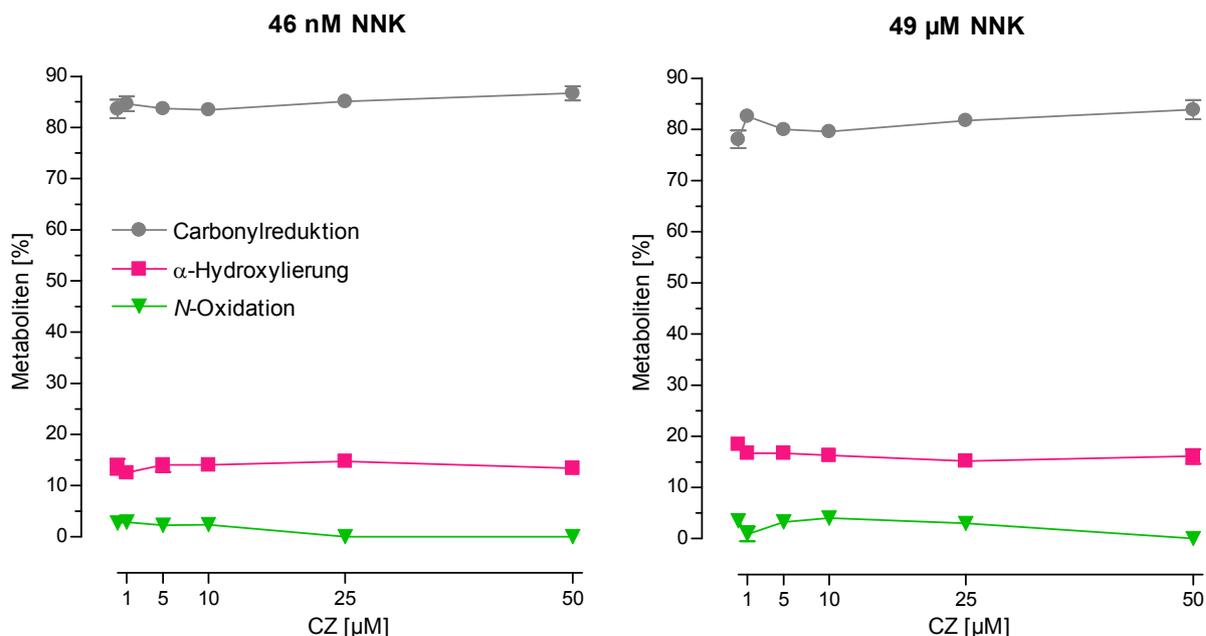


Abbildung 3-36 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von CZ auf die Stoffwechselwege von NNK (MW \pm SD; N = 3)

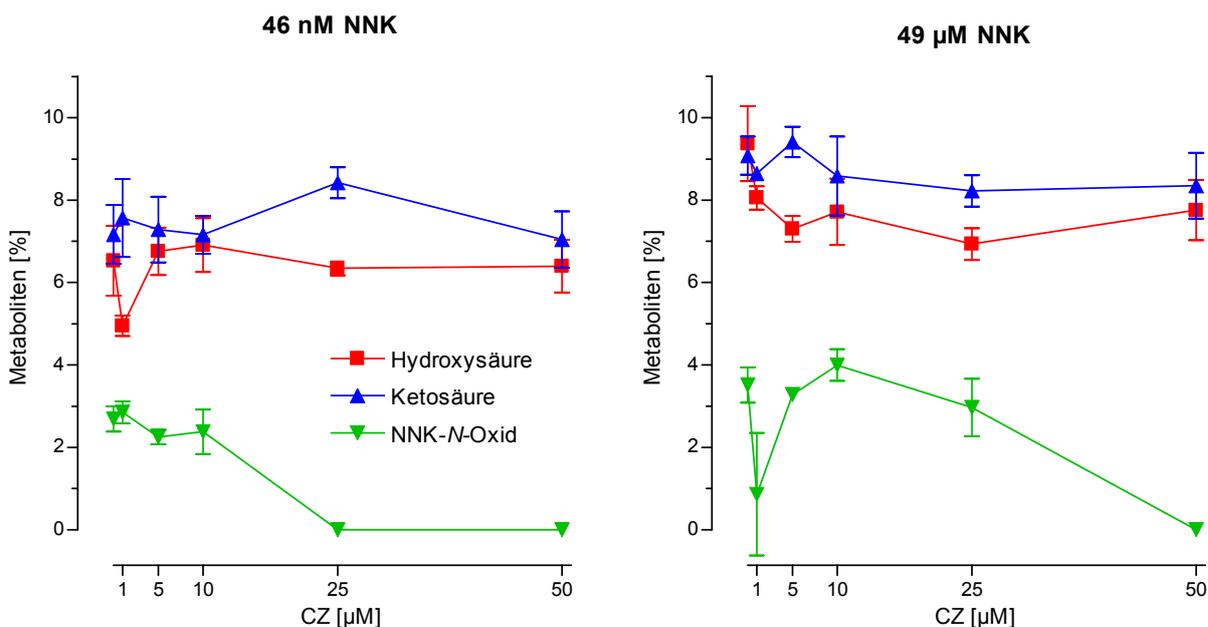


Abbildung 3-37 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von CZ auf die Bildung der einzelnen Metaboliten von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Die Darstellung der einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung zeigt bei beiden NNK-Konzentrationen ein ähnliches Bild (Abb. 3-37; Tab. 3-19). Der Anteil der Ketosäure lag im nanomolaren Bereich ohne jegliche Signifikanz bis zu 18% über dem Kontrollwert. Im mikromolaren Bereich nahm der Anteil mit Ausnahme bei 5 μM CZ um 5-9% ab, signifikant bei 25 μM CZ. Der Anteil an Hydroxysäure schwankte bei 46 nM NNK um den Kontrollwert und war nur bei 1 μM CZ signifikant um 23% reduziert. Bei 49 μM NNK hingegen dosisunabhängig eine Abnahme um 13-25% zu beobachten, signifikant nur bei 50 μM CZ.

Tabelle 3-19 Lungenmikrosomen: Einfluss von CZ bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / $p <$

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Hydroxysäure	77 / 0,05 87 / n.s.	107 / n.s. 79 / n.s.	108 / n.s. 83 / n.s.	98 / n.s. 75 / n.s.	99 / n.s. 83 / 0,05
Ketosäure	105 / n.s. 95 / n.s.	102 / n.s. 104 / n.s.	101 / n.s. 95 / n.s.	118 / n.s. 91 / 0,01	100 / n.s. 92 / n.s.
NNK-N-Oxid	106 / n.s. 22 / n.s.	84 / n.s. 95 / n.s.	89 / n.s. 115 / n.s.	0 / 0,01 87 / n.s.	0 / 0,01 0 / 0,01
NNAL	101 / n.s. 106 / 0,05	100 / n.s. 103 / n.s.	100 / n.s. 102 / n.s.	102 / n.s. 105 / n.s.	104 / n.s. 108 / 0,05
Σ Alpha	92 / 0,05 91 / n.s.	103 / n.s. 91 / n.s.	104 / n.s. 89 / n.s.	109 / n.s. 82 / 0,05	100 / n.s. 87 / n.s.

3.2.2.2.4 Hemmung von CYP 3A4/5 durch Troleandomycin (TAO)

Der Gesamtmetabolismus von NNK wurde geringfügig und dosisunabhängig gehemmt, signifikant nur durch 1 μ M TAO um 7% und 9% im nano- und mikromolaren Bereich (Tab. 3-20). Die Bildung der einzelnen NNK-Metaboliten wurde in der Tendenz ebenfalls unabhängig von der Dosis gehemmt, mit Ausnahme der NNK-N-Oxidation im nanomolaren Bereich, die zunächst gesteigert und mit zunehmender TAO-Konzentration schließlich gehemmt wurde (Abb. 3-38). Am deutlichsten war die Hemmung der NNK-N-Oxidation im mikromolaren Bereich, die mit 22-30% außer bei 25 μ M TAO signifikant war. Die Reduktion zu NNAL wurde maximal um 10% erniedrigt, am deutlichsten bereits bei 1 μ M TAO. Die Bildung von Hydroxy- und Ketosäure zeigte starke Schwankungen, sie war nur bei 25 μ M TAO im nanomolaren Bereich signifikant um 10% bzw. 28% verringert.

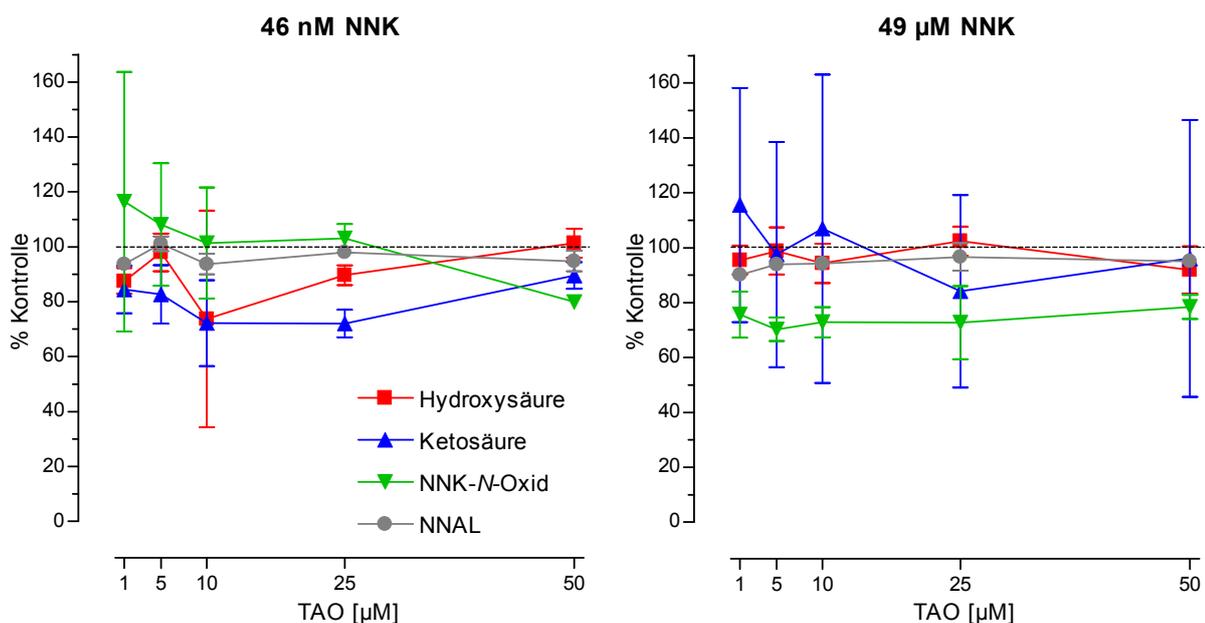
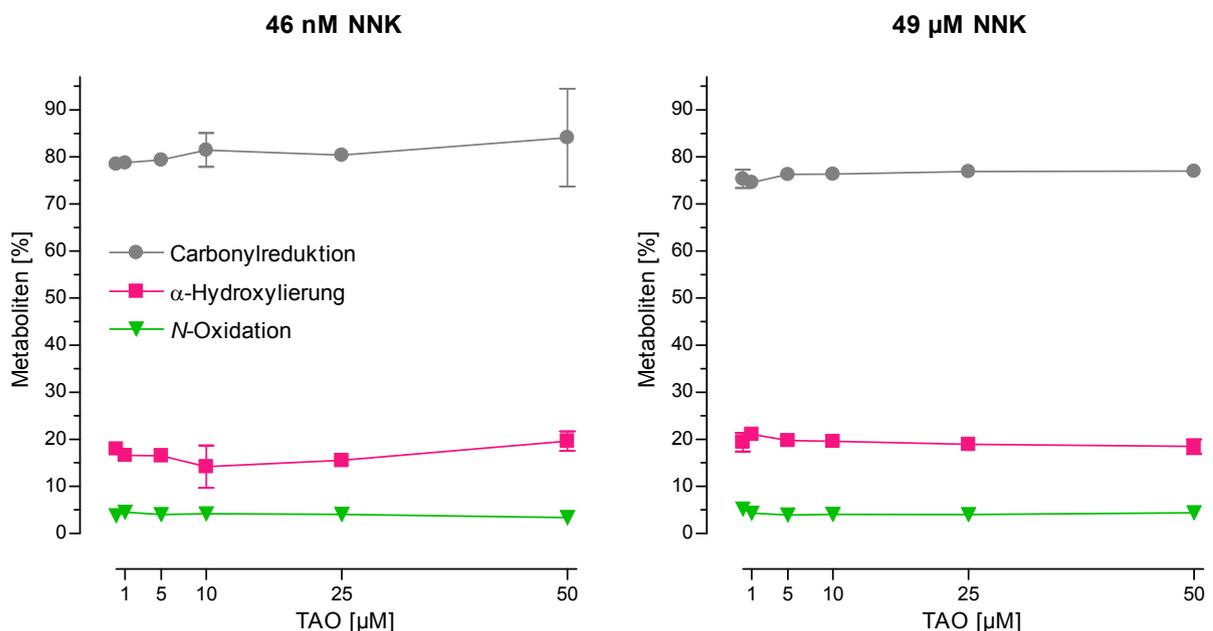
Abbildung 3-38 Lungenmikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch TAO; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-20 Lungenmikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch TAO bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Gesamt	93 / 0,01 91 / 0,05	100 / n.s. 93 / n.s.	90 / n.s. 93 / n.s.	96 / n.s. 95 / n.s.	95 / n.s. 93 / n.s.
Hydroxysäure	87 / n.s. 95 / n.s.	98 / n.s. 99 / n.s.	74 / n.s. 94 / n.s.	90 / 0,05 102 / n.s.	101 / n.s. 92 / n.s.
Ketosäure	84 / n.s. 116 / n.s.	83 / n.s. 97 / n.s.	72 / n.s. 107 / n.s.	72 / 0,05 84 / n.s.	90 / n.s. 96 / n.s.
NNK-N-Oxid	116 / n.s. 76 / 0,05	108 / n.s. 70 / 0,01	101 / n.s. 73 / 0,01	103 / n.s. 73 / n.s.	80 / 0,001 78 / 0,05
NNAL	94 / 0,01 90 / 0,01	101 / n.s. 94 / 0,01	94 / n.s. 94 / n.s.	98 / n.s. 97 / n.s.	95 / n.s. 95 / 0,05

Die Reduktion von NNK nahm im nanomolaren Bereich leicht zu und blieb im mikromolaren Bereich auf Kontrollniveau. (Abb. 3-39, Tab. 3-21). Der Anteil der α -Hydroxylierung nahm bei 46 nM NNK bis 10 μ M TAO auf 21% ab und stieg danach wieder an. Mit 49 μ M NNK war dagegen der Anteil zunächst leicht erhöht und sank danach leicht ab. Der Anteil an der N-Oxidation war im nanomolaren Bereich außer bei 50 μ M TAO nicht signifikant erhöht, im mikromolaren Bereich durchgehend um 17-24% erniedrigt, signifikant bei 5 und 10 μ M TAO.

Abbildung 3-39 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von TAO auf die Stoffwechselwege von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Die Daten der Metaboliten der α -Hydroxylierung zeigen bei beiden NNK-Konzentrationen ein qualitativ gleiches Bild. Der Anteil an Hydroxysäure blieb bei nanomolarer NNK-Konzentration bis 25 μ M TAO unter dem Kontrollwert, mit 50 μ M TAO stieg er auf 114% der Kontrolle an (Abb. 3-40, Tab. 3-21). Im mikromolaren Bereich war er mit Ausnahme von 50 μ M TAO

leicht erhöht. Keine der Änderungen erreichte Signifikanz. Der Anteil an Ketosäure nahm bei 46 nM NNK dosisabhängig bis auf 75% der Kontrolle bei 25 μM TAO ab, mit 50 μM TAO stieg er wieder auf den Kontrollwert an. Bei 49 μM NNK war der Anteil mit Ausnahme von 25 μM nicht signifikant bis auf 126% der Kontrolle erhöht.

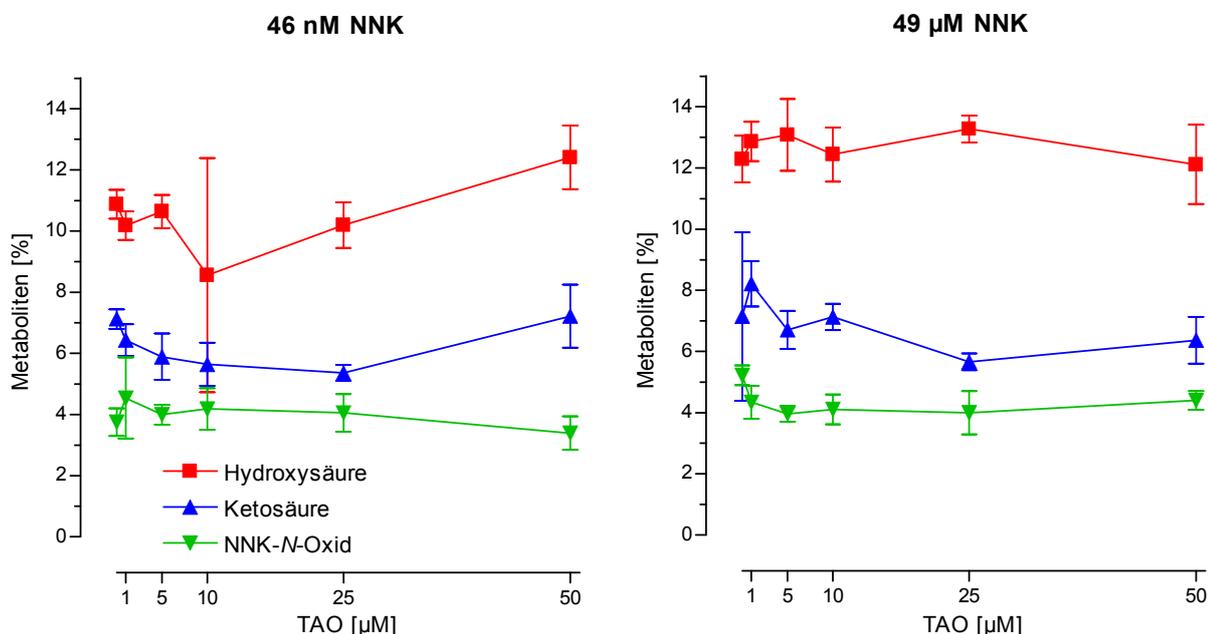


Abbildung 3-40 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von TAO auf die Bildung der einzelnen Metaboliten von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-21 Lungenmikrosomen: Einfluss von TAO bei 46 nM NNK und 49 μM NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μM]	1	5	10	25	50
Hydroxysäure	94 / n.s. 105 / n.s.	98 / n.s. 107 / n.s.	79 / n.s. 102 / n.s.	94 / n.s. 108 / n.s.	114 / n.s. 99 / n.s.
Ketosäure	90 / n.s. 126 / n.s.	83 / n.s. 104 / n.s.	79 / 0,05 114 / n.s.	75 / 0,05 89 / n.s.	101 / n.s. 102 / n.s.
NNK-N-Oxid	125 / n.s. 83 / n.s.	108 / n.s. 76 / 0,01	114 / n.s. 79 / 0,05	108 / n.s. 77 / n.s.	90 / n.s. 84 / n.s.
NNAL	100 / n.s. 99 / n.s.	101 / n.s. 101 / n.s.	104 / n.s. 101 / n.s.	102 / 0,001 102 / n.s.	107 / n.s. 102 / n.s.
Σ Alpha	92 / n.s. 109 / n.s.	92 / n.s. 103 / n.s.	79 / n.s. 102 / n.s.	86 / 0,01 98 / n.s.	109 / n.s. 96 / n.s.

3.2.2.2.5 Hemmung durch alle vier Enzyminhibitoren

Der Gesamtmetabolismus von NNK wurde nicht signifikant beeinflusst und zeigte keine Dosisabhängigkeit (Tab. 3-22). Von den einzelnen NNK-Metaboliten wurde die Bildung von NNK-N-Oxid am stärksten beeinflusst. (Abb. 3-41). Mit je 1 μM der Hemmstoffe wurde die Bildung bei 49 μM NNK bereits signifikant um 28% reduziert, ab 5 μM konnte bei beiden

NNK-Konzentrationen keine NNK-N-Oxid-Bildung mehr nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von je 50 µM der Hemmstoffe war die Bildung der Ketosäure tendenziell unabhängig von der Dosis erhöht, signifikant im nanomolaren Bereich nur bei 5 µM, im mikromolaren Bereich bei 1 und 5 µM. Die Bildung von NNAL schwankte bei 46 nM NNK dosisunabhängig zwischen 97 und 109% der Kontrolle. Bei 49 µM NNK wurde durchwegs etwas mehr NNAL gebildet, signifikant mit 12% bei 50 µM. Die Bildung von Hydroxysäure war bei 46 nM NNK erst bei 25 und 50 µM signifikant um 14% bzw. 63% erhöht. Im mikromolaren Bereich war sie durchwegs erhöht bis auf 135% der Kontrolle bei 10 µM der Hemmstoffe.

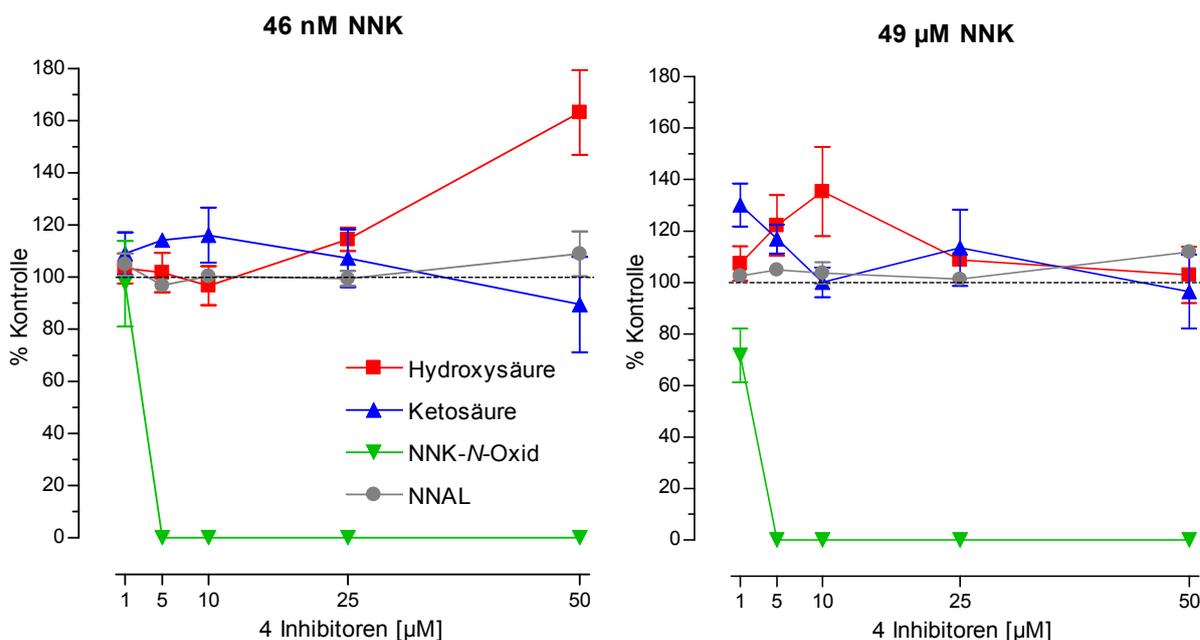


Abbildung 3-41 Lungenmikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus durch alle vier Hemmstoffe; Prozent der Kontrolle (MW ± SD; N = 3)

Tabelle 3-22 Lungenmikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch alle vier Hemmstoffe bei 46 nM NNK und 49 µM NNK; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [µM]	1	5	10	25	50
Gesamt	105 / n.s. 104 / n.s.	95 / n.s. 102 / n.s.	98 / n.s. 101 / n.s.	98 / n.s. 98 / n.s.	108 / n.s. 104 / n.s.
Hydroxysäure	103 / n.s. 107 / n.s.	102 / n.s. 122 / n.s.	97 / n.s. 135 / n.s.	114 / 0,05 109 / 0,001	163 / 0,05 103 / n.s.
Ketosäure	109 / n.s. 130 / 0,05	114 / 0,05 117 / 0,05	116 / n.s. 100 / n.s.	107 / n.s. 114 / n.s.	89 / n.s. 97 / n.s.
NNK-N-Oxid	98 / n.s. 72 / 0,05	0 / 0,01 0 / 0,01	0 / 0,01 0 / 0,01	0 / 0,01 0 / 0,01	0 / 0,01 0 / 0,01
NNAL	105 / n.s. 103 / n.s.	97 / n.s. 105 / n.s.	100 / n.s. 104 / n.s.	99 / n.s. 101 / n.s.	109 / n.s. 112 / 0,01

Bei beiden NNK-Konzentrationen blieb der Anteil der Carbonylreduktion am Gesamtmetabolismus auf Ausgangsniveau, mit Ausnahme von 50 µM der Hemmstoffe bei 49 µM

NNK. Hier stieg der Anteil signifikant um 7% an (Abb. 3-42, Tab. 3-23). Die α -Hydroxylierung nahm bei beiden Konzentrationen zu. Im nanomolaren Bereich stieg der Anteil an diesem Stoffwechselweg um 1-19%, signifikant nur bei 5 und 25 μ M. im mikromolaren Bereich war der Anstieg um 13-18% durchwegs signifikant, nur bei 50 μ M war der Anteil mit 96% leicht unter dem Kontrollwert. Der Anteil der *N*-Oxidation war bereits bei 1 μ M auf 93% (46 nM NNK) bzw. 69% (49 μ M NNK) der Kontrolle erniedrigt. Bei höheren Hemmstoffkonzentrationen konnte der Anteil bei beiden NNK-Konzentrationen wegen zu geringer *N*-Oxidation nicht mehr bestimmt werden.

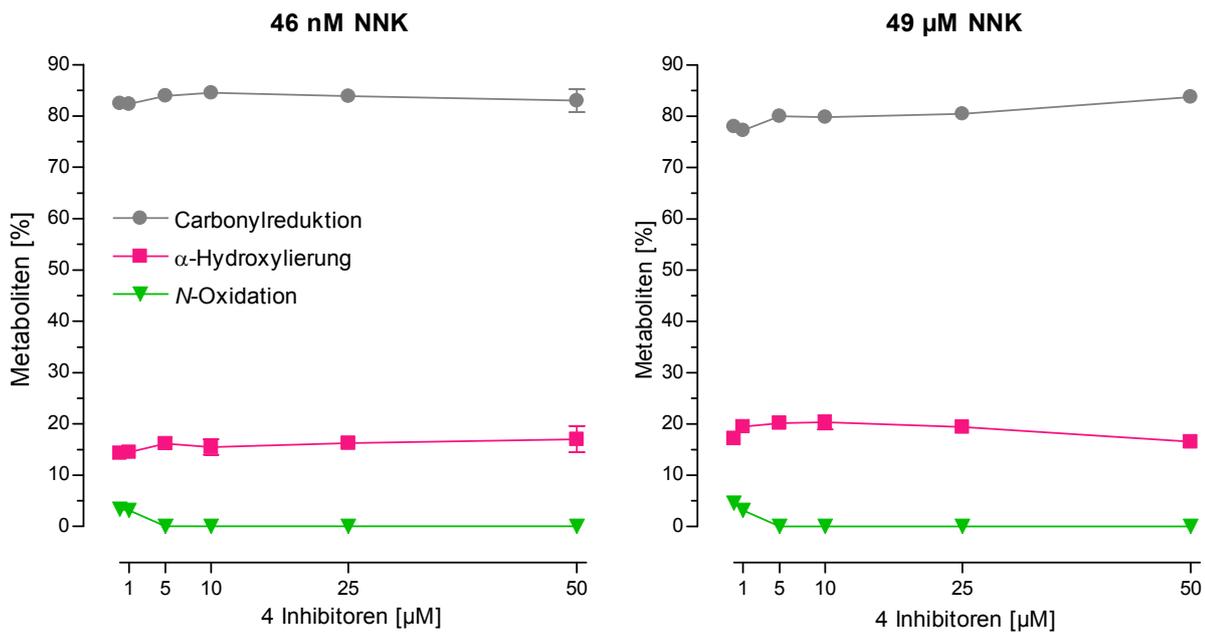


Abbildung 3-42 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung aller vier Hemmstoffe in Kombination auf die Stoffwechselwege von NNK (MW \pm SD; N = 3)

Tabelle 3-23 Lungenmikrosomen: Einfluss aller vier Inhibitoren bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / $p <$

Inhibitor [μ M]	1	5	10	25	50
Hydroxysäure	99 / n.s. 104 / n.s.	107 / n.s. 119 / n.s.	99 / n.s. 133 / 0,05	117 / 0,001 111 / 0,05	152 / n.s. 99 / n.s.
Ketosäure	104 / n.s. 126 / 0,05	120 / 0,01 114 / n.s.	119 / n.s. 99 / n.s.	110 / n.s. 115 / n.s.	83 / n.s. 93 / n.s.
NNK- <i>N</i> -Oxid	93 / n.s. 69 / 0,05	0 / 0,01 0 / 0,01	0 / 0,01 0 / 0,01	0 / 0,01 0 / 0,01	0 / 0,01 0 / 0,01
NNAL	100 / n.s. 99 / n.s.	102 / 0,05 103 / n.s.	103 / n.s. 102 / n.s.	102 / n.s. 103 / n.s.	101 / n.s. 107 / 0,01
Σ Alpha	101 / n.s. 113 / 0,01	113 / 0,05 117 / 0,01	108 / n.s. 118 / 0,05	113 / 0,05 113 / 0,05	119 / n.s. 96 / n.s.

Die einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung wurden bei den beiden NNK-Konzentrationen unterschiedlich beeinflusst (Abb. 3-43, Tab. 3-23). Der Anteil an Hydroxysäure stieg

im nanomolaren Bereich mit zunehmender InhibitorKonzentration bis auf das 1,5-fache an. Im mikromolaren Bereich hingegen stieg der Anteil bis 10 μM auf das 1,3-fache an und sank danach wieder auf das Ausgangsniveau. Der Anteil an Ketosäure war bei 46 nM NNK bis 25 μM der Hemmstoffe dosisunabhängig um 4-19% erhöht, bei 50 μM auf 83% der Kontrolle erniedrigt. Bei 49 μM NNK stieg er bei 1, 5 und 25 μM der Hemmstoffe um bis zu 26%, bei 10 und 50 μM war er auf Kontrollniveau bzw. leicht erniedrigt.

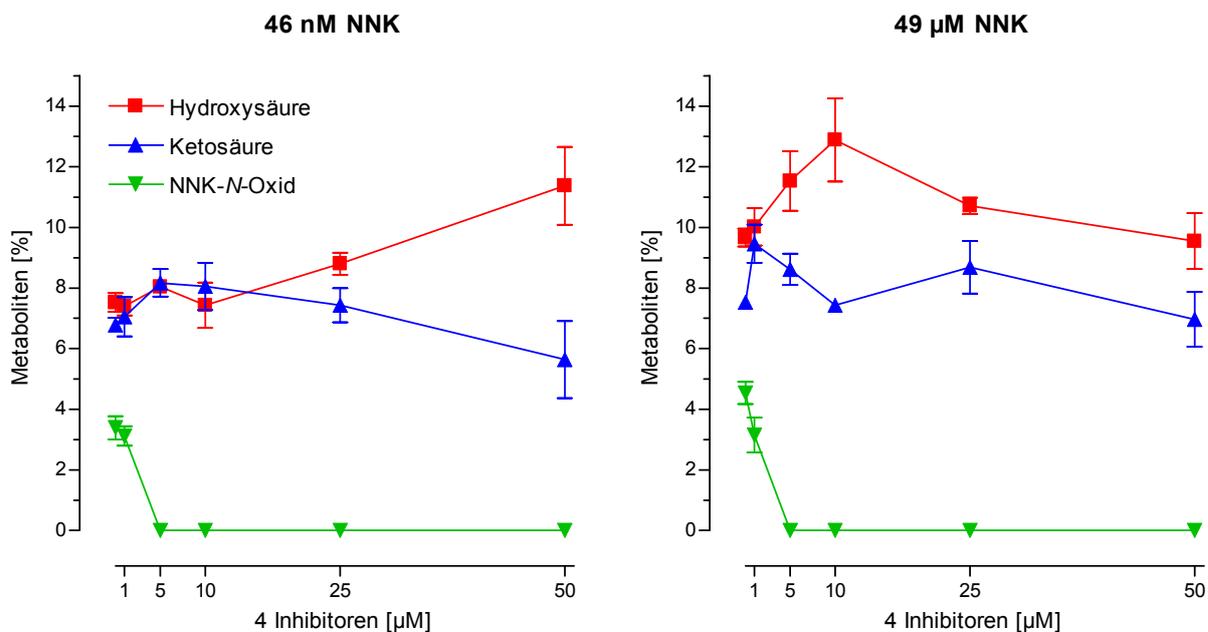


Abbildung 3-43 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung aller vier Inhibitoren in Kombination auf die Bildung der einzelnen Metaboliten von NNK (MW \pm SD; N = 3)

3.2.3 Einfluss von Nicotin und Cotinin

3.2.3.1 Lebermikrosomen

Der Gesamtumsatz von NNK nahm im nanomolaren Bereich durch den Zusatz der 300-fachen Konzentration an Nicotin um 4% zu. Die 3000-fache Konzentration an Cotinin sowie die kombinierte Nicotin- und Cotiningabe bewirkten eine signifikante Hemmung um 11% (Tab. 3-24). Die Bildung der Hydroxysäure wurde weder von Nicotin noch von Cotinin gehemmt, durch die Kombination sogar nicht signifikant um 6% gesteigert (Abb. 3-44). Obwohl Nicotin auch die Ketosäurebildung nicht hemmte, verstärkte es den signifikanten Hemmeffekt von Cotinin deutlich von 84% auf 63% der Kontrolle. NNK-N-Oxid wurde durch Nicotin nicht signifikant um das 1,4-fache erhöht, Cotinin hatte alleine keinen Einfluss, schwächte in der Kombination aber den Nicotineffekt. Wie bei der Ketosäure wurde auch die HPB-Bildung durch Nicotin nicht, aber durch Cotinin signifikant gehemmt. Dagegen schwächte in der Kombination Nicotin den Hemmeffekt von Cotinin. Die NNAL-Bildung nahm durch den Zusatz von

Nicotin nicht signifikant um 4% zu, Cotinin alleine und die Kombination mit Nicotin bewirkte dagegen eine signifikante Hemmung um 9%.

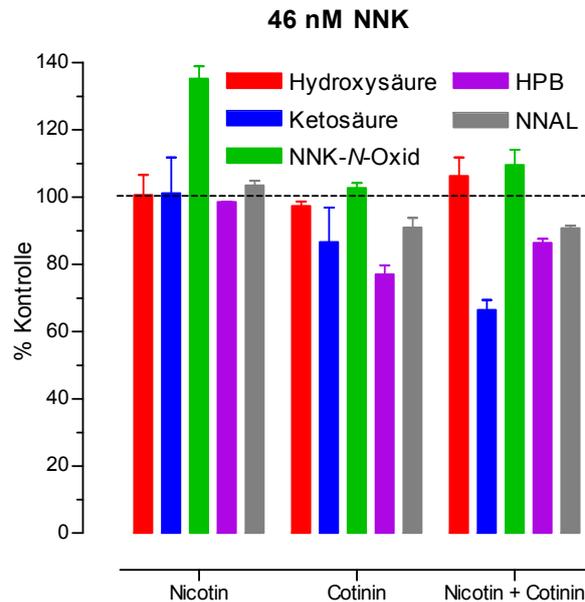


Abbildung 3-44 Lebermikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus bei 46 nM NNK durch Nicotin und Cotinin; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Der Anteil der Carbonylreduktion an den Hauptstoffwechselwegen des NNK wurde nicht beeinflusst (Abb. 3-45, Tab. 3-25). Der Anteil der α -Hydroxylierung nahm mit Nicotin um 4% und mit Cotinin allein und in Kombination mit Nicotin um 7% ab. Die *N*-Oxidation nahm mit Nicotin um 32%, mit Cotinin um 12% und in der Kombination um 23% zu.

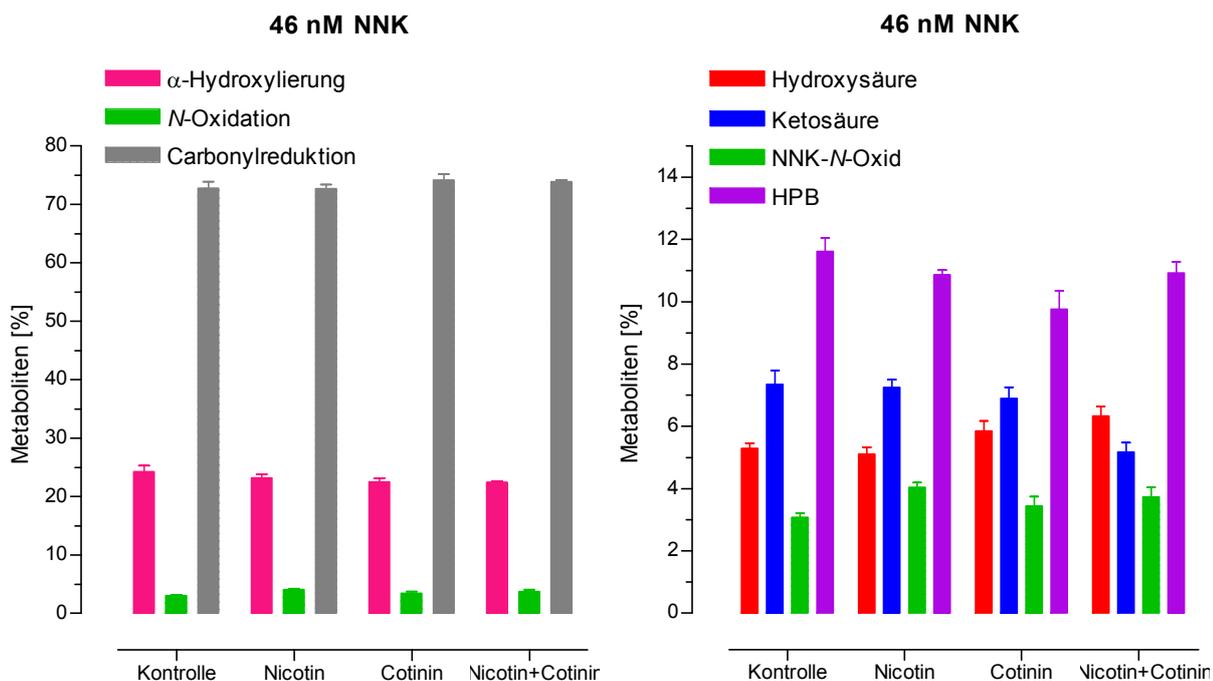


Abbildung 3-45 Lebermikrosomen: Hemmwirkung von Nicotin und Cotinin auf die Stoffwechselwege und die Bildung der einzelnen Metaboliten bei 46 nM NNK (MW \pm SD; N = 3)

Der Anteil der einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung wurde unterschiedlich beeinflusst. Die Hydroxysäure nahm durch Nicotin alleine leicht um 3% ab. Cotinin alleine steigerte dagegen den Anteil der Hydroxysäure um 11% und in Kombination mit Nicotin sogar um 19%. Der Anteil an Ketosäure blieb mit Nicotin unverändert und sank mit Cotinin um 4%. Nicotin und Cotinin zusammen senkten den Anteil signifikant um 29%. HPB blieb mit 94 bzw. 95% der Kontrolle durch den Zusatz von Nicotin, sowie Nicotin und Cotinin knapp unter Ausgangsniveau. Der alleinige Zusatz von Cotinin reduzierte den Anteil an HPB um 16%.

Tabelle 3-24 Lebermikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch Nicotin und Cotinin bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK; Prozent der Kontrolle / p <

	Nicotin	Cotinin	Nicotin + Cotinin
Gesamt	104 / n.s. 54 / 0,001	89 / 0,01 34 / 0,001	89 / 0,01 34 / 0,001
Hydroxysäure	100 / n.s. 94 / n.s.	99 / n.s. 113 / n.s.	106 / n.s. 124 / n.s.
Ketosäure	103 / n.s. 67 / 0,01	84 / 0,05 0 / 0,001	63 / 0,05 0 / 0,001
NNK-N-Oxid	137 / n.s. 71 / n.s.	100 / n.s. 60 / 0,05	110 / n.s. 67 / 0,05
HPB	97 / n.s. 20 / 0,01	75 / 0,05 0 / 0,001	84 / n.s. 0 / 0,001
NNAL	104 / n.s. 55 / 0,001	91 / 0,05 36 / 0,001	91 / 0,05 36 / 0,001

Tabelle 3-25 Lebermikrosomen: Einfluss von Nicotin und Cotinin bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / p <

	Nicotin	Cotinin	Nicotin + Cotinin
Hydroxysäure	97 / n.s. 175 / 0,05	111 / n.s. 336 / 0,01	119 / 0,05 362 / 0,01
Ketosäure	100 / n.s. 124 / 0,05	94 / n.s. 0 / 0,001	71 / 0,05 0 / 0,001
NNK-N-Oxid	132 / n.s. 132 / n.s.	112 / n.s. 179 / 0,05	123 / n.s. 196 / 0,01
HPB	94 / n.s. 38 / 0,01	84 / n.s. 0 / 0,01	95 / n.s. 0 / 0,01
NNAL	100 / n.s. 102 / n.s.	102 / n.s. 107 / 0,05	102 / n.s. 103 / n.s.
Σ Alpha	96 / n.s. 92 / 0,001	93 / n.s. 73 / 0,05	93 / n.s. 78 / 0,05

Im mikromolaren Bereich wurde der Gesamtmetabolismus von NNK durch Nicotin signifikant um die Hälfte, durch Cotinin alleine und in Kombination mit Nicotin auf ein Drittel der Kontrolle gesenkt (Tab. 3-24). Die Bildung der Hydroxysäure wurde nur durch Nicotin

leicht gehemmt, durch Cotinin und in der Kombination nicht signifikant um 13% bzw. 24% gesteigert (Abb. 3-46). Die Bildung von Ketosäure nahm durch den Zusatz von Nicotin signifikant um 33% ab und wurde durch Cotinin sowie der Kombination beider Stoffe vollständig unterdrückt. Das gleiche gilt für HPB, nur hemmte hier auch Nicotin alleine die Bildung bereits um 80% der Kontrolle. Die Bildung von NNK-*N*-Oxid wurde um 29-40% reduziert, die stärkste Hemmung konnte durch Cotinin alleine beobachtet werden. Auch die NNAL-Bildung wurde signifikant gehemmt, auf knapp die Hälfte durch Nicotin und auf ein Drittel durch Cotinin allein und in Kombination mit Nicotin.

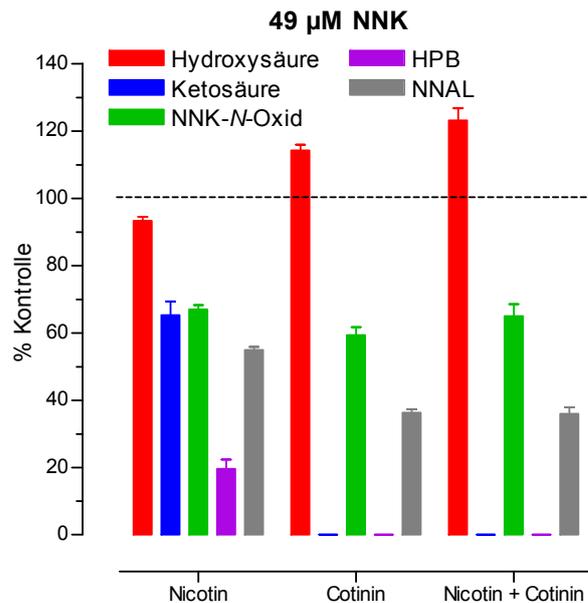


Abbildung 3-46 Lebermikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus bei 49 μ M NNK durch Nicotin und Cotinin; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

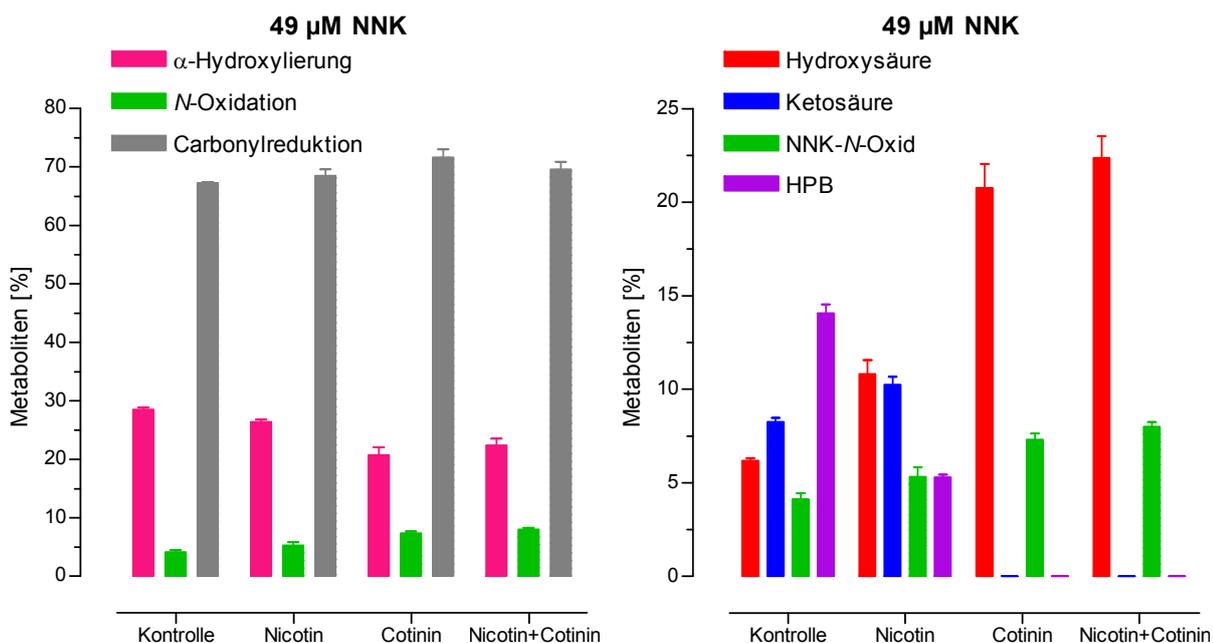


Abbildung 3-47 Lebermikrosomen: Hemmwirkung von Nicotin und Cotinin auf die Stoffwechselwege und die Bildung der einzelnen Metaboliten bei 49 μ M NNK (MW \pm SD; N = 3)

Der Anteil der Carbonylreduktion von NNK nahm im mikromolaren Bereich nur durch Cotinin alleine signifikant um 7% zu (Abb. 3-47, Tab. 3-25). Der Anteil der α -Hydroxylierung wurde signifikant gehemmt, am stärksten durch Cotinin alleine um 27%, durch Nicotin um 8% und durch die Kombination um 22%. Die *N*-Oxidation nahm dagegen deutlich zu, mit Nicotin um ein Drittel und mit Cotinin allein wie in Kombination mit Nicotin auf das 1,8- bzw. 2-fache.

Der Anteil der einzelnen Metaboliten der α -Hydroxylierung wurde unterschiedlich beeinflusst. Der Anteil an Hydroxysäure erhöhte sich signifikant, durch Nicotin fast um das Doppelte, durch Cotinin alleine und in Kombination auf über das Dreifache der Kontrolle. Ketosäure und HPB trugen nach Zugabe von Cotinin alleine und in Kombination mit Nicotin nicht mehr messbar zur α -Hydroxylierung bei. Nicotin steigerte dagegen den Anteil der Ketosäure signifikant um 24%, während der HPB-Anteil auf ein Drittel der Kontrolle gesenkt wurde.

3.2.3.2 Lungenmikrosomen

Der Gesamtumsatz von NNK wurde bei 46 nM signifikant gehemmt, um 7% durch Nicotin und um 14% durch Cotinin alleine und in Kombination mit Nicotin (Tab. 3-26). Die Bildung von Hydroxysäure wurde nur durch Cotinin alleine signifikant um 21% erhöht (Abb. 3-48). Die Ketosäurebildung dagegen nur durch die Kombination signifikant um 10% reduziert. Die leichte Erhöhung von NNK-*N*-Oxid durch Nicotin und Cotinin um 6% bzw. 10% erreichte keine Signifikanz und ging in der Kombination verloren. Die NNAL-Bildung wurde signifikant um 9-19% gehemmt, die stärkste Wirkung wurde dabei mit Cotinin erzielt.

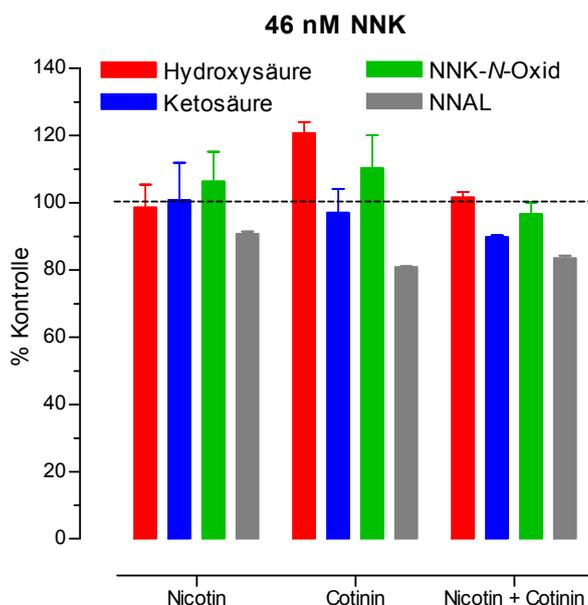


Abbildung 3-48 Lungenmikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus bei 46 nM NNK durch Nicotin und Cotinin; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Der Anteil der Carbonylreduktion an den Hauptstoffwechselwegen des NNK wurde durch Cotinin geringfügig, aber signifikant, um 6% gehemmt. In Kombination mit Nicotin verringerte die Hemmung auf 3% (Abb. 3-49, Tab. 3-27). Der Anteil der α -Hydroxylierung wurde durch Cotinin alleine am stärksten um etwa ein Drittel erhöht. Die geringe Steigerung um 7% durch Nicotin erreichte keine Signifikanz. Nicotin schwächte in der Kombination den Cotinineffekt auf 12% ab. Die *N*-Oxidation nahm nicht signifikant um 13-28% zu, den größten Einfluss hatte wiederum Cotinin alleine.

Die anteilige Bildung nahm für beide Metaboliten der α -Hydroxylierung zu, erreichte mit 4-13% bei der Ketosäure aber keine Signifikanz. Bei der Hydroxysäure war die Steigerung um 40% und 18% durch Cotinin alleine bzw. in Kombination signifikant.

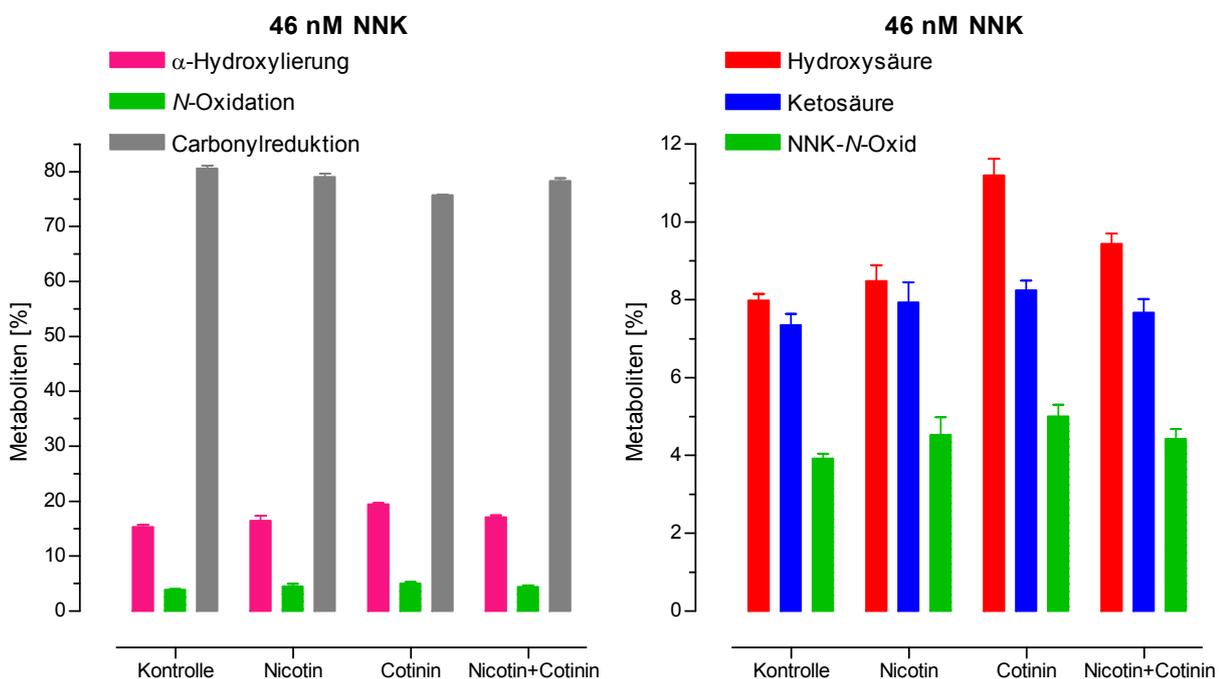


Abbildung 3-49 Lungenmikrosomen: Hemmwirkung von Nicotin und Cotinin auf die Stoffwechselwege und die Bildung der Metaboliten bei 46 nM NNK (MW \pm SD; N = 3)

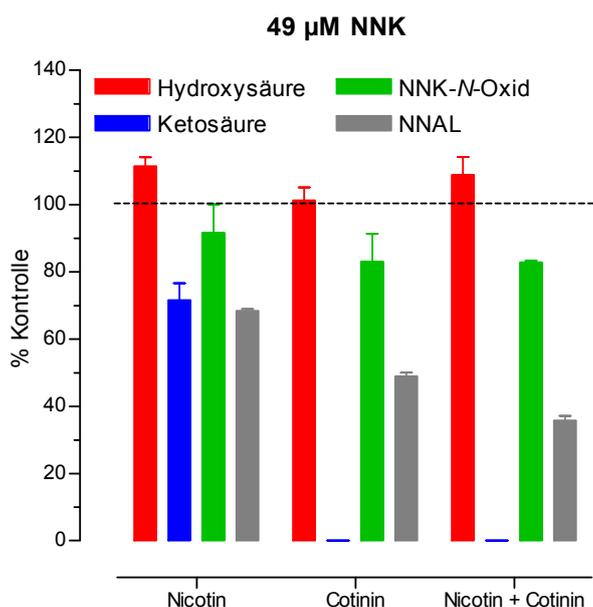
Tabelle 3-26 Lungenmikrosomen: Hemmung des NNK-Metabolismus durch Nicotin und Cotinin bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor	Nicotin	Cotinin	Nicotin + Cotinin
Gesamt	93 / 0,05 74 / 0,001	86 / 0,01 52 / 0,001	86 / 0,01 42 / 0,001
Hydroxysäure	99 / n.s. 111 / n.s.	121 / 0,05 101 / n.s.	102 / n.s. 109 / n.s.
Ketosäure	101 / n.s. 72 / 0,05	97 / n.s. 0 / 0,001	90 / 0,001 0 / 0,001
NNK-N-Oxid	106 / n.s. 92 / n.s.	110 / n.s. 83 / n.s.	97 / n.s. 83 / 0,001
NNAL	91 / 0,01 68 / 0,001	81 / 0,001 49 / 0,001	83 / 0,01 36 / 0,001

Tabelle 3-27 Lungenmikrosomen: Einfluss von Nicotin und Cotinin bei 46 nM NNK und 49 μ M NNK auf den prozentualen Anteil der Metaboliten; Prozent der Kontrolle / p <

Inhibitor [μ M]	Nicotin	Cotinin	Nicotin + Cotinin
Hydroxysäure	106 / n.s. 150 / 0,01	140 / 0,05 196 / 0,01	118 / 0,01 260 / 0,01
Ketosäure	109 / n.s. 97 / n.s.	113 / n.s. 0 / 0,01	104 / n.s. 0 / 0,01
NNK-N-Oxid	115 / n.s. 124 / n.s.	128 / n.s. 162 / n.s.	113 / n.s. 197 / 0,001
NNAL	98 / n.s. 92 / 0,01	94 / 0,01 95 / 0,05	97 / 0,05 85 / 0,05
Σ Alpha	107 / n.s. 125 / 0,05	127 / 0,01 103 / n.s.	112 / 0,01 136 / 0,05

Im mikromolaren Bereich wurde der Gesamtmetabolismus von NNK durch die Tabakalkaloide hoch signifikant und wesentlich stärker als im nanomolaren Bereich gehemmt, um ein Viertel durch Nicotin, auf die Hälfte durch Cotinin und um 58% durch die Kombination von Nicotin und Cotinin (Tab. 3-26). Die Hemmung war bei der Ketosäure am stärksten ausgeprägt (Abb. 3-50). Durch Nicotin wurde die Bildung um 28% reduziert, nach Zusatz von Cotinin alleine oder in der Kombination war keine Ketosäure mehr nachweisbar. Die Hydroxysäure erhöhte sich dagegen nicht signifikant um 11% und 9% durch Nicotin alleine und in Kombination mit Cotinin. Die Bildung von NNK-N-Oxid wurde durch Nicotin um 8%, durch Cotinin alleine und in Kombination um 17% erniedrigt. Vergleichbar mit dem Gesamtmetabolismus wurde die Reduktion zu NNAL hoch signifikant gehemmt, durch Nicotin um ein Drittel, durch Cotinin auf die Hälfte und durch Nicotin und Cotinin gemeinsam um knapp zwei Drittel.

Abbildung 3-50 Lungenmikrosomen Hemmung des NNK-Metabolismus bei 49 μ M NNK durch Nicotin und Cotinin; Prozent der Kontrolle (MW \pm SD; N = 3)

Der Anteil der Carbonylreduktion von NNK nahm im mikromolaren Bereich durch den Zusatz von Nicotin bzw. Cotinin signifikant um 8 bzw. 5% und in Kombination um 15% ab (Abb. 3-51, Tab. 3-27). Der Anteil der α -Hydroxylierung erhöhte sich dagegen durch Nicotin alleine und in Kombination mit Cotinin signifikant um 25% bzw. 36%. Die deutliche Zunahme der *N*-Oxidation, um ein Viertel durch Nicotin, um die Hälfte durch Cotinin und auf das Doppelte durch beide Alkaloide, erreichte wegen der hohen Streuungen nur bei Kombination Signifikanz.

Der Anteil der beiden Metaboliten der α -Hydroxylierung wurde unterschiedlich beeinflusst. Nicotin steigerte den Anteil der Hydroxysäure signifikant um 50% und hatte keinen Einfluss auf den Anteil der Ketosäure. Cotinin alleine und in Kombination mit Nicotin erhöhte den Anteil der Hydroxysäure um das 2- und 2,5-fache, unterdrückte dagegen die Bildung von Ketosäure vollständig.

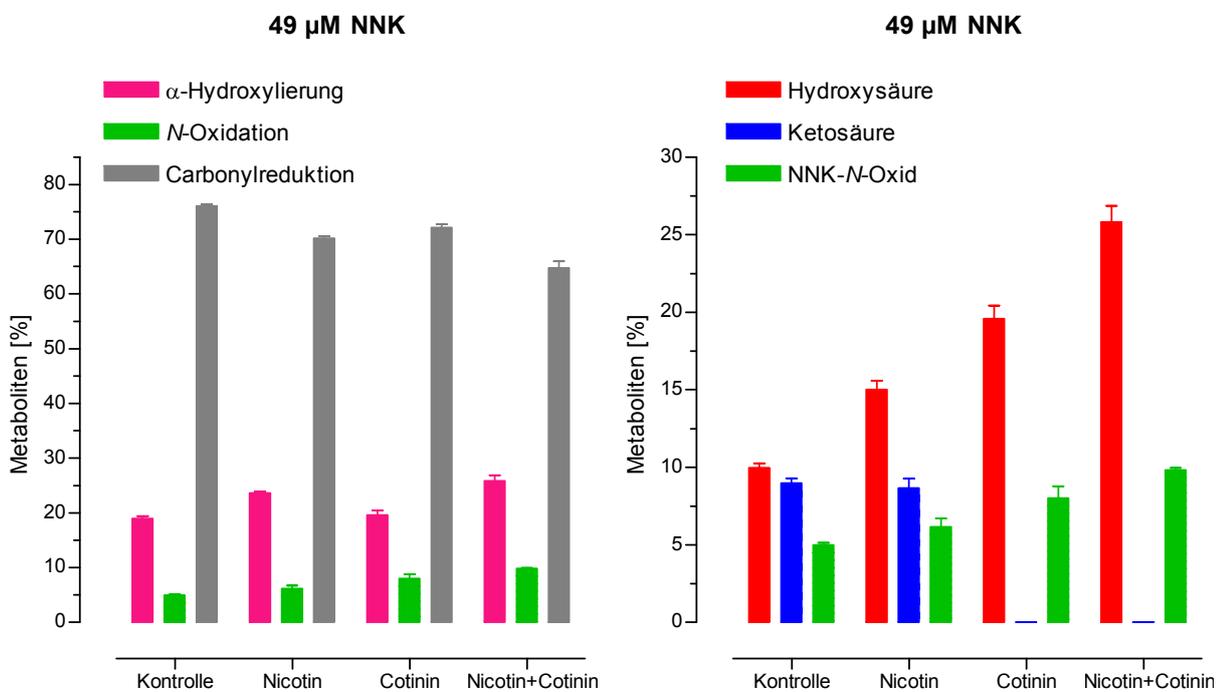


Abbildung 3-51 Lungenmikrosomen: Hemmwirkung von Nicotin und Cotinin auf die Stoffwechselwege und die Bildung der Metaboliten bei 49 µM NNK (MW \pm SD; N = 3)

4 Diskussion

4.1 HPLC-Analytik

Mit der Etablierung des neuen Radioaktivitätsdetektors Ramona Quattro™ gelang es, die Nachweisgrenzen (LOD) deutlich zu senken. Lagen die LOD mit dem Vorgängermodell Ramona STAR™ noch mit 33,3 - 71,4 ppm im unteren Bereich der LOD, wie sie auch mit HPLC-UV erreicht werden (20 - 250 ppm [160]), konnten sie durch die Verwendung des Mehrkanaldetektors soweit gesenkt werden (2,4 - 4,6 ppm), dass sie nur um den Faktor 10 - 100 höher lagen, als die mit LC-MS/MS erzielten (0,01 - 0,12 ppm [161]). Der entscheidende Vorteil der Verwendung von radioaktiv markiertem NNK ist in der einfachen Durchführung und Zuverlässigkeit der Analysen zu sehen. Selbst mit aufwändiger Vorreinigung können bei Anwendung eines UV-Detektors die Peaks insbesondere im niedrigen Konzentrationsbereich nicht eindeutig den NNK-Metaboliten zugeordnet werden. Eine LC-MS/MS-Anlage stand uns nicht zur Verfügung.

Für den verwendeten Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 400 µL war es möglich, bei einer NNK-Konzentration von 5 - 6 nM die mikrosomale Bildung von Metaboliten im Ausmaß von 0,1% des NNKs zu bestimmen. Niedrigere Konzentrationen wären durch eine Erhöhung des Gesamtvolumens des Ansatzes bei gleich bleibender NNK-Konzentration möglich. Dies war jedoch für die hier durchgeführten Versuche nicht erforderlich.

4.2 Mikrosomaler Metabolismus von NNK

Am mikrosomalen Umsatz von NNK sind eine Reihe von Enzymen beteiligt, die nicht alle zur Familie der CYP gehören [40]. Auch werden die gemessenen Endprodukte nicht immer nur über eine Reaktion erreicht. Dies gilt allgemein für die Folgemetaboliten von NNAL, dem Reduktionsprodukt von NNK. Die Keto- und Hydroxysäure können über die durch α -Methylenhydroxylierung spontan entstehenden Aldehyde, aber auch durch Weiterverstoffwechslung der Alkohole HPB und Diol gebildet werden. Zur Unterscheidung wurde in früheren Untersuchungen Na-Bisulfit als Aldehydfänger eingesetzt. Es stellte sich jedoch heraus, dass Na-Bisulfit generell den NNK-Stoffwechsel hemmt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Einsatz von Na-Bisulfit verzichtet.

Die gepoolten Lebermikrosomen setzten NNK zu den Metaboliten Hydroxysäure, Keto-säure, NNK-*N*-Oxid, HPB und NNAL um. Die in anderen Studien [10] gefundenen weiteren Metaboliten Diol und NNAL-*N*-Oxid wurden nicht nachgewiesen. Die Lungenmikrosomen bildeten nur die Metaboliten Hydroxysäure, Ketosäure, NNK-*N*-Oxid und NNAL. Neben Diol und NNAL-*N*-Oxid konnte auch HPB nicht detektiert werden.

Das Fehlen der *N*-Oxidation von NNAL kann darin begründet sein, dass der Umsatz unterhalb der Nachweisgrenze lag, da bereits die *N*-Oxidation von NNK nur in geringem Umfang auftrat. Bei dem Metaboliten Diol gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder verlief die α -Methylhydroxylierung von NNAL in so geringem Ausmaß, dass Diol nicht detektierbar war, oder Diol wurde nahezu vollständig in Hydroxysäure weiter verstoffwechselt. Das Fehlen von HPB in den Inkubationen mit Lungenmikrosomen kann analog an zu geringer Bildung oder Weiterverstoffwechslung zur Ketosäure liegen.

4.2.1 Kinetik

Verglichen mit den kinetischen Parametern anderer Studien ergaben sich für den mikromolaren Konzentrationsbereich starke Abweichungen [10]. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen sind die Ergebnisse abhängig von den Versuchsbedingungen wie Inkubationszeit, Substratkonzentration und Konzentration des mikrosomalen Proteins, zum anderen spielt die Enzymexpression im verwendeten Gewebe eine wichtige Rolle. Der Umsatz kann je nach Enzymexpression um den Faktor 10 variieren [155,158,159,162]. Durch Verwendung gepoolter Mikrosomen wurden repräsentative Bedingungen für ein großes Kollektiv geschaffen.

Im Gegensatz zu den bisher publizierten Studien wurde die Kinetik des mikrosomalen NNK-Umsatzes über einen weiten Konzentrationsbereich untersucht, der sich bis in den unteren nanomolaren Konzentrationsbereich ausdehnte. Dies ging von der Überlegung aus, dass die geringen Mengen an NNK, die durch Genuss von Tabakwaren vom Menschen aufgenommen werden, nicht zu mikromolaren Konzentrationen in Lunge und Leber führen können [15,163,164]. Außerdem gab es Hinweise aus Untersuchungen mit Gewebeschnitten von Menschen und Labornagern, dass im nanomolaren Konzentrationsbereich bei Anpassung an eine Michaelis-Menten-Kinetik mit wesentlich niedrigeren k_m - und V_{max} -Werten für NNK zu rechnen ist, als bei mikromolaren Konzentrationen [9,165]. Es war also zu erwarten, dass die Enzymkinetik über einen so großen Konzentrationsbereich nicht zwangsläufig einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik entsprechen muss [166,167]. Die Untersuchungen mit Gewebeschnitten hatten auch gezeigt, dass die katalytische Effizienz, der Quotient aus V_{max}/k_m -Werten, in beiden Konzentrationsbereichen meist eng zusammenlag. Damit ist die Verstoffwechslung sowohl bei hoher, als auch bei niedriger Substratkonzentration ähnlich effizient.

4.2.1.1 NNAL

Die Carbonylreduktion von NNK zu NNAL verläuft in der mikrosomalen Zellfraktion hauptsächlich über die 11β -Steroiddehydrogenase TYP 1 (11β -HSD-1), im Cytosol auch

über eine Reihe von Carbonylreduktasen [168]. Neuerdings wird insbesondere in der Lunge die Beteiligung von CYP-vermittelter NNK-Reduktion diskutiert [156]. Die Studie stützt sich auf Korrelationen der intraindividuellen Unterschiede im mikrosomalen NNK-Stoffwechsel und der Expression von CYP2A13 in humanem Lungengewebe. Ein direkter Beweis für die katalytische Aktivität durch das isolierte Isoenzym wie sie von *Maser et al.* für die 11 β -HSD-1 gezeigt wurde [166], steht jedoch noch aus.

Unterschiede in der Kinetik der NNK-Reduktion zu NNAL im nanomolaren und mikromolaren Bereich wurden erstmals von *Richter et al.* [165] für Leber-, Lungen- und Nierenschnitte von Hamstern beschrieben. *Maser et al.* [166] konnten dann mit gereinigter 11 β -HSD-1 aus Humanleber zeigen, dass dieses Enzym als Dimeres vorliegt und zwei aktive Bindungsstellen aufweist. Die erste Bindungsstelle wird bereits bei niedriger Konzentration besetzt. Dadurch kommt es entweder zu einem erschwerten Zugang zur zweiten Bindungsstelle, oder zu einer Konformationsänderung des Enzyms, so dass die zweite Bindungsstelle erst bei höherer Substratkonzentration besetzt werden kann. Es resultieren zwei unterschiedliche Kinetiken, eine im nanomolaren (erste Bindungsstelle) und eine im mikromolaren Bereich (zweite Bindungsstelle). Diese biphasische Kinetik wurde später auch für Lungenschnitte von Mensch, Ratte und Maus beschrieben [9] und in der vorliegenden Arbeit für Humanmikrosomen eindrucksvoll bestätigt. Die k_m -Werte lagen bei Anpassung an den Umsatz im nanomolaren Bereich um das 25- und 50-fache in Leber bzw. Lunge niedriger als im mikromolaren Bereich (Tab. 3-3). Die V_{max} -Werte nahmen in etwas geringerem Umfang ab, so dass die katalytische Effizienz im toxikologisch relevanten nanomolaren Bereich leicht erhöht war.

Die Fähigkeit der 11 β -HSD-1 zur Reduktion von NNK auch in niedrigen Konzentrationen ist insofern bedeutsam, als dass dieser Schritt zur Entgiftung von NNK beiträgt. Das gebildete NNAL kann beim Menschen direkt oder nach Glucuronidierung über den Urin ausgeschieden werden. Eine Erhöhung des Krebsrisikos für Tabakkonsumenten ist dann möglich, wenn die geringere Beteiligung dieses Enzyms in der Lunge nicht durch andere Enzyme ausgeglichen wird, die ebenfalls in niedrigen Konzentrationen katalytisch wirksam sind. Nach *Weng et al.* [169] ist die Kanzerogenität von NNK jedoch stark vom Zielgewebe abhängig. So läuft in der Lunge von Mäusen vermehrt die Verstoffwechslung zu reaktiven Metaboliten, in der Leber vermehrt die zu entgifteten Metaboliten ab. Wie aber bereits anhand der im Urin enthaltenen Metaboliten von NNK nachgewiesen, sind Art und Umfang der Verstoffwechslung zwischen verschiedenen Spezies nicht vergleichbar [145,170-173], so dass die im Tierversuch erhaltenen Ergebnisse nicht auf den Menschen zutreffen müssen.

4.2.1.2 HPB und Ketosäure

Für die α -Hydroxylierungsprodukte von NNK konnte in den Mikrosomen im Gegensatz zu Untersuchungen mit Gewebeschnitten [9,165] keine Abweichung der Kinetik bei niedriger Substratkonzentration im Vergleich zur hohen festgestellt werden. Der enzymatische Abbau von NNK über die α -Methyl- und α -Methylenhydroxylierung läuft also in beiden Konzentrationsbereichen im Durchschnitt mit gleicher Affinität ab. Dies muss aber nicht bedeuten, dass dies für alle an diesen Stoffwechselwegen beteiligten Enzyme gleichermaßen gilt.

4.2.1.3 Hydroxysäure

Für den Metabolit Hydroxysäure konnte eine Abweichung der Kinetik im nanomolaren von der im mikromolaren Bereich beobachtet werden. Somit verläuft die α -Methylenhydroxylierung von NNAL bei niedriger Substratkonzentration anders als bei hoher Substratkonzentration. Nachdem die Hydroxysäure ein Folgemetabolit der NNK-Reduktion zu NNAL darstellt, könnten diese Unterschiede auf dem biphasischen Verlauf dieser Reaktion beruhen. Zudem könnten an der α -Methylenhydroxylierung von NNAL in den beiden Konzentrationsbereichen unterschiedliche Enzyme mit unterschiedlichen Affinitäten beteiligt sein.

Unter Verwendung von Lebermikrosomen ist die Abweichung der Kinetik im niedrigen Konzentrationsbereich von der im hohen stärker als bei Lungenmikrosomen. Die an der Bildung von Hydroxysäure beteiligten Enzyme haben demnach in der Leber eine deutlich größere Affinität zu NNAL als in der Lunge. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass die α -Methylenhydroxylierung eine Giftung darstellt.

4.2.1.4 NNK-N-Oxid

Die Kinetik der NNK-N-Oxidation unterscheidet sich im nanomolaren Bereich ebenfalls von der im mikromolaren Bereich. Die k_m - und V_{max} -Werte sind bei nanomolaren Konzentrationen fast 1000-mal niedriger als bei mikromolaren Konzentrationen (Tab. 3-3). Da NNK im Überschuss vorliegt, kann die unterschiedliche Kinetik der Carbonylreduktion von NNK als Ursache ausgeschlossen werden. Zudem müssten dann auch bei den Metaboliten Ketosäure und HPB unterschiedliche Kinetiken auftreten. Somit ist bei der N-Oxidation von NNK die Beteiligung eines bzw. mehrerer Enzyme mit unterschiedlichen Affinitäten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wahrscheinlich.

4.2.2 Hemmversuche

Die Hemmung verlief unter Verwendung von Lebermikrosomen stärker als unter Verwendung von Lungenmikrosomen. Ein Problem bei der Interpretation der Ergebnisse besteht in der Spezifität der verwendeten Hemmstoffe, die zum Teil auch auf andere CYP einwirken

[174], so dass die Beteiligung der einzelnen Enzyme nur abgeschätzt werden kann. Bei keinem der Hemmversuche konnte selbst unter Verwendung der höchsten Konzentration und auch nicht bei gleichzeitigem Einsatz der vier verschiedenen CYP-Inhibitoren eine vollständige Hemmung der NNK-Verstoffwechslung durch α -Hydroxylierung und *N*-Oxidation erzielt werden. Dies könnte daran liegen, dass andere Enzyme der CYP-Familie wie CYP 2B1, 2B6, 2B7, 2D6 und 2F1, für die eine Beteiligung am Metabolismus von NNK nachgewiesen wurde [40], von diesen Hemmstoffen nicht oder nicht ausreichend erfasst werden. Jedoch konnte auch in anderen bisher publizierte Arbeiten zur Charakterisierung des mikrosomalen NNK-Stoffwechsels der Abbau weder mit einer Vielzahl verschiedener Hemmstoffe noch durch Weglassen des NADPH-regenerierendes Systems und zusätzlicher Begasung mit Kohlenmonoxid vollständig unterdrückt werden [138,151,152,155,157,175,176]. Die unvollständige Hemmung mit CYP-Inhibitoren kann als Hinweis gewertet werden, dass außer an der Reduktion von NNK zu NNAL auch an der α -Hydroxylierung und *N*-Oxidation neben CYP andere Enzyme und Faktoren beteiligt sind wie Peroxidasen, Lipoxygenasen und freie Radikale. Diesbezügliche Untersuchungen schafften ebenfalls keine ausreichende Klarheit [138,139,157,177]. Gleiches gilt für die Bestimmung der beteiligten Enzyme unter Verwendung spezifischer Antikörper [151,178].

4.2.2.1 Hemmung von CYP 1A1/2 durch α -Naphthoflavon (NF)

Hinweise auf eine Beteiligung von CYP 1A2 am NNK-Stoffwechsel in humanen Leber- und Lungenmikrosomen wurden durch *Smith et al.* [138,151] durch Einsatz von 5 und 10 μ M NF als Inhibitor bei 10 μ M NNK erhalten. Die stärkste Hemmung erfuhr die HPB-Bildung in der Leber, die auf die Hälfte reduziert wurde. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen weitgehend überein (Abb. 3-14, Tab. 3-4). Die etwas stärkere Hemmung in unseren Versuchen mit 49 μ M NNK könnte daran liegen, dass in den Inkubationen von *Smith et al.* [151] die Hemmung durch NF durch die Hemmung des Aldehydfängers Na-Bisulfit überlagert war. Im nanomolaren Konzentrationsbereich war die Hemmung der HPB-Bildung noch stärker ausgeprägt. Sie ging bis auf ein Viertel des Kontrollwertes zurück. Die Bildung des einzigen anderen Metaboliten, der von *Smith et al.* gemessen wurde, dem Ketoaldehyd als Vorstufe der Ketosäure, wurde weder in der Leber noch in der Lunge durch NF gehemmt. Hier zeigt sich in unseren Untersuchungen ein deutlicherer Unterschied in den beiden Konzentrationsbereichen. Während bei 49 μ M NNK die Ketosäurebildung sogar leicht erhöht war, kam es bei 46 nM NNK zu einer Hemmung auf etwa dreiviertel der Kontrolle. Qualitativ gleiche Unterschiede, leichte Erhöhung oder keine Hemmung im mikromolaren Bereich und Hemmung bis auf maximal dreiviertel der Kontrolle, gab es für die Reduktion zu NNAL, die Bildung seines α -Hydroxylierungsprodukts Hydroxysäure und die NNK-*N*-Oxidation.

In Lungenmikrosomen konnten *Smith et al.* [138,151] ebenfalls keine Bildung von HPB nachweisen. Unter Weglassen von Na-Bisulfit hemmte NF die Bildung von Ketosäure um 25%, jene von Hydroxysäure um weniger als 10%, NNAL blieb unbeeinflusst [138]. In unseren Lungenmikrosomen war die Hemmung der Ketosäurebildung bei 49 μM NNK stärker ausgeprägt, die Bildung von NNAL und Hydroxysäure sogar um 10% bzw. 40% gesteigert (Abb. 3-29, Tab. 3-14). Im Gegensatz zur Leber war die Wirkung von NF auf die NNK-Verstoffwechslung bei Einsatz von 46 nM NNK weniger stark ausgeprägt. Die Bildung von NNK-*N*-Oxid war bei beiden Konzentrationen leicht gehemmt.

Eine mögliche Erklärung für die beschriebenen Unterschiede zwischen Leber und Lunge könnte die höhere Aktivität von CYP 1A2 in der Leber sein [179]. Das in der Lunge bedeutendere CYP 1A1 wird durch NF mit einer deutlich geringeren Spezifität gehemmt [180]. Dies könnte den geringeren Effekt von NF in der Lunge erklären. Beide Enzyme werden durch Umwelteinflüsse wie Rauchen und Ernährung stark beeinflusst [181,182]. Es werden aber auch Zusammenhänge zwischen genetischen Polymorphismen für CYP 1A1 und CYP 1A2 und einem erhöhten Lungenkrebsrisiko diskutiert [183-185]. Die relativ geringe Hemmwirkung von NF auf nur einen Aktivierungsweg von NNK in der Lunge lässt die mögliche Bedeutung von CYP 1A2 für den Lungenkrebs durch NNK gering erscheinen.

4.2.2.2 Hemmung von CYP 2A6/13 durch 8-Methoxypsoralen (MOP)

CYP 2A Enzyme sind grundsätzlich stärker am NNK-Metabolismus beteiligt als am NNAL-Metabolismus [186]. Das CYP 2A13 ist selektiv in der Lunge exprimiert [187,188], wo es auch an der Carbonylreduktion von NNK zu NNAL beteiligt ist [156]. So wird bei Hemmung der 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase in der Lunge trotzdem NNAL gebildet [189]. Für CYP 2A13 konnte im Gegensatz zu CYP 2A6 eine Korrelation des Enzymlevels mit der Aktivierung von NNK nachgewiesen werden. CYP 2A6 und 2A13 sind effizientere Katalysatoren für die α -Methylenhydroxylierung als für die α -Methylhydroxylierung [156].

Zudem hemmt MOP CYP 2A13 in stärkerem Maße als CYP 2A6 [155]. CYP 2A13 ist unter den an der α -Hydroxylierung beteiligten Enzymen das effektivste mit k_m -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich, gefolgt von CYP 2B6 mit einem ähnlichen k_m -Wert wie CYP 2A13, jedoch mit geringerer katalytischer Effizienz. Im Vergleich zu CYP 2A6 ist die katalytische Effizienz von CYP 2A13 um mehr als den Faktor 100 größer [10,187]. Für die Bedeutung von CYP 2A13 spricht auch die molekularepidemiologische Untersuchung von *Wang et al.* [190], die bei Rauchern mit defizientem CYP 2A13 ein deutlich erniedrigtes Risiko für Adenokarzinome der Lunge zeigte.

MOP hatte nur wenig Einfluss auf den NNK-Stoffwechsel in unseren Lungenmikrosomen (Abb. 3-32, Tab. 3-16). Auch war kein Unterschied zwischen 46 nM und 49 μM NNK

erkennbar. In der Literatur finden sich zwei Arbeiten zum Einfluss von MOP auf den NNK-Abbau in Lungenmikrosomen [155,157]. In beiden Untersuchungen erwies sich MOP als Hemmstoff der α -Hydroxylierung. Allerdings schwankte der Effekt bei der Untersuchung einzelner, nicht gepoolter Mikrosomen stark zwischen einer Hemmung um maximal 30% und einer Steigerung um mehr als das zweifache [157]. Insofern steht der geringe Effekt von MOP auf die α -Hydroxylierung in unseren gepoolten Lungenmikrosomen nicht im Widerspruch zu den Literaturdaten. Die stärkere Tendenz zur Hemmung der *N*-Oxidation fand aber bei uns keine Entsprechung.

Dagegen erwies sich MOP in den Lebermikrosomen als stärkster Hemmstoff der HPB-Bildung, die bei nanomolarer NNK-Konzentration vollständig zum Erliegen kommt (Abb. 3-17, Tab. 3-6). Auch die *N*-Oxidation wurde gehemmt, aber mit starker Schwankung über den Konzentrationsbereich von MOP. Die Ketosäurebildung wurde relativ konstant um 10 bis 30% gehemmt. Hydroxysäure und NNAL schwankten um den Kontrollwert. Insgesamt waren die Unterschiede zwischen 46 nM und 49 μ M NNK relativ gering.

4.2.2.3 Hemmung von CYP 2E1 durch Chlorzoxazon (CZ)

CYP 2E1 ist ein Ethanol-induzierbares Enzym, das eine wichtige Rolle für die Aktivierung von NDMA spielt [191]. Da Alkoholgenuss die tabakassoziierten Krebsarten des oberen Verdauungstrakts sehr stark fördert, war es naheliegend zu vermuten, dass CYP 2E1 auch für die Aktivierung von TSNA eine wichtige Rolle spielt. Die Ergebnisse zu NNK sind aber wenig überzeugend. *Patten et al.* [152] konnten zeigen, dass CYP 2E1 nur bei sehr hohen NNK-Konzentrationen eine gewisse Bedeutung für den NNK-Stoffwechsel hat, insbesondere für die HPB-Bildung. Als Hemmstoff von CYP 2E1 setzen die Autoren NDMA ein. CZ wurde nur in einer Studie zur metabolischen Aktivierung von NNK durch Mauslebermikrosomen verwendet [192]. Als Endpunkt diente dabei die Mutagenität im Ames-Test. CZ erwies sich als relativ schwacher Inhibitor im Vergleich zu MOP, Coumarin und NF.

In den Humanlebermikrosomen erwies sich CZ als effektiver Hemmstoff der α -Hydroxylierung von NNK (Abb. 3-20, Tab. 3-8). Die HPB-Bildung wurde bei beiden NNK-Konzentrationen auf die Hälfte reduziert, während die Hemmung der Ketosäurebildung nur in der niedrigen Konzentration das gleiche Ausmaß erreichte. Die α -Hydroxylierung von NNAL und die NNK-*N*-Oxidation wurden nur bei 49 μ M NNK leicht gehemmt, im nanomolaren Bereich dagegen leicht bzw. deutlich gesteigert. Auf die NNAL-Bildung hatte CZ keinen Einfluss.

Ein völlig anderes Bild zeigte sich bei Verwendung von Lungenmikrosomen (Abb. 3-35, Tab. 3-18). Die Hemmung der α -Hydroxylierung durch CZ war nur bei 49 μ M NNK schwach ausgeprägt und ging im nanomolaren Konzentrationsbereich völlig verloren. Hohe Konzentrationen von CZ hemmten die NNK-*N*-Oxidation.

Die gravierenden Unterschiede der CZ-Wirkung in Leber und Lunge bestätigen die geringe Expression von CYP 2E1 in der Lunge im Vergleich zur Leber [193]. Die Unterdrückung des NNK-Abbaus in der Leber könnte bei Alkoholabusus die Verfügbarkeit von NNK in der Lunge erhöhen und dort zu einer vermehrten Aktivierung führen.

4.2.2.4 Hemmung von CYP 3A4/5 durch Troleandomycin (TAO)

Im Tierversuch an verschiedenen Geweben von Ratten, Mäusen und Affen wurde nur eine geringe Beteiligung von Enzymen der CYP 3A-Familie am NNK-Metabolismus gefunden [175,194,195]. Dabei setzte CYP 3A5 mehr NNK um als CYP 3A4 [138]. In gepoolten Humanlebermikrosomen wurde bei Einsatz von 40 μ M TAO und 20 μ M NNK dagegen in Anwesenheit von Na-Bisulfit die Bildung von Ketoaldehyd und HPB um 46% bzw. 18% gehemmt [152]. In den hier untersuchten Lebermikrosomen war hingegen die HPB-Bildung bei beiden NNK-Konzentrationen um die Hälfte reduziert, deutlich stärker als die Bildung der Ketosäure (Abb. 3-23, Tab. 3-10). Die Werte für Hydroxysäure und NNAL lagen im mikromolaren Bereich tendenziell unter, im nanomolaren Bereich über der Kontrolle.

In humanen Lungenmikrosomen wurde in einer frühen Untersuchung keine Hemmung durch TAO gefunden [138]. In einer weiteren Studie mit nicht gepoolten Mikrosomen wurde die α -Hydroxylierung um bis zu 38%, die *N*-Oxidation bis zu 54% gehemmt. Bei 49 μ M NNK konnten wir nur für die *N*-Oxidation eine Hemmung um 20-30% nachweisen, die Bildung von Keto- und Hydroxysäure schwankte um den Kontrollwert (Abb. 3-38, Tab. 3-20). Während die Hemmung der *N*-Oxidation bei 46 nM NNK weitgehend verloren ging, wurde die α -Hydroxylierung tendenziell gehemmt.

4.2.2.5 Hemmung durch alle vier Enzyminhibitoren

Durch Kombination aller vier Hemmstoffe ergaben sich teilweise geringere Hemmungen als nach Inkubation mit den einzelnen Hemmstoffen. Auffällig ist dies für die HPB-Bildung in Lebermikrosomen, die durch MOP alleine stärker gehemmt wurde. In den Lungenmikrosomen geht die Hemmung der Ketosäurebildung durch NF verloren. Nur die Hemmung der *N*-Oxidation ist in der Kombination am deutlichsten.

4.2.2.6 Vergleich der Hemmstoffwirkung bei nanomolarer und mikromolarer NNK-Konzentration

In den Tabellen 4-1 und 4-2 sind die Wirkungen der verwendeten Hemmstoffe auf den NNK-Stoffwechsel in Leber- bzw. Lungenmikrosomen zusammengefasst. Die Darstellung zeigt die qualitativen Veränderungen in Prozent der Kontrolle nach folgenden Kategorien:

– <10% (keine) \uparrow/\downarrow 10-25% (leicht) $\uparrow\uparrow/\downarrow\downarrow$ 26-50% (mäßig) $\uparrow\uparrow\uparrow/\downarrow\downarrow\downarrow$ >50% (stark)

Unterschiede in den Hemmwirkungen bei nano- und mikromolarer NNK-Konzentration um mehr als eine Kategorie sind rot markiert. Bei unterschiedlicher Wirkung in Abhängigkeit der Hemmstoffkonzentrationen (1-50 μM) werden nur die maximal und minimal erreichten Kategorien angezeigt (konzentrationsabhängiger Verlauf siehe Abbildungen im Ergebnisteil).

Tabelle 4-1 Einfluss der Hemmstoffe auf den NNK-Stoffwechsel in Lebermikrosomen

Hemmstoff	C (NNK)	NNAL		HPB		Ketosäure		Hydroxysäure		NNK-N-Oxid	
		von generell	bis								
NF	46 nM	—	↓↓	—	↓↓↓	—	↓↓	—	↓↓	↑	↓↓
	49 μM	—	—	↑	—	↑	—	↑↑	—	↑	—
MOP	46 nM	↑	↓	↓↓↓	—	—	↓↓	↑	↓	↑	↓↓↓
	49 μM	—	↓	↓↓↓	—	—	↓	—	↓	↓	↓↓
CZ	46 nM	—	—	↓↓	↓↓↓	↓↓	↓↓↓	↑↑	↑	—	↑↑
	49 μM	—	—	↓↓	↓↓↓	—	↓↓	—	↓↓	—	↓
TAO	46 nM	↑	—	↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↑↑	—	—	↓↓↓
	49 μM	—	↓	↓↓	↓↓↓	—	↓↓	—	↓↓	↓	↓↓
alle 4	46 nM	—	—	↓↓	↓↓↓	—	↓	↑↑	↓	↑↑↑	↓↓↓
	49 μM	—	—	↓↓	↓↓↓	—	↓↓	↑↑	—	↓	↓↓↓

Lebermikrosomen zeigten die größten Unterschiede mit NF, dem Hemmstoff von CYP 1A1/2. Hier ergaben sich nur bei der nanomolaren NNK-Konzentration Hemmungen, die insbesondere die α -Hydroxylierung von NNK, etwas weniger die anderen Stoffwechselwege betrafen. Bei 49 μM NNK war dagegen der Abbau z.T. sogar leicht erhöht. Alle anderen Inhibitoren hemmten die α -Methylhydroxylierung von NNK zu HPB bei beiden Konzentrationen mäßig bis stark, die α -Methylenhydroxylierung von NNK zur Ketosäure nur gering bis mäßig, mit Ausnahme von CZ, dem Hemmstoff von CYP 2E1, welcher bei 46 nM NNK z.T. stark hemmte. Deutlichere Unterschiede zwischen der nano- und mikromolaren NNK-Konzentration ergaben sich nur noch bei CZ und TAO für die α -Methylenhydroxylierung von NNAL zur Hydroxysäure und bei CZ für die NNK-N-Oxidation. Eine mäßige Hemmung der Bildung dieser Metaboliten wurde bei 49 μM NNK beobachtet, bei 46 nM NNK z.T. sogar eine mäßige Steigerung.

Bei den Lungenmikrosomen zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den beiden Konzentrationen von NNK. TAO hemmte nur bei 46 nM NNK mäßig die Bildung der Hydroxysäure, aber nicht bei 49 μM . Bei Einsatz aller 4 Hemmstoffe wurde dieser Stoffwechselweg dagegen nur bei der mikromolaren NNK-Konzentration gehemmt, bei 46 nM NNK z.T. sogar stark gesteigert.

Tabelle 4-2 Einfluss der Hemmstoffe auf den NNK-Stoffwechsel in Lungenmikrosomen

Hemmstoff	C (NNK)	NNAL		Ketosäure		Hydroxysäure		NNK-N-Oxid	
		von generell	bis	von generell	bis	von generell	bis	von generell	bis
NF	46 nM	—	—	—	—	↑	—	—	↓
	49 µM	↑	—	↓↓	↓↓	↑↑	—	—	↓↓
MOP	46 nM	—	—	—	↓	—	—	↑↑↑	↑↑
	49 µM	—	—	—	↓	—	—	↑↑	↓
CZ	46 nM	—	—	↑	—	—	↓	—	↓↓↓
	49 µM	—	—	—	—	↓	↓	↑	↓↓↓
TAO	46 nM	—	—	—	↓↓	—	—	↑	↓
	49 µM	—	—	↑	↓	—	—	↓	↓↓
alle 4	46 nM	—	—	↑	—	↑↑↑	—	—	↓↓↓
	49 µM	—	—	↑↑	—	—	—	—	↓↓↓

Die Ergebnisse mit den Hemmstoffen zeigen, dass sich Versuche mit unrealistisch hohen NNK-Konzentrationen nur bedingt auf niedrigere Konzentrationen übertragen lassen. Selbst die hier in Inkubationen mit Mikrosomen verwendete nanomolare Konzentration von NNK ist noch mindesten 1000-fach höher als die bei Genuss von Tabakwaren beim Menschen zu erwartenden Konzentrationen [150]. Auch Untersuchungen zur Chemoprävention von Tumoren müssen deshalb mit Vorsicht interpretiert werden, wenn die Chemopräventiva gleichzeitig mit hohen NNK-Dosen im Tierversuch verabreicht werden [196].

4.2.3 Einfluss von Nicotin und Cotinin

Im Gegensatz zu den CYP-Inhibitoren wurden Nicotin und Cotinin bei den beiden NNK-Konzentrationen nicht in gleicher Menge zugesetzt, sondern jeweils im 300- bzw. 3000-fachen Überschuss. Dies ging von der Überlegung aus, dass Nicotin im Tabak und im Tabakrauch in erheblich höherer Menge vorhanden ist als NNK [74] und der Nicotinmetabolit Cotinin aufgrund seines langsameren Abbaus höhere Konzentrationen in den menschlichen Körperflüssigkeiten erreicht [197]. In einer Vielzahl von Versuchen wurde eine Hemmung der metabolischen Aktivierung von NNK durch Nicotin bzw. Cotinin *in vitro* und *in vivo* gezeigt [144,198-204]. Vergleichbare Untersuchungen mit humanen Leber- und Lungenmikrosomen wurden aber bisher nicht in der Literatur berichtet. Die NNK-Metabolisierung zu Ketoaldehyd und HPB durch heterolog in Insektenzellen exprimiertes humanes CYP 2A13 wurde durch Nicotin stark gehemmt [205]. Wie schon mit dem spezifischen Inhibitor MOP haben wir in unseren Versuchen auch mit Nicotin in der Lunge nur eine schwache Hemmung der Ketosäurebildung gesehen, die sich auf die hohe NNK-Konzentration beschränkte. Dies

spricht nicht für eine große Bedeutung von CYP 2A13 für die NNK-Aktivierung in unseren gepoolten Lungenmikrosomen. Erstaunlicherweise brachte der Zusatz von Cotinin die Ketosäurebildung komplett zum Erliegen, wiederum nur bei 49 µM NNK. Von den vier getesteten Enzyminhibitoren war nur NF in der Lage diese Reaktion um 50% zu hemmen. Alle anderen Hemmstoffe erreichten maximal eine Hemmung um ein Viertel, in der Kombination war keine Hemmung zu beobachten. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann deshalb nicht abgeleitet werden, welche Enzyme maßgeblich an der Ketosäurebildung bei mikromolarer NNK-Konzentration beteiligt sind.

Auch in den Lebermikrosomen lässt sich die Hemmung der α-Hydroxylierung durch die Tabakalkaloide nicht auf die Wirkung eines einzelnen Enzyms zurückführen. Die Hemmung der HPB-Bildung durch Nicotin und Cotinin war nur bei der hohen NNK-Konzentration mit der Hemmung von CYP 2A6 durch MOP vergleichbar. Bei 46 nM NNK fiel die Hemmung durch die Tabakalkaloide wesentlich schwächer aus. Die Bildung der Ketosäure wurde durch Cotinin vollständig unterdrückt, ein Effekt der mit keinem der Enzyminhibitoren zu sehen war.

Die NNK-N-Oxidation wurde in Lungen- und Lebermikrosomen nur bei 49 µM NNK gehemmt. Die Kombination von Nicotin und Cotinin hemmte nicht stärker als die einzelnen Alkaloide. In der Leber wurde nur mit MOP eine vergleichbare Hemmung erzielt. In der Lunge war dagegen mit MOP keine Hemmung zu sehen, während TAO eine vergleichbare und CZ eine deutlich stärkere Hemmung bewirkten.

Tabelle 4-3 Einfluss von Nicotin und Cotinin auf den NNK-Stoffwechsel in Leber- und Lungenmikrosomen; – <10%, ↑/↓ 10-25%, ↑↑/↓↓ 26-50%, ↑↑↑/↓↓↓ >50%

	C (NNK)	NNAL		HPB		Ketosäure		Hydroxysäure		NNK-N-Oxid	
		von generell	bis								
Lebermikrosomen											
Nicotin	46 nM	—		—		—		—		↑↑	
	49 µM	↓↓		↓↓↓		↓↓		—		↓↓	
Cotinin	46 nM	—		↓		↓		—		—	
	49 µM	↓↓↓		↓↓↓		↓↓		↑		↓↓	
Nicotin + Cotinin	46 nM	—		↓		↓↓		—		—	
	49 µM	↓↓↓		↓↓↓		↓↓↓		↑		↓↓↓	
Lungenmikrosomen											
Nicotin	46 nM	—				—		—		—	
	49 µM	↓↓				↓↓		↑		—	
Cotinin	46 nM	↓				—		↑		—	
	49 µM	↓↓↓				↓↓↓		—		↓	
Nicotin + Cotinin	46 nM	↓				—		—		—	
	49 µM	↓↓↓				↓↓↓		—		↓	

Überraschend wurde die Reduktion von NNK zu NNAL durch Nicotin und Cotinin signifikant gehemmt. Der Effekt war wieder bei der hohen NNK-Konzentration deutlicher und wurde in der Kombination von Nicotin und Cotinin weiter verstärkt. Abgesehen von dem Kombinationseffekt war die Hemmung der NNK-Reduktion in den Lebermikrosomen vergleichbar. Auf Hemmung welcher Enzyme die verminderte NNAL-Bildung beruht, ist völlig unklar. Zu einer möglichen Hemmung der 11 β -HSD-1 durch Tabakalkaloide wurden keine Studien gefunden.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4-3 zusammengefasst und auffällige Unterschiede zwischen der nano- und mikromolaren NNK-Konzentration rot markiert. Es zeigt sich, dass Nicotin und Cotinin in den bei Rauchern maximal auftretenden Konzentrationen den NNK-Metabolismus in Leber- und Lungenmikrosomen wahrscheinlich kaum beeinflussen. Die in anderen Versuchen *in vitro* und *in vivo* gesehene Hemmung der metabolischen Aktivierung von NNK durch hohe Konzentrationen der Tabakalkaloide [144,198,199,201-204] ist deshalb unter realen Bedingungen bei Rauchern nicht zu erwarten.

5 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization (2004) WHO Framework Convention on Tobacco Control. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241591013.pdf>
2. Facharbeitsgruppe "Suchtprävention" im Auftrag des Drogen- und Suchtrates (2008) Nationales Aktionsprogramm zur Tabakprävention. http://www.bmg.bund.de/clin_117/SharedDocs/Downloads/DE/Neu/Tabak_Aktionsplan,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Tabak_Aktionsplan.pdf
3. Hoffmann D Hoffmann I El-Bayoumy K (2001) The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chem.Res.Toxicol.* 14:767-790
4. Counts ME Hsu FS Tewes FJ (2006) Development of a commercial cigarette "market map" comparison methodology for evaluating new or non-conventional cigarettes. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 46:225-242
5. Hatsukami DK Benowitz NL Rennard S Oncken C Hecht SS (2006) Biomarkers to assess the utility of potential reduced exposure tobacco products. *Nicotine Tob.Res.* 8:600-622
6. Foulds J Ramstrom L Burke M Fagerström K (2003) Effect of smokeless tobacco (snus) on smoking and public health in Sweden. *Tob.Control* 12:349-359
7. Roth DH Roth AB Liu X (2005) Health risks of smoking compared to Swedish snus. *Inhal.Toxicol.* 17:741-748
8. Gartner CE Hall WD Vos T Bertram MY Wallace AL Lim SS (2007) Assessment of Swedish snus for tobacco harm reduction: an epidemiological modelling study. *Lancet* 369:2010-2014
9. Richter E Engl J Friesenegger S Tricker AR (2009) Biotransformation of 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in lung tissue from mouse, rat, hamster, and man. *Chem.Res.Toxicol.* 22:1008-1017
10. Jalas JR Hecht SS Murphy SE (2005) Cytochrome P450 enzymes as catalysts of metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco specific carcinogen. *Chem.Res.Toxicol.* 18:95-110
11. IARC (2007) Smokeless tobacco and tobacco-specific *N*-nitrosamines. IARC Monograph 89:1-626
12. Anon (2008) Vorläufiges Tabakgesetz. http://bundesrecht.juris.de/lmg_1974/
13. Gassner G Hohmann B. Deutschmann F. (1989) Tabak. in: Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Lebensmittel; pp 248-254; Stuttgart, Gustav Fischer Verlag
14. Robert Koch-Institut (2006) Bundesgesundheitsurvey: Soziale Unterschiede im Rauchverhalten und in der Passivrauchbelastung in Deutschland. http://www.rki.de/clin_091/nn_205338/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/Beitrag_Rauchen,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Beitrag_Rauchen.pdf
15. Richter E Scherer G (2004) Aktives und passives Rauchen. in: Lehrbuch der Toxikologie; Ch. 35, pp 897-918; eds: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
16. Charlton A (2005) Tobacco or health 1602: an Elizabethan doctor speaks. *Health Educat.Res.* 20:101-111
17. Roffo AH (1940) Krebserzeugende Tabakwirkung. *M Schr.Krebsbekpf g.* 8:97-102

18. Müller FH (1940) Tabakmissbrauch und Lungenkarzinom. *Z.Krebsforsch.* 49:57-85
19. Haustein K-O (2004) Fritz Lickint (1898-1960) - Ein Leben als Aufklärer über die Gefahren des Tabaks. *Suchtmed.* 6:249-255
20. Wynder EL GRAHAM EA (1950) Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *JAMA* 143:329-336
21. Doll R Hill AB (1950) Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br.Med.J* 2:739-748
22. Anon (1991) Smoking and Tobacco Control Monographs No.1. Strategies to control tobacco use in the United States: a blueprint for public health action in the 1990's. NIH Publication No. 92-3316
23. IARC (2004) Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC Monograph 83:1-1452
24. Vineis P Airoldi L Veglia F Olgiati L Pastorelli R Autrup H Dunning A Garte S Gormally E Hainaut P Malaveille C Matullo G Peluso M Overvad K Tjonneland A Clavel-Chapelon F Boeing H Krogh V Palli D Panico S Tumino R Bueno-de-Mesquita B Peeters P Berglund G Hallmans G Saracci R Riboli E (2005) Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *Br.Med.J.* 330:277-280A
25. Heidrich J Wellmann J Heuschmann PU Kraywinkel K Keil U (2007) Mortality and morbidity from coronary heart disease attributable to passive smoking. *Eur.Heart J.* 28:2498-2502
26. Wigle DT Arbuckle TE Turner MC Bérubé A Yang Q Liu S Krewski D (2008) Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *J.Toxicol.Environ.Health B* 11:373-517
27. Römpf Chemie-Lexikon (2007) <http://www.roempp.com>
28. Roberts DW Benson RW Groopman JD Flammang TJ Nagle WA Moss AJ Kadlubar FF (1988) Immunochemical quantitation of DNA adducts derived from the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Res.* 48:6336-6342
29. Hoffmann D Hoffmann I (1997) The changing cigarette, 1950-1995. *J.Toxicol.Environ. Health A* 50:307-364
30. Wynder EL Hoffmann D (1994) Smoking and lung cancer: scientific challenges and opportunities. *Cancer Res.* 54:5284-5295
31. IARC (1986) Tobacco Smoking. IARC Monograph 38:1-421
32. Smith CJ Perfetti TA Garg R Hansch C (2003) IARC carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and their calculated log *P* values. *Food Chem.Toxicol.* 41:807-817
33. Hecht SS (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat.Rev.Cancer* 3:733-744
34. Witschi H Espiritu I Peake JL Wu K Maronpot RR Pinkerton KE (1997) The carcinogenicity of environmental tobacco smoke. *Carcinogenesis* 18:575-586
35. Anon (1981) The health effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds. Washington, DC, National Academy Press
36. Köhl W Eisenbrand G (2004) N-Nitrosoverbindungen. in: *Lehrbuch der Toxikologie*; Ch. 30, pp 747-762; eds: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH

37. Magee PN (1956) Toxic liver injury; the metabolism of dimethylnitrosamine. *Biochem.J.* 64:676-682
38. Druckrey H Preussmann R Ivankovic S Schmähl D (1967) Organotrope Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Z.Krebsforsch.* 69:103-201
39. Preussmann R Stewart BW (1984) N-Nitroso carcinogens. in: ACS Monograph Series, Chemical Carcinogens; ed. Searle CE; Vol. 182, pp 643-828; Washington, DC, American Chemical Society
40. Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem.Res.Toxicol.* 11:559-603
41. Yang CS Smith T Ishizaki H Yoo JSH Hong J-Y (1991) Metabolism and activation of nitrosamines catalyzed by cytochrome P450 isozymes. in: N-Oxidation of Drugs: Biochemistry, Pharmacology, and Toxicology; pp 295-311; eds: Hlavica P Damani LA Gorrod JW; London, Chapman & Hall
42. Mirvish SS (1995) Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett.* 93:17-48
43. Xu GP Reed PI (1993) N-nitroso compounds in fresh gastric juice and their relation to intragastric pH and nitrite employing an improved analytical method. *Carcinogenesis* 14:2547-2551
44. Spiegelhalder B Preussmann R (1985) *In vivo* nitrosation of amidopyrine in humans: use of 'ethanol effect' for biological monitoring of N-nitrosodimethylamine in urine. *Carcinogenesis* 6:545-548
45. Tannenbaum SR Weisman M Fett D (1976) Effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet.Toxicol.* 14:549-552
46. Iijima K Henry E Moriya A Wirz A Kelman AW McColl KEL (2002) Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. *Gastroenterology* 122:1248-1257
47. Moriya A Grant J Mowat C Williams C Carswell A Preston T Anderson S Iijima K McColl KEL (2002) In vitro studies indicate that acid catalysed generation of N-nitrosocompounds from dietary nitrate will be maximal at the gastro-oesophageal junction and cardia. *Scand.J.Gastroenterol.* 37:253-261
48. Calmels S Ohshima H Vincent P Gounot A-M Bartsch H (1985) Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *Escherichia coli* strains. *Carcinogenesis* 6:911-915
49. Calmels S Ohshima H Bartsch H (1988) Nitrosamine formation by denitrifying and non-denitrifying bacteria: implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. *J.Gen.Microbiol.* 134:221-226
50. O'Donnell CM Edwards C Ware J (1988) Nitrosamine formation by clinical isolates of enteric bacteria. *Fems Microbiol.Lett.* 51:193-197
51. Mackerness CW Leach SA Thompson MH Hill MJ (1989) The inhibition of bacterially mediated N-nitrosation by vitamin C: relevance to the inhibition of endogenous N-nitrosation in the achlorhydric stomach. *Carcinogenesis* 10:397-399
52. Tricker AR (1996) Excretion of N-nitrosamines in patients with bacterial bladder infections or diversions of the urinary tract. *Eur.J.Cancer Prev.* 5 (Suppl. 1):95-99

53. Vermeer ITM Moonen EJC Dallinga JW Kleinjans JCS van Maanen JMS (1999) Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosopiperidine in humans. *Mutat.Res.* 428:353-361
54. Tricker AR Preussmann R (1991) Occurrence of and exposure to *N*-nitroso compounds in tobacco. *IARC Sci.Publ.* 105:493-495
55. Tricker AR Ditrich C Preussmann R (1991) *N*-Nitroso compounds in cigarette tobacco and their occurrence in mainstream tobacco smoke. *Carcinogenesis* 12:257-261
56. Thornton-Manning JR Nikula KJ Hotchkiss JA Avila KJ Rohrbacher KD Ding X Dahl AR (1997) Nasal cytochrome P4502A: identification, regional localization, and metabolic activity toward hexamethylphosphoramide, a known nasal carcinogen. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 142:22-30
57. Tricker AR (1997) *N*-Nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur.J.Cancer Prev.* 6:226-268
58. Anon (2000) Anlage 5 (zu § 5 Abs. 1 und § 7) - Zusatzstoffe, die für Lebensmittel zur Konservierung oder als Antioxidationsmittel zugelassen sind. *BGBl I*:1537-1545
59. Amtsblatt der Europäischen Union (2008) VO (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:DE:PDF>
60. Belitz H-D Grosch W Schieberle P (2001) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer
61. Hecht SS Morrison JB Wenninger JA (1982) *N*-nitroso-*N*-methyl dodecylamine and *N*-nitroso-*N*-methyl tetradecylamine in hair-care products. *Food Chem.Toxicol.* 20:165-169
62. Spiegelhalder B Preussmann R (1984) Contamination of toiletries and cosmetic products with volatile and nonvolatile *N*-nitroso carcinogens. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 108:160-163
63. Kamp E Eisenbrand G (1991) Long-chain *N*-nitroso-*N*-methylalkylamines in commercial cosmetics, light-duty dishwashing liquids and household cleaning preparations. *Food Chem.Toxicol.* 29:203-209
64. Dawson BA Lawrence RC (1987) Analysis of selected drug formulations for volatile nitrosamines. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* 70:554-556
65. Andersen RA Burton HR Fleming PD Hamilton-Kemp TR (1989) Effect of storage conditions on nitrosated, acylated, and oxidized pyridine alkaloid derivatives in smokeless tobacco products. *Cancer Res.* 49:5895-5900
66. Djordjevic MV Gay LS Bush LP Chaplin JF (1989) Tobacco-specific nitrosamine accumulation and distribution in flue-cured tobacco alkaloid isolines. *J.Agric.Food Chem.* 37:752-756
67. Hilfrich J Hecht SS Hoffmann D (1977) A study of tobacco carcinogenesis. XV. Effects of *N*-nitrosornicotine and *N*-nitrosoanabasine in Syrian golden hamsters. *Cancer Lett.* 2:169-176
68. Mirvish SS Sams J Hecht SS (1977) Kinetics of nornicotine and anabasine nitrosation in relation to *N*-nitrosornicotine occurrence in tobacco and to tobacco-induced cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 59:1211-1213
69. Klimisch HJ Stadler L (1976) Formation of *N*-nitrosornicotine from nicotine *N*'-oxide. *Talanta* 23:614-616

70. Zwickenpflug W Meger M Richter E (1998) Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. J.Agric.Food Chem. 46:2703-2706
71. Tyroller S Zwickenpflug W Richter E (2002) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables and milk. J.Agric.Food Chem. 50:4909-4915
72. Zwickenpflug W (2000) *N*-nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (*N*-nitrosoornicotine). J.Agric.Food Chem. 48:392-394
73. Caldwell WS Greene JM Dobson GP deBethizy JD (1993) Intragastric nitrosation of nicotine is not a significant contributor to nitrosamine exposure. Ann.NY Acad.Sci. USA 686:213-228
74. Hoffmann D Brunnemann KD Prokopczyk B Djordjevic MV (1994) Tobacco-specific *N*-nitrosamines and *Areca*-derived *N*-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. J.Toxicol.Enviroin.Health A 41:1-52
75. Tso TC (1990) Tobacco-specific *N*-nitrosamines. in: Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant; pp 467-486; ed.: Tso TC, Beltsville MD USA, Ideal Inc.
76. Nestor TB Gentry JS Peele DM Riddick MG Conner BT Edwards ME (2003) Role of oxides of nitrogen in tobacco-specific nitrosamine formation in flue-cured tobacco. Beitr.Tabakforsch.Int. 20:467-475
77. Hecht SS Hoffmann D (1989) The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. Cancer Surv. 8:273-294
78. Wahlberg I Wiernik A Christakopoulos A Johansson L (2000) Tobacco-specific nitrosamines. A multidisciplinary research area. Agro-Food Ind. 10:23-28
79. Hoffmann D Dong M Hecht SS (1977) Origin in tobacco smoke of *N*-nitrosoornicotine, a tobacco-specific carcinogen: brief communication. J.Natl.Cancer Inst. 58:1841-1844
80. Adams JD Lee SJ Vinchkoski N Castonguay A Hoffmann D (1983) On the formation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone during smoking. Cancer Lett. 17:339-346
81. Fischer S Spiegelhalter B Eisenbarth J Preussmann R (1990) Investigations on the origin of tobacco-specific nitrosamines in mainstream smoke of cigarettes. Carcinogenesis 11:723-730
82. Smith CJ Perfetti TA Rumble MA Rodgman A Doolittle DJ (2001) "IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. Food Chem.Toxicol. 39:183-205
83. Prokopczyk B Rivenson A Hoffmann D (1991) A study of betel quid carcinogenesis IX. Comparative carcinogenicity of 3-(methylnitrosamino)propionitrile and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone upon local application to mouse skin and rat oral mucosa. Cancer Lett. 60:153-157
84. Hoffmann D Raineri R Hecht SS Maronpot R Wynder EL (1975) A study of tobacco carcinogenesis. XIV. Effects of *N*-nitrosoornicotine and *N*-nitrosoanabasine in rats. J.Natl.Cancer Inst. 55:977-981
85. Hecht SS Young R Maeura Y (1983) Comparative carcinogenicity in F344 rats and Syrian golden hamsters of *N*-nitrosoornicotine and *N*-nitrosoornicotine-1-*N*-oxide. Cancer Lett. 20:333-340
86. Schuller HM (2009) Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? Nat.Rev.Cancer 9:195-205

87. Sipowicz MA Amin S Desai D Kasprzak KS Anderson LM (1997) Oxidative DNA damage in tissues of pregnant female mice and fetuses caused by the tobacco specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Cancer Lett.* 117:87-91
88. Weitberg AB Corvese D (1997) Effect of vitamin E and beta-carotene on DNA strand breakage induced by tobacco-specific nitrosamines and stimulated human phagocytes. *J.Exp.Clin.Cancer Res.* 16:11-14
89. Castonguay A Rivenson A Trushin N Reinhardt J Spathopoulos S Weiss CH Reiss B Hecht SS (1984) Effects of chronic ethanol consumption on the metabolism and carcinogenicity of N'-nitrosornicotine in F344 rats. *Cancer Res.* 44:2285-2290
90. Hecht SS Chen CB Ohmori T Hoffmann D (1980) Comparative carcinogenicity in F344 rats of the tobacco-specific nitrosamines, N'-nitrosornicotine and 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.* 40:298-302
91. Hoffmann D Rivenson A Amin S Hecht SS (1984) Dose-response study of the carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines in F344 rats. *J.Cancer Res.Clin. Oncol.* 108:81-86
92. Gričiute L Castegnaro M Béréziat JC Cabral JRP (1986) Influence of ethyl alcohol on the carcinogenic activity of N-nitrosornicotine. *Cancer Lett.* 31:267-275
93. Brittebo EB Tjälve H (1981) Formation of tissue-bound N-nitrosornicotine metabolites by the target tissues of Sprague-Dawley and Fisher rats. *Carcinogenesis* 2:959-963
94. Löfberg B Brittebo EB Tjälve H (1982) Localization and binding of N-nitrosornicotine metabolites in the nasal region and in some other tissues of Sprague-Dawley rats. *Cancer Res.* 42:2877-2883
95. Furukawa F Nishikawa A Yoshimura H Mitsui M Imazawa T Ikezaki S Takahashi M (1994) Effects of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)-initiated carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett.* 86:75-82
96. Schulze J Schläger W Wunsch R Richter E (1996) Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by hamster, mouse and rat intestine: relevance of species differences. *Carcinogenesis* 17:1093-1099
97. Koppang N Rivenson A Dahle HK Hoffmann D (1997) A study of tobacco carcinogenesis, LIII: carcinogenicity of N-nitrosornicotine (NNN) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in mink (*Mustela vison*). *Cancer Lett.* 111:167-171
98. Hecht SS Trushin N (1988) DNA and hemoglobin alkylation by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and its major metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in F344 rats. *Carcinogenesis* 9:1665-1668
99. Hoffmann D Djordjevic MV Rivenson A Zang E Desai D Amin S (1993) A study of tobacco carcinogenesis .LI. Relative potencies of tobacco-specific N-nitrosamines as inducers of lung tumours in A/J mice. *Cancer Lett.* 71:25-30
100. Castonguay A Lin D Stoner GD Radok P Furuya K Hecht SS Schut HAJ Klaunig JE (1983) Comparative carcinogenicity in A/J mice and metabolism by cultured mouse peripheral lung of N-nitrosornicotine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, and their analogues. *Cancer Res.* 43:1223-1229
101. Rivenson A Hoffmann D Prokopczyk B Amin S Hecht SS (1988) Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and *Areca*-derived N-nitrosamines. *Cancer Res.* 48:6912-6917

102. Belinsky SA White CM Trushin N Hecht SS (1989) Cell specificity for the pulmonary metabolism of tobacco-specific nitrosamines in the Fischer rat. *Carcinogenesis* 10:2269-2274
103. Schulze J Richter E Binder U Zwickelpflug W (1992) Biliary excretion of 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3'-pyridyl)-1-butanone in the rat. *Carcinogenesis* 13:1961-1965
104. Adams JD LaVoie EJ O'Mara-Adams KJ Hoffmann D Carey KD Marshall MV (1985) Pharmacokinetics of N'-nitrosornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in laboratory animals. *Cancer Lett.* 28:195-201
105. Hecht SS Jordan KG Choi C-I Trushin N (1990) Effects of deuterium substitution on the tumorigenicity of 4-(methylnitrosamino)-1-pyridyl)-1-butanone and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in A/J mice. *Carcinogenesis* 11:1017-1020
106. Furukawa F Nishikawa A Enami T Mitsui M Imazawa T Tanakamaru Z Kim H-C Lee I-S Kasahara K Takahashi M (1997) Promotional effects of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)-initiated carcinogenesis in hamsters. *Food Chem.Toxicol.* 35:387-392
107. Hecht SS Lin D Castonguay A (1983) Effects of a-deuterium substitution on the mutagenicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Carcinogenesis* 4:305-310
108. Padma PR Amonkar AJ Bhide SV (1989) Mutagenic and cytogenetic studies of N'-nitrosornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Lett.* 46:173-180
109. Yim SH Hee SSQ (2001) Bacterial mutagenicity of some tobacco aromatic nitrogen bases and their mixtures. *Mutat.Res.* 492:13-27
110. Zhu S Cunningham ML Gray TE Nettesheim P (1991) Cytotoxicity, genotoxicity and transforming activity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in rat tracheal epithelial cells. *Mutat.Res.* 261:249-259
111. Kolar C Lawson T (1997) Mutagenicity of carcinogenic nitrosamines when activated by hamster and human pancreatic duct epithelial cells. *Cancer Lett.* 117:149-154
112. Kushida H Fujita K-I Suzuki A Yamada M Endo T Nohmi T Kamataki T (2000) Metabolic activation of N-alkylnitrosamines in genetically engineered *Salmonella typhimurium* expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Carcinogenesis* 21:1227-1232
113. Brown B Avalos J Lee C Doolittle D (2001) The effect of tobacco smoke, nicotine, and cotinine on the mutagenicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL). *Mutat.Res.* 494:21-29
114. Bartsch H Malaveille C Camus A-M Martel-Planche C Brun G Hautefeuille A Sabadie N Barbin A Kuroki T Drevon C Piccoli C Montesano R (1980) Bacterial and mammalian mutagenicity tests: validation and comparative studies on 180 chemicals. *IARC Sci.Publ.* 27:179-241
115. Andrews AW Thibault LH Lijinsky W (1978) The relationship between mutagenicity and carcinogenicity of some nitrosamines. *Mutat.Res.* 51:319-326
116. Fujita K-I Kamataki T (2001) Predicting the mutagenicity of tobacco-related N-nitrosamines in humans using 11 strains of *Salmonella typhimurium* YG7108, each coexpressing a form of human cytochrome P450 along with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Environ.Mol.Mutagen.* 38:339-346

117. Swedmark S Romert L Beije B Diaz-Pohl C Bäckbro A Jenssen D (1994) Comparison of co-cultivation of V79 cells with rat hepatocytes and rat H4IIE hepatoma cells for studying nitrosamine-induced *hprt* gene mutations. *Mutagenesis* 9:281-287
118. Williams GM Laspia MF (1979) The detection of various nitrosamines in the hepatocyte primary culture/DNA repair test. *Cancer Lett.* 6:199-206
119. Brunnemann KD Genoble L Hoffmann D (1987) Identification and analysis of a new tobacco-specific *N*-nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol. *Carcinogenesis* 8:465-469
120. Djordjevic MV Brunnemann KD Hoffmann D (1989) Identification and analysis of a nicotine-derived *N*-nitrosamino acid and other nitrosamino acids in tobacco. *Carcinogenesis* 10:1725-1731
121. Liu L Alaoui-Jamali MA El Alami N Castonguay A (1990) Metabolism and DNA single strand breaks induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and its analogues in primary culture of rat hepatocytes. *Cancer Res.* 50:1810-1816
122. Pool-Zobel BL Klein RG Liegibel UM Kuchenmeister F Weber S Schmezer P (1992) Systemic genotoxic effects of tobacco-related nitrosamines following oral and inhalational administration to Sprague-Dawley rats. *Clin. Investig.* 70:299-306
123. Becher R Låg M Schwarze PE Brunborg G Söderlund EJ Holme JA (1993) Chemically induced DNA damage in isolated rabbit lung cells. *Mutat. Res.* 285:303-311
124. Zimonjic D Popescu NC Dipaolo JA (1989) Induction of sister chromatid exchanges by tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3pyridyl)-1-butanone in human and hamster cells. *Carcinogenesis* 10:753-755
125. Lee CK Fulp C Bombick BR Doolittle DJ (1996) Inhibition of mutagenicity of *N*-nitrosamines by tobacco smoke and its constituents. *Mutat. Res.* 367:83-92
126. Lopez-Abente G Gonzalez CA Errezola M Escolar A Izarzugaza I Nebot M Riboli E (1991) Tobacco smoke inhalation pattern, tobacco type, and bladder cancer in Spain. *Am.J.Epidemiol.* 134:830-839
127. Weitberg AB Corvese D (1993) Oxygen radicals potentiate the genetic toxicity of tobacco-specific nitrosamines. *Clin. Genet.* 43:88-91
128. Pohlmann C Koops F Berg J Holz O Ehlert U Rüdiger HW (1992) Determinants of a genotoxic effect of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human diploid fibroblasts. *Clin. Investig.* 70:295-298
129. Majer BJ Mersch-Sundermann V Darroudi F Laky B de Wit K Knasmüller S (2004) Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. *Mutat. Res.* 551:153-166
130. Jorquera R Castonguay A Schuller HM (1994) DNA single-strand breaks and toxicity induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone or *N*-nitrosodimethylamine in hamster and rat liver. *Carcinogenesis* 15:389-394
131. Jansen JG de Groot AJL van Teijlingen CMM Tates AD Vrieling H van Zeeland AA (1996) Induction of *hprt* gene mutations in splenic T-lymphocytes from the rat exposed *in vivo* to DNA methylating agents is correlated with formation of O⁶-methylguanine in bone marrow and not in the spleen. *Carcinogenesis* 17:2183-2191
132. Fichtl B Eichelbaum M Schwab M (2005) Elimination von Pharmaka durch Metabolismus. in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Ch. 1, pp 47-56; eds: Aktories K Förstermann U Hofmann F Starke K; München, Jena, Urban & Fischer Verlag

133. Fischer D Kissel T Klotz U Schmidt H Schwab M (2007) Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie. in: Pharmakologie und Toxikologie für Studium und Praxis; Ch. 1, pp 20-31; eds: Estler C-J Schmidt H; 6Stuttgart, New York, Schattauer GmbH
134. Testa B Krämer SD (2006) The biochemistry of drug metabolism - an introduction Part 1. Principles and overview. Chem.Biodiv. 3:1053-1101
135. Koolmann J Röhm K-H (2003) Biotransformation. in: Taschenbuch der Biochemie; Ch. 3, pp 316-317; Stuttgart, Georg Thieme Verlag
136. Testa B Krämer SD (2007) The biochemistry of drug metabolism - an introduction part 2. Redox reactions and their enzymes. Chem.Biodiv. 4:257-405
137. Hecht SS (2008) Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. Chem.Res.Toxicol. 21:160-171
138. Smith TJ Stoner GD Yang CS (1995) Activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human lung microsomes by cytochromes P450, lipoxygenase, and hydroperoxides. Cancer Res. 55:5566-5573
139. Bedard LL Smith GBJ Reid KR Petsikas D Massey TE (2002) Investigation of the role of lipoxygenase in bioactivation of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human lung. Chem.Res.Toxicol. 15:1267-1273
140. Adams JD LaVoie EJ Hoffmann D (1985) On the pharmacokinetics of tobacco-specific N-nitrosamines in Fischer rats. Carcinogenesis 6:509-511
141. Meger M Richter E Zwicklenpflug W Oehlmann C Hargaden MB Rahim YI Vesell ES (1999) Metabolism and disposition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in rhesus monkeys. Drug Metab.Dispos. 27:471-478
142. Hecht SS Carmella SG Chen M Dor Koch JF Miller AT Murphy SE Jensen JA Zimmerman CL Hatsukami DK (1999) Quantitation of urinary metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen after smoking cessation. Cancer Res. 59:590-596
143. Atawodi SEO Michelsen K Richter E (1994) Metabolism of a glucuronide conjugate of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in rats. Arch.Toxicol. 69:14-17
144. Richter E Tricker AR (1994) Nicotine inhibits the metabolic activation of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in rats. Carcinogenesis 15:1061-1064
145. Stepanov I Upadhyaya P Carmella SG Feuer R Jensen J Hatsukami DK Hecht SS (2008) Extensive metabolic activation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers. Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 17:1764-1773
146. Maser E Richter E Friebertshäuser J (1996) The identification of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as carbonyl reductase of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. Eur.J.Biochem. 238:484-489
147. Schrader E Hirsch-Ernst KI Richter E Foth H (1998) Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in isolated rat lung and liver. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 357:336-343
148. Upadhyaya P Lindgren BR Hecht SS (2009) Comparative levels of O⁶-methylguanine, pyridyloxobutyl-, and pyridylhydroxybutyl-DNA adducts in lung and liver of rats treated chronically with the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. Drug Metab.Dispos. 37:1147-1151
149. Zhang S Wang Y Villalta PW Lindgren BR Upadhyaya P Lao Y Hecht SS (2009) Analysis of pyridyloxobutyl and pyridylhydroxybutyl DNA adducts in extrahepatic

- tissues of F344 rats treated chronically with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chem.Res.Toxicol.* 22:926-936
150. Carmella SG Han S Villalta PW Hecht SS (2005) Analysis of total 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in smokers' blood. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 14:2669-2672
 151. Smith TJ Guo Z Gonzalez FJ Guengerich FP Stoner GD Yang CS (1992) Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in human lung and liver microsomes and cytochromes P-450 expressed in hepatoma cells. *Cancer Res.* 52:1757-1763
 152. Patten CJ Smith TJ Murphy SE Wang M-H Lee J Tynes RE Koch P Yang CS (1996) Kinetic analysis of the activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by heterologously expressed human P450 enzymes and the effect of P450-specific chemical inhibitors on this activation in human liver microsomes. *Arch.Biochem.Biophys.* 333:127-138
 153. Prokopczyk B Trushin N Leszczynska J Waggoner SE El-Bayoumy K (2001) Human cervical tissue metabolizes the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, via α -hydroxylation and carbonyl reduction pathways. *Carcinogenesis* 22:107-114
 154. Wong HL Zhang X Zhang Q-Y Gu J Ding X Hecht SS Murphy SE (2005) Metabolic activation of the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-(3-pyridyl)-1-butanone by cytochrome P450 2A13 in human fetal nasal microsomes. *Chem.Res.Toxicol.* 18:913-918
 155. Zhang X D'Agostino J Wu H Zhang Q-Y von Weymarn L Murphy SE Ding X (2007) CYP2A13: variable expression and role in human lung microsomal metabolic activation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 323:570-578
 156. Brown PJ Bedard LL Reid KR Petsikas D Massey TE (2007) Analysis of CYP2A contributions to metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in human peripheral lung microsomes. *Drug Metab.Dispos.* 35:2086-2094
 157. Smith GBJ Bend JR Bedard LL Reid KR Petsikas D Massey TE (2003) Biotransformation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in peripheral human lung microsomes. *Drug Metab.Dispos.* 31:1134-1141
 158. Dicke KE Skrlin SM Murphy SE (2005) Nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-butanone metabolism by cytochrome P450 2B6. *Drug Metab.Dispos.* 33:1760-1764
 159. Trushin N Leder G El-Bayoumy K Hoffmann D Beger HG Henne-Bruns D Ramadani M Prokopczyk B (2008) The tobacco carcinogen NNK is stereoselectively reduced by human pancreatic microsomes and cytosols. *Langenbecks Arch.Surg.* 393:571-579
 160. Mullett WM Levsen K Borlak J Wu J Pawliszyn J (2002) Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC for the determination of *N*-nitrosamines in cell cultures. *Anal.Chem.* 74:1695-1701
 161. Lee H-L Wang C Lin S Hsieh DPH (2007) Liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of tobacco-specific nitrosamine NNK and its five metabolites. *Talanta* 73:76-80

162. Smith GBJ Castonguay A Donnelly PJ Reid KR Petsikas D Massey TE (1999) Bio-transformation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in freshly isolated human lung cells. *Carcinogenesis* 20:1809-1818
163. Hoffmann D Hoffmann I (1998) Tobacco smoke components. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 18:49-52
164. Stepanov I Jensen J Hatsukami D Hecht SS (2008) New and traditional smokeless tobacco: comparison of toxicant and carcinogen levels. *Nicotine Tob.Res.* 10:1773-1782
165. Richter E Friesenegger S Engl J Tricker AR (2000) Use of precision-cut tissue slices in organ culture to study metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by hamster lung, liver and kidney. *Toxicology* 144:83-91
166. Maser E Friebertshäuser J Völker B (2003) Purification, characterization and NNK carbonyl reductase activities of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: enzyme cooperativity and significance in the detoxification of a tobacco-derived carcinogen. *Chem.Biol.Interact.* 143:435-448
167. Atkins WM (2005) Non-Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450-catalyzed reactions. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 45:291-310
168. Maser E (2004) Significance of reductases in the detoxification of the tobacco-specific carcinogen NNK. *Trends Pharmacol.Sci.* 25:235-237
169. Weng Y Fang C Turesky RJ Behr M Kaminsky LS Ding X (2007) Determination of the role of target tissue metabolism in lung carcinogenesis using conditional cytochrome P450 reductase-null mice. *Cancer Res.* 67:7825-7832
170. Hecht SS Trushin N Reid-Quinn CA Burak ES Jones AB Southers JL Gombar CT Carmella SG Anderson LM Rice JM (1993) Metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the patas monkey: pharmacokinetics and characterization of glucuronide metabolites. *Carcinogenesis* 14:229-236
171. Morse MA Eklind KI Toussaint M Amin SG Chung F-L (1990) Characterization of a glucuronide metabolite of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and its dose-dependent excretion in the urine of mice and rats. *Carcinogenesis* 11:1819-1823
172. Carmella SG Borukhova A Akerkar SA Hecht SS (1997) Analysis of human urine for pyridine-N-oxide metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific lung carcinogen. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 6:113-120
173. Carmella SG Le K Upadhyaya P Hecht SS (2002) Analysis of N- and O-glucuronides of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in human urine. *Chem.Res. Toxicol.* 15:545-550
174. Ono S Hatanaka T Hotta H Satoh T Gonzalez FJ Tsutsui M (1996) Specificity of substrate and inhibitor probes for cytochrome P450s: evaluation of in vitro metabolism using cDNA-expressed human P450s and human liver microsomes. *Xenobiotica* 26:681-693
175. Smith TJ Liao AM Liu Y Jones AB Anderson LM Yang CS (1997) Enzymes involved in the bioactivation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in patas monkey lung and liver microsomes. *Carcinogenesis* 18:1577-1584

176. Smith TJ Liao A Wang L-D Yang G-Y Starcic S Philbert MA Yang CS (1998) Characterization of xenobiotic-metabolizing enzymes and nitrosamine metabolism in the human esophagus. *Carcinogenesis* 19:667-672
177. Lamoureux J Castonguay A (1997) Absence of metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by flavin-containing monooxygenase (FMO). *Carcinogenesis* 18:1979-1984
178. Crespi CL Penman BW Gelboin HV Gonzalez FJ (1991) A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis* 12:1197-1201
179. Ding X Kaminsky LS (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 43:149-173
180. Tassaneeyakul W Birkett DJ Veronese ME McManus ME Tukey RH Quattrochi LC Gelboin HV Miners JO (1993) Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 265:401-407
181. Landi MT Zocchetti C Bernucci I Kadlubar FF Tannenbaum S Skipper P Bartsch H Malaveille C Shields P Caporaso NE Vineis P (1996) Cytochrome P4501A2: enzyme induction and genetic control in determining 4-aminobiphenyl hemoglobin adduct levels. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 5:693-698
182. Kim JH Sherman ME Curriero FC Guengerich FP Strickland PT Sutter TR (2004) Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 199:210-219
183. B'chir F Pavanello S Knani J Boughattas S Arnaud MJ Saguem S (2009) CYP1A2 genetic polymorphisms and adenocarcinoma lung cancer risk in the Tunisian population. *Life Sci.* 84:779-784
184. Vineis P Anttila S Benhamou S Spinola M Hirvonen A Kiyohara C Garte SJ Puntoni R Rannug A Strange RC Taioli E (2007) Evidence of gene-gene interactions in lung carcinogenesis in a large pooled analysis. *Carcinogenesis* 28:1902-1905
185. Porubin D Hecht SS Li Z-Z Gonta M Stepanov I (2007) Endogenous formation of *N*'-nitrosornicotine in F344 rats in the presence of some antioxidants and grape seed extract. *J.Agric.Food Chem.* 55:7199-7204
186. Jalas JR Ding X Murphy SE (2003) Comparative metabolism of the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol by rat cytochrome P450 2A3 and human cytochrome P450 2A13. *Drug Metab.Dispos.* 31:1199-1202
187. Su T Bao Z Zhang Q-Y Smith TJ Hong J-Y Ding X (2000) Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.* 60:5074-5079
188. Koskela S Hakkola J Hukkanen J Pelkonen O Sorri M Saranen A Anttila S Fernandez-Salguero P Gonzalez F Raunio H (1999) Expression of *CYP2A* genes in human liver and extrahepatic tissues. *Biochem.Pharmacol.* 57:1407-1413
189. Breyer-Pfaff U Martin H-J Ernst M Maser E (2004) Enantioselectivity of carbonyl reduction of 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone by tissue fractions from human and rat and by enzymes isolated from human liver. *Drug Metab.Dispos.* 32:915-922

190. Wang H Tan W Hao B Miao X Zhou G He F Lin D (2003) Substantial reduction in risk of lung adenocarcinoma associated with genetic polymorphism in CYP2A13, the most active cytochrome P450 for the metabolic activation of tobacco-specific carcinogen NNK. *Cancer Res.* 63:8057-8061
191. Yang CS Yoo J-SH Ishizaki H Hong J-Y (1990) Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab.Rev.* 22:147-159
192. Miyazaki M Yamazaki H Takeuchi H Saoo K Yokohira M Masumura K-I Nohmi T Funae Y Imaida K Kamataki T (2005) Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung adenomas. *Carcinogenesis* 26:1947-1955
193. Hukkanen J Pelkonen A Hakkola J Raunio H (2002) Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit.Rev. Toxicol.* 32:391-411
194. Smith TJ Guo Z Hong J-Y Ning SM Thomas PE Yang CS (1992) Kinetics and enzyme involvement in the metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in microsomes of rat lung and nasal mucosa. *Carcinogenesis* 13:1409-1414
195. Smith TJ Guo Z Li C Ning SM Thomas PE Yang CS (1993) Mechanisms of inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation in mouse by dietary phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res.* 53:3276-3282
196. Hecht SS (1994) Metabolic activation and detoxification of tobacco-specific nitrosamines - a model for cancer prevention strategies. *Drug Metab.Rev.* 26:373-390
197. Hukkanen J Jacob P Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol.Rev.* 57:79-115
198. Murphy SE Heiblum R (1990) Effect of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on the metabolism of *N*-nitrosonornicotine and 4-methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by rat oral tissue. *Carcinogenesis* 11:1663-1666
199. Hong J-Y Ding X Smith TJ Coon MJ Yang CS (1992) Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific carcinogen, by rabbit nasal microsomes and cytochrome P450s NMa and NMb. *Carcinogenesis* 13:2141-2144
200. Kutzer C Richter E Oehlmann C Atawodi SE (1995) Effect of nicotine and cotinine on NNK metabolism in rats. in: *Effects of Nicotine on Biological Systems II*; pp 385-390; eds: Clarke PBS Quik M Adlkofer F Thureau K; Basel, Boston, Berlin, Birkhäuser Verlag
201. Richter E Tricker AR (2002) Effect of nicotine, cotinine and phenethyl isothiocyanate on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolism in the Syrian golden hamster. *Toxicology* 179:95-103
202. Brown BG Chang C-J Ayres PH Lee CK Doolittle DJ (1999) The effect of cotinine or cigarette smoke co-administration on the formation of O⁶-methylguanine adducts in the lung and liver of A/J mice treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Toxicol.Sci.* 47:33-39
203. Brown BG Richter E Tricker AR Ayres PH Doolittle D (2001) The effect of a 2-h exposure to cigarette smoke on the metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in A/J mice. *Chem.Biol.Interact.* 138:125-135

204. Castonguay A Rossignol G (1992) Modulation of the activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by hamster liver microsomes to protein alkylating species. *Toxicol.in Vitro* 6:397-404
205. Bao Z He X-Y Ding X Prabhu S Hong J-Y (2005) Metabolism of nicotine and cotinine by human cytochrome P450 2A13. *Drug Metab.Dispos.* 33:258-261

Anhang

Tabelle A1 Lebermikrosomen: Prozentualer Anteil der Metaboliten und relativer Umsatz in pg/mg Protein/min

c (NNK) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]					relativer Umsatz [pg/mg Protein/min]						
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK	
0,006												
-1-	3,40	5,10	0,00	10,06	81,44	0,022	0,032	0,00	0,064	0,518	0,635	
-2-	3,22	4,75	0,00	9,97	82,06	0,019	0,028	0,00	0,059	0,482	0,587	
-3-	1,99	3,99	0,00	10,51	83,51	0,014	0,027	0,00	0,071	0,565	0,677	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	2,87	4,61	0,00	10,18	82,34	0,018	0,029	0,00	0,065	0,521	0,633	
SD	0,76	0,57	0,00	0,29	1,06	0,004	0,003	0,00	0,006	0,042	0,045	
SE	0,44	0,33	0,00	0,17	0,61	0,002	0,002	0,00	0,004	0,024	0,026	
min	1,99	3,99	0,00	9,97	81,44	0,014	0,027	0,00	0,059	0,482	0,587	
max	3,40	5,10	0,00	10,51	83,51	0,022	0,032	0,00	0,071	0,565	0,677	
0,012												
-1-	3,55	5,08	0,00	12,52	78,85	0,038	0,054	0,00	0,133	0,839	1,064	
-2-	2,64	3,70	0,00	8,10	85,56	0,027	0,038	0,00	0,083	0,875	1,022	
-3-	3,02	5,10	0,00	11,34	80,53	0,029	0,049	0,00	0,108	0,767	0,952	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	3,07	4,63	0,00	10,65	81,65	0,031	0,047	0,00	0,108	0,827	1,013	
SD	0,46	0,8	0,00	2,29	3,49	0,006	0,008	0,00	0,025	0,055	0,056	
SE	0,26	0,46	0,00	1,32	2,02	0,003	0,005	0,00	0,015	0,032	0,033	
min	2,64	3,70	0,00	8,10	78,85	0,027	0,038	0,00	0,083	0,767	0,952	
max	3,55	5,10	0,00	12,52	85,56	0,038	0,054	0,00	0,133	0,875	1,064	
0,023												
-1-	3,18	2,43	1,50	10,30	82,40	0,061	0,047	0,029	0,198	1,584	1,922	
-2-	2,16	3,99	3,16	12,31	79,87	0,047	0,086	0,068	0,266	1,728	2,164	
-3-	2,05	2,90	3,75	10,92	80,38	0,043	0,061	0,079	0,230	1,696	2,110	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	2,46	3,11	2,80	11,18	80,88	0,050	0,065	0,059	0,232	1,669	2,065	
SD	0,63	0,80	1,17	1,03	1,34	0,010	0,020	0,027	0,034	0,076	0,127	
SE	0,36	0,46	0,68	0,60	0,77	0,005	0,012	0,015	0,020	0,044	0,073	
min	2,05	2,43	1,50	10,30	79,87	0,043	0,047	0,029	0,198	1,584	1,922	
max	3,18	3,99	3,75	12,31	82,40	0,061	0,086	0,079	0,266	1,728	2,164	
0,046												
-1-	3,52	7,62	2,15	12,11	74,80	0,130	0,281	0,079	0,446	2,758	3,686	
-2-	4,04	5,77	1,73	10,96	77,50	0,151	0,216	0,065	0,410	2,902	3,744	
-3-	3,59	7,39	1,80	10,18	77,05	0,130	0,266	0,065	0,367	2,779	3,607	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	3,72	6,92	1,89	11,08	76,45	0,137	0,254	0,070	0,408	2,813	3,679	
SD	0,28	1,01	0,22	0,97	1,44	0,012	0,034	0,008	0,040	0,078	0,069	
SE	0,16	0,58	0,13	0,56	0,83	0,007	0,020	0,005	0,023	0,045	0,040	
min	3,52	5,77	1,73	10,18	74,80	0,130	0,216	0,065	0,367	2,758	3,607	
max	4,04	7,62	2,15	12,11	77,50	0,151	0,281	0,079	0,446	2,902	3,744	
0,091												
-1-	3,73	6,85	1,45	10,79	77,18	0,256	0,470	0,100	0,740	5,294	6,859	
-2-	3,71	6,84	2,34	11,13	75,78	0,270	0,498	0,171	0,811	5,522	7,286	
-3-	3,04	6,25	2,14	10,36	78,04	0,242	0,498	0,171	0,825	6,219	7,969	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	3,49	6,64	1,98	10,76	77,00	0,256	0,489	0,147	0,792	5,678	7,372	
SD	0,40	0,34	0,47	0,39	1,14	0,014	0,016	0,041	0,046	0,482	0,560	
SE	0,23	0,20	0,27	0,22	0,66	0,008	0,009	0,024	0,026	0,278	0,323	
min	3,04	6,25	1,45	10,36	75,78	0,242	0,470	0,100	0,740	5,294	6,859	
max	3,73	6,85	2,34	11,13	78,04	0,270	0,498	0,171	0,825	6,219	7,969	
0,185												
-1-	3,41	6,22	1,61	10,24	78,51	0,491	0,895	0,231	1,473	11,292	14,382	
-2-	2,99	5,98	2,19	9,96	78,69	0,433	0,866	0,318	1,444	11,407	14,498	
-3-	2,51	5,22	2,13	11,03	78,92	0,375	0,780	0,318	1,646	11,783	14,931	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	2,97	5,81	1,98	10,41	78,71	0,433	0,847	0,289	1,521	11,494	14,603	
SD	0,45	0,52	0,32	0,55	0,20	0,058	0,060	0,050	0,109	0,257	0,289	
SE	0,26	0,30	0,19	0,32	0,12	0,033	0,035	0,029	0,063	0,148	0,167	
min	2,51	5,22	1,61	9,96	78,51	0,375	0,780	0,231	1,444	11,292	14,382	
max	3,41	6,22	2,19	11,03	78,92	0,491	0,895	0,318	1,646	11,783	14,931	

Fortsetzung Tabelle A1 Lebermikrosomen: Prozentualer Anteil der Metaboliten und relativer Umsatz in pg/mg Protein/min

0,369	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK
-1-	3,19	7,26	1,77	10,97	76,81	1,037	2,361	0,576	3,571	24,994	32,539
-2-	3,11	7,45	1,45	11,39	76,60	0,864	2,073	0,403	3,167	21,309	27,816
-3-	3,56	7,34	1,89	11,32	75,68	0,979	2,016	0,518	3,110	20,790	27,471
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	3,29	7,35	1,70	11,23	76,37	0,960	2,150	0,499	3,283	22,364	29,275
SD	0,24	0,10	0,23	0,22	0,60	0,088	0,185	0,088	0,251	2,292	2,832
SE	0,14	0,06	0,13	0,13	0,35	0,051	0,107	0,051	0,145	1,323	1,635
min	3,11	7,26	1,45	10,97	75,68	0,864	2,016	0,403	3,110	20,790	27,471
max	3,56	7,45	1,89	11,39	76,81	1,037	2,361	0,576	3,571	24,994	32,539
0,721	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK
-1-	3,61	7,22	2,26	10,16	76,98	1,803	3,605	1,127	5,070	38,420	49,912
-2-	2,76	6,69	2,56	11,61	76,18	1,577	3,831	1,465	6,647	43,603	57,236
-3-	3,77	6,03	2,64	10,92	76,84	2,253	3,605	1,577	6,535	45,969	59,827
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	3,38	6,65	2,48	10,90	76,66	1,878	3,681	1,390	6,084	42,664	55,658
SD	0,54	0,60	0,20	0,73	0,42	0,344	0,130	0,235	0,880	3,861	5,142
SE	0,31	0,35	0,12	0,42	0,24	0,199	0,075	0,135	0,508	2,229	2,969
min	2,76	6,03	2,26	10,16	76,18	1,577	3,605	1,127	5,070	38,420	49,912
max	3,77	7,22	2,64	11,61	76,98	2,253	3,831	1,577	6,647	45,969	59,827
1,47	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK
-1-	4,09	6,45	2,15	11,40	75,91	4,367	6,896	2,299	12,182	81,139	106,88
-2-	4,62	6,72	2,52	10,29	75,84	5,057	7,355	2,758	11,263	82,978	109,41
-3-	4,02	6,70	1,92	10,92	76,63	4,827	8,045	2,299	13,102	91,943	119,99
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	4,24	6,63	2,20	10,87	76,13	4,750	7,432	2,452	12,182	85,353	112,09
SD	0,33	0,15	0,31	0,55	0,44	0,351	0,578	0,265	0,919	5,780	6,950
SE	0,19	0,09	0,18	0,32	0,25	0,203	0,334	0,153	0,531	3,337	4,013
min	4,02	6,45	1,92	10,29	75,84	4,367	6,896	2,299	11,263	81,139	106,88
max	4,62	6,72	2,52	11,40	76,63	5,057	8,045	2,758	13,102	91,943	119,99
2,93	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK
-1-	4,24	6,78	1,69	10,59	76,69	9,167	14,668	3,667	22,919	165,93	216,35
-2-	3,29	8,11	1,75	11,62	75,22	6,876	16,960	3,667	24,919	157,22	209,02
-3-	4,00	6,60	2,20	11,40	75,60	9,167	15,126	5,042	26,127	173,27	229,19
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	3,84	7,16	1,88	11,21	75,84	8,403	15,585	4,125	24,447	165,47	218,19
SD	0,49	0,83	0,28	0,54	0,77	1,323	1,213	0,794	1,610	8,031	10,208
SE	0,28	0,48	0,16	0,31	0,44	0,764	0,700	0,458	0,929	4,637	5,894
min	3,29	6,60	1,69	10,59	75,22	6,876	14,668	3,667	22,919	157,22	209,02
max	4,24	8,11	2,20	11,62	76,69	9,167	16,960	5,042	26,127	173,27	229,19
6,05	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK
-1-	3,04	7,16	2,82	12,58	74,19	13,226	31,175	12,281	54,793	323,09	435,51
-2-	3,72	6,78	2,19	12,69	74,62	16,060	29,286	9,447	54,793	322,14	431,73
-3-	4,57	7,16	2,98	11,73	73,56	21,728	34,009	14,171	55,737	349,54	475,18
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	3,78	7,03	2,66	12,33	74,12	17,005	31,490	11,966	55,108	331,59	447,47
SD	0,77	0,22	0,42	0,53	0,53	4,329	2,377	2,377	0,545	15,552	24,073
SE	0,44	0,12	0,24	0,30	0,31	2,499	1,373	1,373	0,315	8,979	13,898
min	3,04	6,78	2,19	11,73	73,56	13,226	29,286	9,447	54,793	322,14	431,73
max	4,57	7,16	2,98	12,69	74,62	21,728	34,009	14,171	55,737	349,54	475,18
12,8	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK
-1-	2,87	7,73	3,09	13,25	73,29	25,992	69,979	27,991	119,96	663,80	905,72
-2-	2,93	7,22	2,48	12,87	74,72	25,992	63,980	21,993	113,97	661,80	885,73
-3-	2,97	7,33	1,78	12,48	75,25	29,991	73,977	17,994	125,961	759,77	1009,7
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	2,92	7,43	2,45	12,86	74,42	27,325	69,312	22,660	119,96	695,12	933,71
SD	0,05	0,27	0,65	0,38	1,01	2,309	5,032	5,032	5,998	55,995	66,553
SE	0,03	0,15	0,38	0,22	0,58	1,333	2,905	2,905	3,463	32,329	38,424
min	2,87	7,22	1,78	12,48	73,29	25,992	63,980	17,994	113,97	661,80	885,73
max	2,97	7,73	3,09	13,25	75,25	29,991	73,977	27,991	125,96	759,77	1009,7

Fortsetzung Tabelle A1 Lebermikrosomen: Prozentualer Anteil der Metaboliten und relativer Umsatz in pg/mg Protein/min

49	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK
-1-	3,91	7,82	3,91	13,69	70,66	121,99	243,98	121,99	426,97	2203,4	3118,4
-2-	3,88	7,28	3,16	13,35	72,33	121,99	228,73	99,117	419,34	2272,1	3141,2
-3-	3,03	7,69	2,33	13,52	73,43	99,117	251,61	76,244	442,21	2401,7	3270,9
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	3,61	7,60	3,13	13,52	72,14	114,37	241,44	99,117	429,51	2292,4	3176,8
SD	0,50	0,28	0,79	0,17	1,39	13,206	11,646	22,873	11,646	100,67	82,235
SE	0,29	0,16	0,46	0,10	0,80	7,624	6,724	13,206	6,724	58,121	47,478
min	3,03	7,28	2,33	13,35	70,66	99,117	228,73	76,244	419,34	2203,4	3118,4
max	3,91	7,82	3,91	13,69	73,43	121,99	251,61	121,99	442,21	2401,7	3270,9
101	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK
-1-	4,53	8,80	2,40	13,07	71,20	268,93	522,05	142,38	775,17	4223,9	5932,4
-2-	5,43	5,14	2,86	14,29	72,57	300,57	284,76	158,20	790,99	4018,2	5536,9
-3-	5,14	8,65	2,43	14,86	69,19	300,57	506,23	142,38	870,08	4049,8	5853,3
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,03	7,53	2,56	14,07	70,99	290,03	437,68	147,65	812,08	4097,3	5774,2
SD	0,46	2,07	0,26	0,92	1,70	18,267	132,67	9,134	50,853	110,74	209,3
SE	0,26	1,19	0,15	0,53	0,98	10,546	76,598	5,273	29,360	63,935	120,83
min	4,53	5,14	2,40	13,07	69,19	268,94	284,76	142,38	775,17	4018,2	5536,9
max	5,43	8,80	2,86	14,86	72,57	300,57	522,05	158,20	870,08	4223,9	5932,4
251	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK
-1-	5,52	9,66	2,76	13,45	68,97	628,24	1099,4	314,12	1531,3	7853,0	11387
-2-	5,82	7,88	2,74	12,67	70,55	667,51	903,10	314,12	1452,8	8088,6	11465
-3-	4,40	9,12	3,46	15,72	66,98	549,71	1138,7	431,92	1963,3	8363,4	12486
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,25	8,88	2,99	13,95	68,83	615,15	1047,1	353,39	1649,1	8101,7	11780
SD	0,75	0,91	0,41	1,59	1,79	59,978	126,22	68,009	274,86	255,47	613,34
SE	0,43	0,53	0,24	0,92	1,03	34,628	72,873	39,265	158,69	147,50	354,11
min	4,40	7,88	2,74	12,67	66,98	549,71	903,10	314,12	1452,8	7853,0	11387
max	5,82	9,66	3,46	15,72	70,55	667,51	1138,7	431,92	1963,3	8363,4	12486
499	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	NNK
-1-	7,69	10,12	3,64	12,96	65,18	1480,8	1948,4	701,43	2494,0	12548	19250
-2-	8,39	8,39	3,65	14,60	64,60	1792,5	1792,5	779,37	3117,5	13795	21355
-3-	8,70	8,30	3,16	13,04	66,80	1714,6	1636,7	623,50	2571,9	13171	19718
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,26	8,94	3,49	13,53	65,53	1662,7	1792,5	701,43	2727,8	13171	20108
SD	0,51	1,03	0,28	0,92	1,14	162,24	155,87	77,937	339,72	623,50	1104,9
SE	0,30	0,59	0,16	0,53	0,66	93,668	89,994	44,997	196,14	359,98	637,94
min	7,69	8,30	3,16	12,96	64,60	1480,8	1636,7	623,50	2494,0	12548	19250
max	8,70	10,12	3,65	14,60	66,80	1792,5	1948,4	779,37	3117,5	13795	21355

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid

Tabelle A2 Lungenmikrosomen: Prozentualer Anteil der Metaboliten und relativer Umsatz in pg/mg Protein/min

c (NNK) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]				relativer Umsatz [pg/mg Protein/min]				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
0,006	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,158	0,158
-2-	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,151	0,151
-3-	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,149	0,149
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,153	0,153
SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,004	0,004
SE	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,002	0,002
min	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,149	0,149
max	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,158	0,158
0,012	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-	7,08	10,00	0,00	83,33	0,031	0,043	0,00	0,360	0,432
-2-	5,31	9,73	0,00	85,40	0,022	0,040	0,00	0,347	0,407
-3-	6,22	8,71	0,00	85,06	0,027	0,038	0,00	0,369	0,434
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,21	9,48	0,00	84,60	0,026	0,040	0,00	0,359	0,424
SD	0,89	0,68	0,00	1,11	0,005	0,003	0,00	0,011	0,015
SE	0,51	0,39	0,00	0,64	0,003	0,002	0,00	0,006	0,009
min	5,31	8,71	0,00	83,33	0,022	0,038	0,00	0,347	0,407
max	7,08	10,00	0,00	85,40	0,031	0,043	0,00	0,369	0,434
0,023	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-	7,59	2,64	2,64	87,13	0,083	0,029	0,029	0,950	1,091
-2-	5,95	2,60	4,46	86,99	0,058	0,025	0,043	0,842	0,968
-3-	6,74	2,84	3,19	87,59	0,068	0,029	0,032	0,889	1,015
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,76	2,69	3,43	87,24	0,070	0,028	0,035	0,894	1,025
SD	0,82	0,13	0,93	0,31	0,013	0,002	0,007	0,054	0,062
SE	0,47	0,07	0,54	0,18	0,007	0,001	0,004	0,031	0,036
min	5,95	2,60	2,64	86,99	0,058	0,025	0,029	0,842	0,968
max	7,59	2,84	4,46	87,59	0,083	0,029	0,043	0,950	1,091
0,046	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-	7,11	5,53	1,98	84,98	0,130	0,101	0,036	1,548	1,822
-2-	8,94	5,53	3,83	82,13	0,151	0,094	0,065	1,390	1,692
-3-	8,20	4,92	3,28	83,20	0,144	0,086	0,058	1,462	1,757
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,08	5,33	3,03	83,43	0,142	0,094	0,053	1,466	1,757
SD	0,92	0,35	0,95	1,44	0,011	0,007	0,015	0,079	0,065
SE	0,53	0,20	0,55	0,83	0,006	0,004	0,009	0,046	0,037
min	7,11	4,92	1,98	82,13	0,130	0,086	0,036	1,390	1,692
max	8,94	5,53	3,83	84,98	0,151	0,101	0,065	1,548	1,822
0,091	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-	6,59	7,75	3,49	82,56	0,242	0,285	0,128	3,031	3,672
-2-	9,17	7,42	4,37	78,60	0,299	0,242	0,142	2,562	3,259
-3-	7,91	8,70	3,16	80,63	0,285	0,313	0,114	2,903	3,601
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,89	7,96	3,67	80,60	0,275	0,280	0,128	2,832	3,510
SD	1,29	0,66	0,62	1,98	0,030	0,036	0,014	0,243	0,221
SE	0,75	0,38	0,36	1,14	0,017	0,021	0,008	0,140	0,127
min	6,59	7,42	3,16	78,60	0,242	0,242	0,114	2,562	3,259
max	9,17	8,70	4,37	82,56	0,299	0,313	0,142	3,031	3,672
0,185	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-	8,05	6,51	2,30	83,14	0,606	0,491	0,173	6,267	7,538
-2-	7,42	7,86	2,62	82,10	0,491	0,520	0,173	5,429	6,613
-3-	7,98	7,14	2,94	81,51	0,549	0,491	0,202	5,603	6,873
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,82	7,17	2,62	82,25	0,549	0,501	0,183	5,766	7,008
SD	0,34	0,67	0,32	0,83	0,058	0,017	0,017	0,442	0,477
SE	0,20	0,39	0,19	0,48	0,033	0,010	0,010	0,255	0,275
min	7,42	6,51	2,30	81,51	0,491	0,491	0,173	5,429	6,613
max	8,05	7,86	2,94	83,14	0,606	0,520	0,202	6,267	7,538

Fortsetzung Tabelle A2 Lungenmikrosomen: Prozentualer Anteil der Metaboliten und relativer Umsatz in pg/mg Protein/min

	0,369	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-		6,90	9,20	2,68	81,61	1,037	1,382	0,403	12,267	15,031
-2-		9,17	7,42	3,49	79,91	1,209	0,979	0,461	10,539	13,188
-3-		7,50	8,75	3,33	80,42	1,037	1,209	0,461	11,115	13,822
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		7,86	8,46	3,17	80,65	1,094	1,190	0,442	11,307	14,014
SD		1,18	0,92	0,43	0,87	0,100	0,202	0,033	0,880	0,936
SE		0,68	0,53	0,25	0,50	0,058	0,117	0,019	0,508	0,541
min		6,90	7,42	2,68	79,91	1,037	0,979	0,403	10,539	13,188
max		9,17	9,20	3,49	81,61	1,209	1,382	0,461	12,267	15,031
	0,721	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-		8,06	8,79	2,93	80,22	2,479	2,704	0,901	24,674	30,759
-2-		9,80	6,27	3,92	80,39	2,817	1,803	1,127	23,097	28,731
-3-		8,47	8,06	3,23	79,84	2,366	2,253	0,901	22,308	27,942
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		8,78	7,71	3,36	80,15	2,554	2,253	0,976	23,360	29,144
SD		0,91	1,30	0,51	0,28	0,235	0,451	0,130	1,205	1,453
SE		0,53	0,75	0,29	0,16	0,135	0,260	0,075	0,696	0,839
min		8,06	6,27	2,93	79,84	2,366	1,803	0,901	22,308	27,942
max		9,80	8,79	3,92	80,39	2,817	2,704	1,127	24,674	30,759
	1,47	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-		7,20	8,00	2,00	82,80	4,137	4,597	1,149	47,580	57,464
-2-		11,69	7,36	3,03	77,92	6,206	3,908	1,609	41,374	53,097
-3-		8,91	7,69	2,43	81,38	5,057	4,367	1,379	46,201	56,774
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		9,27	7,68	2,49	80,70	5,133	4,291	1,379	45,052	55,778
SD		2,27	0,32	0,52	2,51	1,036	0,351	0,230	3,259	2,348
SE		1,31	0,19	0,30	1,45	0,598	0,203	0,133	1,881	1,356
min		7,20	7,36	2,00	77,92	4,137	3,908	1,149	41,374	53,097
max		11,69	8,00	3,03	82,80	6,206	4,597	1,609	47,580	57,464
	2,93	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-		7,09	7,87	2,76	82,28	8,251	9,167	3,209	95,800	116,43
-2-		10,44	7,63	3,21	78,71	11,918	8,709	3,667	89,841	114,14
-3-		7,72	6,95	3,86	81,47	9,167	8,251	4,584	96,716	118,72
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		8,42	7,48	3,28	80,82	9,779	8,709	3,820	94,119	116,43
SD		1,78	0,48	0,56	1,87	1,908	0,458	0,700	3,733	2,292
SE		1,03	0,28	0,32	1,08	1,102	0,265	0,404	2,155	1,323
min		7,09	6,95	2,76	78,71	8,251	8,251	3,209	89,841	114,14
max		10,44	7,87	3,86	82,28	11,918	9,167	4,584	96,716	118,72
	6,05	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-		7,26	9,27	2,82	80,24	17,005	21,728	6,613	188,00	234,29
-2-		8,94	7,32	4,47	79,27	20,783	17,005	10,392	184,22	232,40
-3-		7,60	8,00	3,20	81,60	17,949	18,894	7,558	192,72	236,16
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		7,93	8,20	3,50	80,37	18,579	19,209	8,187	188,31	234,29
SD		0,89	0,99	0,86	1,17	1,967	2,377	1,967	4,260	1,889
SE		0,51	0,57	0,50	0,68	1,135	1,373	1,135	2,459	1,091
min		7,26	7,32	2,82	79,27	17,005	17,005	6,613	184,22	232,40
max		8,94	9,27	4,47	81,60	20,783	21,728	10,392	192,72	236,18
	12,8	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-		10,16	8,54	2,85	78,46	49,985	41,987	13,996	385,88	491,85
-2-		12,17	8,70	3,91	75,22	55,983	39,988	17,994	345,89	459,86
-3-		10,83	7,50	3,33	78,33	51,984	35,989	15,995	375,89	479,85
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		11,06	8,24	3,36	77,34	52,651	39,321	15,995	369,22	477,19
SD		1,02	0,65	0,53	1,84	3,054	3,054	1,999	20,810	16,161
SE		0,59	0,37	0,31	1,06	1,763	1,763	1,154	12,015	9,33
min		10,16	7,50	2,85	75,22	49,985	35,989	13,996	345,89	459,86
max		12,17	8,70	3,91	78,46	55,983	41,987	17,994	385,88	491,85

Fortsetzung Tabelle A2 Lungenmikrosomen: Prozentualer Anteil der Metaboliten und relativer Umsatz in pg/mg Protein/min

49	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-	8,64	8,18	2,27	81,36	144,83	137,24	38,122	1364,8	1677,4
-2-	2,86	7,14	4,76	85,24	45,746	114,37	76,244	1364,8	1601,1
-3-	9,21	8,37	3,35	79,50	167,74	152,49	60,995	1448,6	1822,2
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,90	7,90	3,46	82,03	119,45	134,70	58,454	1392,7	1700,2
SD	3,51	0,66	1,25	2,93	64,845	19,188	19,188	48,421	112,31
SE	2,03	0,38	0,72	1,69	37,438	11,078	11,078	27,956	64,845
min	2,86	7,14	2,27	79,50	45,746	114,37	38,122	1364,8	1601,1
max	9,21	8,37	4,76	85,24	167,74	152,49	76,244	1448,6	1822,2
101	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-	9,35	5,61	3,74	80,84	316,40	189,84	126,59	2736,8	3385,4
-2-	9,43	6,60	5,66	78,30	316,40	221,48	189,84	2626,1	3353,8
-3-	8,00	7,11	4,44	80,44	284,76	253,12	158,20	2863,4	3559,4
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,93	6,44	4,61	79,86	305,85	221,48	158,20	2742,1	3432,9
SD	0,80	0,76	0,97	1,37	18,267	31,639	31,639	118,74	110,74
SE	0,46	0,44	0,56	0,79	10,546	18,267	18,267	68,552	63,935
min	8,00	5,61	3,74	78,30	284,76	189,84	126,56	2626,1	3353,8
max	9,43	7,11	5,66	80,84	316,40	253,12	189,84	2863,4	3559,4
251	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-	10,78	8,82	5,39	75,00	863,83	706,77	431,92	6007,5	8010,1
-2-	11,98	6,77	3,65	77,60	903,10	510,45	274,86	5850,5	7538,9
-3-	10,05	8,61	4,78	76,56	824,57	706,77	392,65	6282,4	8206,4
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,94	8,07	4,61	76,39	863,83	641,33	366,47	6046,8	7918,4
SD	0,97	1,13	0,89	1,31	39,265	113,35	81,737	218,6	343,05
SE	0,56	0,65	0,51	0,76	22,670	65,442	47,191	126,2	198,06
min	10,05	6,77	3,65	75,00	824,57	510,45	274,86	5850,5	7538,9
max	11,98	8,82	5,39	77,60	903,10	706,77	431,92	6282,4	8206,4
499	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	NNK
-1-	9,47	8,28	4,14	78,11	1247,0	1091,1	545,56	10288	13171
-2-	10,49	7,41	6,17	75,93	1324,9	935,24	779,37	9586,2	12626
-3-	9,09	7,95	4,55	78,41	1247,0	1091,1	623,50	10755	13717
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	9,68	7,88	4,95	77,48	1273,0	1039,2	649,47	10210	13171
SD	0,73	0,44	1,08	1,35	44,997	89,99	119,05	588,41	545,56
SE	0,42	0,26	0,62	0,78	25,979	51,96	68,734	339,72	314,98
min	9,09	7,41	4,14	75,93	1247,0	935,24	545,56	9586,2	12626
max	10,49	8,28	6,17	78,41	1324,9	1091,1	779,37	10755	13717

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid

Tabelle A3 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von α -Naphthoflavin (NF) auf den Umsatz von 46 nM NNK

c (NF) [μ M]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle					
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
0												
-1-	5,04	7,81	2,77	11,59	72,80	24,44	3,97	0,20	0,31	0,11	0,46	2,89
-2-	5,02	9,13	2,05	11,19	72,60	25,34	4,38	0,22	0,40	0,09	0,49	3,18
-3-	4,83	9,18	2,42	11,59	71,98	25,60	4,14	0,20	0,38	0,10	0,48	2,98
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	4,96	8,71	2,41	11,46	72,46	25,13	4,16	0,21	0,36	0,10	0,48	3,02
SD	0,12	0,78	0,36	0,23	0,43	0,61	0,21	0,01	0,05	0,01	0,02	0,15
SE	0,07	0,45	0,21	0,13	0,25	0,35	0,12	0,01	0,03	0,01	0,01	0,09
min	4,83	7,81	2,05	11,19	71,98	24,44	3,97	0,20	0,31	0,09	0,46	2,89
max	5,04	9,18	2,77	11,59	72,80	25,60	4,38	0,22	0,40	0,11	0,49	3,18
1												
-1-	6,30	8,31	2,58	4,30	78,80	18,91	3,49	0,22	0,29	0,09	0,15	2,75
-2-	4,35	6,67	2,03	5,22	81,45	16,24	3,45	0,15	0,23	0,07	0,17	2,81
-3-	5,06	7,30	2,25	4,78	80,62	17,14	3,56	0,18	0,26	0,08	0,18	2,87
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,24	7,43	2,28	4,76	80,29	17,43	3,50	0,18	0,26	0,08	0,17	2,81
SD	0,99	0,83	0,28	0,46	1,36	1,36	0,06	0,04	0,03	0,01	0,02	0,06
SE	0,57	0,48	0,16	0,27	0,78	0,78	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,03
min	4,35	6,67	2,03	4,30	78,80	16,24	3,45	0,15	0,23	0,07	0,15	2,75
max	6,30	8,31	2,58	5,22	81,45	18,91	3,56	0,22	0,29	0,09	0,18	2,81
5												
-1-	6,45	10,39	3,94	3,23	75,99	20,07	2,79	0,18	0,29	0,11	0,09	2,12
-2-	5,97	7,86	3,77	5,03	77,36	18,86	3,18	0,19	0,25	0,12	0,16	2,46
-3-	6,85	8,22	3,42	4,11	77,40	19,18	2,92	0,20	0,24	0,10	0,12	2,26
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,43	8,83	3,71	4,12	76,91	19,37	2,96	0,19	0,26	0,11	0,12	2,28
SD	0,44	1,37	0,26	0,90	0,80	0,63	0,20	0,01	0,03	0,01	0,04	0,17
SE	0,25	0,79	0,15	0,52	0,46	0,36	0,11	0,01	0,02	0,01	0,02	0,10
min	5,97	7,86	3,42	3,23	75,99	18,86	2,79	0,18	0,24	0,10	0,09	2,12
max	6,85	10,39	3,94	5,03	77,40	20,07	3,18	0,20	0,29	0,12	0,16	2,46
10												
-1-	8,40	10,08	1,68	3,78	76,05	22,26	2,38	0,20	0,24	0,04	0,09	1,81
-2-	6,08	9,80	2,36	5,07	76,69	20,95	2,96	0,18	0,29	0,07	0,15	2,27
-3-	7,41	9,63	2,96	4,44	75,56	21,48	2,70	0,20	0,26	0,08	0,12	2,04
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,30	9,84	2,34	4,43	76,10	21,56	2,68	0,19	0,26	0,06	0,12	2,04
SD	1,17	0,23	0,64	0,64	0,57	0,66	0,29	0,01	0,03	0,02	0,03	0,23
SE	0,67	0,13	0,37	0,37	0,33	0,38	0,17	0,01	0,01	0,01	0,02	0,13
min	6,08	9,63	1,68	3,78	75,56	20,95	2,38	0,18	0,24	0,04	0,09	1,81
max	8,40	10,08	2,96	5,07	76,69	22,26	2,96	0,20	0,29	0,08	0,15	2,27
25												
-1-	4,56	9,12	2,28	6,51	77,52	20,19	3,07	0,14	0,28	0,07	0,20	2,38
-2-	5,66	7,01	2,16	7,55	77,36	20,22	3,71	0,21	0,26	0,08	0,28	2,87
-3-	5,29	7,65	2,35	7,06	77,65	20,00	3,40	0,18	0,26	0,08	0,24	2,64
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,17	7,93	2,26	7,04	77,51	20,14	3,39	0,18	0,27	0,08	0,24	2,63
SD	0,56	1,08	0,10	0,52	0,14	0,12	0,32	0,04	0,01	0,01	0,04	0,25
SE	0,32	0,63	0,06	0,30	0,08	0,07	0,18	0,02	0,01	0,00	0,02	0,14
min	4,56	7,01	2,16	6,51	77,36	20,00	3,07	0,14	0,26	0,07	0,20	2,38
max	5,66	9,12	2,35	7,55	77,65	20,22	3,71	0,21	0,28	0,08	0,28	2,87
50												
-1-	4,14	7,32	1,59	4,78	81,85	16,24	3,14	0,13	0,23	0,05	0,15	2,57
-2-	3,98	7,10	2,27	6,25	80,11	17,33	3,52	0,14	0,25	0,08	0,22	2,82
-3-	4,26	7,90	2,13	5,47	80,24	17,63	3,29	0,14	0,26	0,07	0,18	2,64
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	4,12	7,44	2,00	5,50	80,73	17,07	3,32	0,14	0,25	0,07	0,18	2,68
SD	0,14	0,41	0,36	0,74	0,97	0,73	0,19	0,01	0,02	0,02	0,04	0,13
SE	0,08	0,24	0,21	0,43	0,56	0,42	0,11	0,00	0,01	0,01	0,02	0,07
min	3,98	7,10	1,59	4,78	80,11	16,24	3,14	0,13	0,23	0,05	0,15	2,57
max	4,26	7,90	2,27	6,25	81,85	17,63	3,52	0,14	0,26	0,08	0,22	2,82

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung

Tabelle A4 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von α -Naphthoflavin (NF) auf den Umsatz von 49 μ M NNK

c (NF) [μ M]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle					
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
0												
-1-	6,23	7,61	2,08	12,46	71,97	26,30	2,89	0,18	0,22	0,06	0,36	2,08
-2-	4,15	8,30	3,46	12,46	71,63	24,91	2,89	0,12	0,24	0,10	0,36	2,07
-3-	4,86	8,33	2,78	13,19	70,83	26,38	2,88	0,14	0,24	0,08	0,38	2,04
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,08	8,08	2,77	12,70	71,48	25,86	2,89	0,15	0,23	0,08	0,37	2,06
SD	1,06	0,41	0,69	0,43	0,58	0,83	0,01	0,03	0,01	0,02	0,01	0,02
SE	0,61	0,24	0,40	0,25	0,34	0,48	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
min	4,15	7,61	2,08	12,46	70,83	24,91	2,88	0,12	0,22	0,06	0,36	2,04
max	6,23	8,33	3,46	13,19	71,97	26,38	2,89	0,18	0,24	0,10	0,38	2,08
1												
-1-	5,11	9,12	2,92	6,57	76,64	20,80	2,74	0,14	0,25	0,08	0,18	2,10
-2-	6,99	8,39	3,50	7,34	73,43	22,72	2,86	0,20	0,24	0,10	0,21	2,10
-3-	5,95	8,18	3,35	7,43	75,09	21,56	2,69	0,16	0,22	0,09	0,20	2,02
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,02	8,56	3,25	7,12	75,05	21,69	2,76	0,17	0,24	0,09	0,20	2,07
SD	0,94	0,50	0,30	0,48	1,61	0,97	0,09	0,03	0,02	0,01	0,02	0,05
SE	0,54	0,29	0,17	0,27	0,93	0,56	0,05	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03
min	5,11	8,18	2,92	6,57	73,43	20,80	2,69	0,14	0,22	0,08	0,18	2,02
max	6,99	9,12	3,50	7,43	76,64	22,72	2,86	0,20	0,25	0,10	0,21	2,10
5												
-1-	6,87	10,69	2,67	5,34	74,05	22,90	2,62	0,18	0,28	0,07	0,14	1,94
-2-	4,58	10,83	4,17	4,58	75,83	19,99	2,40	0,11	0,26	0,10	0,11	1,82
-3-	5,67	10,53	3,64	4,86	75,30	21,06	2,47	0,14	0,26	0,09	0,12	1,86
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,71	10,68	3,49	4,93	75,06	21,32	2,50	0,14	0,27	0,09	0,12	1,87
SD	1,14	0,15	0,76	0,38	0,92	1,47	0,11	0,04	0,01	0,02	0,02	0,06
SE	0,66	0,09	0,44	0,22	0,53	0,85	0,06	0,02	0,01	0,01	0,01	0,04
min	4,58	10,53	2,67	4,58	74,05	19,99	2,40	0,11	0,26	0,07	0,11	1,82
max	6,87	10,83	4,17	5,34	75,83	22,90	2,62	0,18	0,28	0,10	0,14	1,94
10												
-1-	8,03	10,58	2,55	6,20	72,99	24,81	2,74	0,22	0,29	0,07	0,17	2,00
-2-	8,10	10,93	2,83	5,67	72,87	24,70	2,47	0,20	0,27	0,07	0,14	1,80
-3-	7,60	10,65	3,04	6,08	72,62	24,33	2,63	0,20	0,28	0,08	0,16	1,91
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,91	10,72	2,81	5,99	72,83	24,61	2,61	0,21	0,28	0,07	0,16	1,90
SD	0,27	0,19	0,24	0,28	0,19	0,25	0,14	0,01	0,01	0,01	0,02	0,10
SE	0,15	0,11	0,14	0,16	0,11	0,15	0,08	0,01	0,01	0,00	0,01	0,06
min	7,60	10,58	2,55	5,67	72,62	24,33	2,47	0,20	0,27	0,07	0,14	1,80
max	8,10	10,93	3,04	6,20	72,99	24,81	2,74	0,22	0,29	0,08	0,17	2,00
25												
-1-	3,69	9,06	2,35	7,72	76,85	20,47	2,98	0,11	0,27	0,07	0,23	2,29
-2-	6,21	9,63	2,48	9,01	72,98	24,85	3,22	0,20	0,31	0,08	0,29	2,35
-3-	5,79	9,00	2,57	8,36	74,28	23,15	3,11	0,18	0,28	0,08	0,26	2,31
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,23	9,23	2,47	8,36	74,70	22,82	3,10	0,16	0,29	0,08	0,26	2,32
SD	1,35	0,35	0,11	0,64	1,97	2,21	0,12	0,05	0,02	0,01	0,03	0,03
SE	0,78	0,20	0,06	0,37	1,14	1,27	0,07	0,03	0,01	0,00	0,02	0,02
min	3,69	9,00	2,35	7,72	72,98	20,47	2,98	0,11	0,27	0,07	0,23	2,29
max	6,21	9,63	2,57	9,01	76,85	24,85	3,22	0,20	0,31	0,08	0,29	2,35
50												
-1-	6,11	9,92	2,67	6,49	74,43	22,52	2,62	0,16	0,26	0,07	0,17	1,95
-2-	7,07	9,09	2,69	6,40	74,75	22,56	2,97	0,21	0,27	0,08	0,19	2,22
-3-	6,57	9,49	2,55	6,20	75,18	22,26	2,74	0,18	0,26	0,07	0,17	2,06
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,58	9,50	2,64	6,36	74,79	22,45	2,78	0,18	0,26	0,07	0,18	2,08
SD	0,48	0,42	0,07	0,15	0,38	0,16	0,18	0,03	0,01	0,01	0,01	0,14
SE	0,28	0,24	0,04	0,08	0,22	0,09	0,10	0,01	0,00	0,00	0,01	0,08
min	6,11	9,09	2,55	6,20	74,43	22,26	2,62	0,16	0,26	0,07	0,17	1,95
max	7,07	9,92	2,69	6,49	75,18	22,56	2,97	0,21	0,27	0,08	0,19	2,22

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung

Tabelle A5 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von 8-Methoxypsoralen (MOP) auf den Umsatz von 46 nM NNK

c (MOP) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle					
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
0												
-1-	4,95	7,29	1,56	12,50	73,70	24,74	3,84	0,19	0,28	0,06	0,48	2,83
-2-	6,17	6,70	3,22	10,19	73,99	23,06	3,73	0,23	0,25	0,12	0,38	2,76
-3-	5,18	7,25	2,59	11,92	73,06	24,35	3,86	0,20	0,28	0,10	0,46	2,82
n	3	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,43	7,08	2,46	11,53	73,58	24,05	3,81	0,21	0,27	0,09	0,44	2,80
SD	0,65	0,33	0,84	1,20	0,48	0,88	0,07	0,02	0,02	0,03	0,05	0,04
SE	0,37	0,19	0,48	0,69	0,28	0,51	0,04	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02
min	4,95	6,70	1,56	10,19	73,06	23,06	3,73	0,19	0,25	0,06	0,38	2,76
max	6,17	7,29	3,22	12,50	73,99	24,74	3,86	0,23	0,28	0,12	0,48	2,83
1												
-1-	5,87	6,70	2,79	3,91	80,73	16,48	3,58	0,21	0,24	0,10	0,14	2,89
-2-	4,46	6,30	2,62	4,99	81,89	15,75	3,81	0,17	0,24	0,10	0,19	3,12
-3-	5,49	6,04	2,47	4,12	81,87	15,65	3,64	0,20	0,22	0,09	0,15	2,98
n	3	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,27	6,35	2,63	4,34	81,49	15,96	3,68	0,19	0,23	0,10	0,16	3,00
SD	0,73	0,33	0,16	0,57	0,67	0,45	0,12	0,02	0,01	0,01	0,03	0,12
SE	0,42	0,19	0,09	0,33	0,38	0,26	0,07	0,01	0,01	0,00	0,02	0,07
min	4,46	6,04	2,47	3,91	80,73	15,65	3,58	0,17	0,22	0,09	0,14	2,89
max	5,87	6,70	2,79	4,99	81,89	16,48	3,81	0,21	0,24	0,10	0,19	3,12
5												
-1-	4,76	5,88	2,80	3,08	83,19	13,72	3,57	0,17	0,21	0,10	0,11	2,97
-2-	6,37	6,65	2,49	3,05	81,44	16,07	3,61	0,23	0,24	0,09	0,11	2,94
-3-	5,90	6,18	3,09	3,65	81,18	15,73	3,56	0,21	0,22	0,11	0,13	2,89
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,68	6,24	2,79	3,26	81,94	15,17	3,58	0,20	0,22	0,10	0,12	2,93
SD	0,83	0,39	0,30	0,34	1,10	1,27	0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,04
SE	0,48	0,22	0,17	0,20	0,63	0,73	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02
min	4,76	5,88	2,49	3,05	81,18	13,72	3,56	0,17	0,21	0,09	0,11	2,89
max	6,37	6,65	3,09	3,65	83,19	16,07	3,61	0,23	0,24	0,11	0,13	2,97
10												
-1-	5,18	6,48	2,85	2,59	82,90	14,52	3,86	0,20	0,25	0,11	0,10	3,20
-2-	5,10	6,23	0,00	2,83	85,84	14,16	3,53	0,18	0,22	0,00	0,10	3,03
-3-	6,06	6,34	0,00	2,20	85,40	14,60	3,63	0,22	0,23	0,00	0,08	3,10
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,45	6,35	0,95	2,54	84,71	14,43	3,67	0,20	0,23	0,04	0,09	3,11
SD	0,53	0,12	1,65	0,32	1,58	0,23	0,17	0,02	0,02	0,06	0,01	0,09
SE	0,31	0,07	0,95	0,18	0,91	0,14	0,10	0,01	0,01	0,04	0,01	0,05
min	5,10	6,23	0,00	2,20	82,90	14,16	3,53	0,18	0,22	0,00	0,08	3,03
max	6,06	6,48	2,85	2,83	85,84	14,60	3,86	0,22	0,25	0,11	0,10	3,20
25												
-1-	4,62	7,61	0,00	2,72	85,05	12,23	3,68	0,17	0,28	0,00	0,10	3,13
-2-	4,69	6,16	2,35	0,00	86,80	13,20	3,41	0,16	0,21	0,08	0,00	2,96
-3-	5,08	7,06	0,00	0,00	87,85	12,14	3,54	0,18	0,25	0,00	0,00	3,11
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	4,80	6,94	0,78	0,91	86,57	12,52	3,54	0,17	0,25	0,03	0,03	3,07
SD	0,25	0,73	1,36	1,57	1,41	0,59	0,14	0,01	0,04	0,05	0,06	0,09
SE	0,14	0,42	0,78	0,91	0,82	0,34	0,08	0,01	0,02	0,03	0,03	0,05
min	4,62	6,16	0,00	0,00	85,05	12,14	3,41	0,16	0,21	0,00	0,00	2,96
max	5,08	7,61	2,35	2,72	87,85	13,20	3,68	0,18	0,28	0,08	0,10	3,13
50												
-1-	7,51	8,70	3,56	0,00	80,24	16,21	2,53	0,19	0,22	0,09	0,00	2,03
-2-	9,40	5,64	4,14	0,00	81,20	15,04	2,66	0,25	0,15	0,11	0,00	2,16
-3-	9,16	6,87	3,82	0,00	80,15	16,03	2,62	0,24	0,18	0,10	0,00	2,10
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,69	7,07	3,84	0,00	80,53	15,76	2,60	0,23	0,18	0,10	0,00	2,10
SD	1,03	1,54	0,29	0,00	0,58	0,63	0,07	0,03	0,04	0,01	0,00	0,07
SE	0,59	0,89	0,17	0,00	0,34	0,36	0,04	0,02	0,02	0,01	0,00	0,04
min	7,51	5,64	3,56	0,00	80,15	15,04	2,53	0,19	0,15	0,09	0,00	2,03
max	9,40	8,70	4,14	0,00	81,20	16,21	2,66	0,25	0,22	0,11	0,00	2,16

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A6 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von 8-Methoxypsoralen (MOP) auf den Umsatz von 49 µM NNK

c (MOP) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle					
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
0												
-1-	5,93	8,76	3,95	13,84	67,51	28,53	3,54	0,21	0,31	0,14	0,49	2,39
-2-	5,71	8,41	3,60	15,32	67,27	29,44	3,33	0,19	0,28	0,12	0,51	2,24
-3-	7,27	7,58	4,55	13,64	66,97	28,49	3,30	0,24	0,25	0,15	0,45	2,21
n	3		3		3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,30	8,25	4,03	14,62	67,25	28,82	3,39	0,21	0,28	0,14	0,48	2,28
SD	0,85	0,61	0,48	0,92	0,27	0,54	0,13	0,03	0,03	0,02	0,03	0,10
SE	0,49	0,35	0,27	0,53	0,16	0,31	0,08	0,02	0,02	0,01	0,02	0,06
min	5,71	7,58	3,60	13,64	66,97	28,49	3,30	0,19	0,25	0,12	0,45	2,21
max	7,27	8,76	4,55	15,32	67,51	29,44	3,54	0,24	0,31	0,15	0,51	2,39
1												
-1-	6,76	7,77	3,38	4,39	77,36	18,92	2,96	0,20	0,23	0,10	0,13	2,29
-2-	6,87	9,62	4,12	4,81	74,57	21,30	2,91	0,20	0,28	0,12	0,14	2,17
-3-	6,00	8,33	3,33	4,00	78,33	18,33	3,00	0,18	0,25	0,10	0,12	2,35
n	3		3		3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,54	8,58	3,61	4,40	76,76	19,52	2,96	0,19	0,25	0,11	0,13	2,27
SD	0,47	0,95	0,44	0,41	1,95	1,57	0,05	0,01	0,03	0,01	0,01	0,09
SE	0,27	0,55	0,26	0,23	1,13	0,91	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05
min	6,00	7,77	3,33	4,00	74,57	18,33	2,91	0,18	0,23	0,10	0,12	2,17
max	6,87	9,62	4,12	4,81	78,33	21,30	3,00	0,20	0,28	0,10	0,14	2,35
5												
-1-	6,12	8,50	3,06	5,44	76,53	20,06	2,94	0,18	0,25	0,09	0,16	2,25
-2-	6,38	7,05	3,69	5,03	78,19	18,46	2,98	0,19	0,21	0,11	0,15	2,33
-3-	5,67	6,67	3,00	4,67	80,00	17,01	3,00	0,17	0,20	0,09	0,14	2,40
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,05	7,41	3,25	5,05	78,24	18,51	2,97	0,18	0,22	0,10	0,15	2,33
SD	0,36	0,97	0,38	0,39	1,74	1,53	0,03	0,01	0,03	0,01	0,01	0,08
SE	0,21	0,56	0,22	0,22	1,00	0,88	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,04
min	5,67	6,67	3,00	4,67	76,53	17,01	2,94	0,17	0,20	0,09	0,14	2,25
max	6,38	8,50	3,69	5,44	80,00	20,06	3,00	0,19	0,25	0,11	0,16	2,40
10												
-1-	7,75	9,59	2,95	3,32	76,38	20,66	2,71	0,21	0,26	0,08	0,09	2,07
-2-	6,69	7,04	5,63	3,87	76,76	17,60	2,84	0,19	0,20	0,16	0,11	2,18
-3-	6,55	8,73	3,64	4,00	77,09	19,28	2,75	0,18	0,24	0,10	0,11	2,12
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,99	8,45	4,07	3,73	76,75	19,18	2,77	0,19	0,23	0,11	0,10	2,12
SD	0,66	1,30	1,39	0,36	0,35	1,53	0,07	0,02	0,03	0,04	0,01	0,06
SE	0,38	0,75	0,80	0,21	0,20	0,88	0,04	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03
min	6,55	7,04	2,95	3,32	76,38	17,60	2,71	0,18	0,20	0,08	0,09	2,07
max	7,75	9,59	5,63	4,00	77,09	20,66	2,84	0,21	0,26	0,16	0,11	2,18
25												
-1-	7,43	7,77	3,04	4,05	78,04	19,25	2,96	0,22	0,23	0,09	0,12	2,31
-2-	8,05	8,39	2,01	5,03	76,51	21,47	2,98	0,24	0,25	0,06	0,15	2,28
-3-	7,38	7,38	2,68	3,69	78,86	18,45	2,98	0,22	0,22	0,08	0,11	2,35
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,62	7,85	2,58	4,26	77,80	19,72	2,97	0,23	0,23	0,08	0,13	2,31
SD	0,37	0,51	0,52	0,69	1,19	1,56	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04
SE	0,22	0,29	0,30	0,40	0,69	0,90	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
min	7,38	7,38	2,01	3,69	76,51	18,45	2,96	0,22	0,22	0,06	0,11	2,28
max	8,05	8,39	3,04	5,03	78,86	21,47	2,98	0,24	0,25	0,09	0,15	2,35
50												
-1-	6,82	7,95	3,79	3,79	77,65	18,56	2,64	0,18	0,21	0,10	0,10	2,05
-2-	9,13	9,57	2,61	3,91	74,78	22,61	2,30	0,21	0,22	0,06	0,09	1,72
-3-	7,32	8,13	3,25	4,07	76,83	19,52	2,46	0,18	0,20	0,08	0,10	1,89
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,76	8,55	3,22	3,92	76,42	20,23	2,47	0,19	0,21	0,08	0,10	1,89
SD	1,22	0,88	0,59	0,14	1,48	2,12	0,17	0,02	0,01	0,02	0,01	0,17
SE	0,70	0,51	0,34	0,08	0,85	1,22	0,10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,10
min	6,82	7,95	2,61	3,79	74,78	18,56	2,30	0,18	0,20	0,06	0,09	1,72
max	9,13	9,57	3,79	4,07	77,65	22,61	2,64	0,21	0,22	0,10	0,10	2,05

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A7 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von Chlorzoxazon (CZ) auf den Umsatz von 46 nM NNK

c (CZ) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle					
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
0												
-1-	9,00	7,30	2,92	11,68	69,10	27,98	4,11	0,37	0,30	0,12	0,48	2,84
-2-	5,88	8,24	2,35	11,76	71,76	25,88	4,25	0,25	0,35	0,10	0,50	3,05
-3-	7,58	7,35	2,84	11,61	70,62	26,54	4,22	0,32	0,31	0,12	0,49	2,98
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,49	7,63	2,71	11,68	70,49	26,80	4,19	0,31	0,32	0,11	0,49	2,96
SD	1,56	0,53	0,31	0,08	1,34	1,07	0,07	0,06	0,03	0,01	0,01	0,11
SE	0,90	0,30	0,18	0,04	0,77	0,62	0,04	0,03	0,02	0,01	0,01	0,06
min	5,88	7,30	2,35	11,61	69,10	25,88	4,11	0,25	0,30	0,10	0,48	2,84
max	9,00	8,24	2,92	11,76	71,76	27,98	4,25	0,37	0,35	0,12	0,50	3,05
1												
-1-	10,00	4,59	5,41	8,11	72,16	22,70	3,70	0,37	0,17	0,20	0,30	2,67
-2-	8,49	5,84	2,92	5,57	77,45	19,90	3,77	0,32	0,22	0,11	0,21	2,92
-3-	8,18	6,07	3,69	6,60	75,46	20,85	3,79	0,31	0,23	0,14	0,25	2,86
n	3	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,89	5,50	4,01	6,76	75,03	21,15	3,75	0,33	0,21	0,15	0,25	2,82
SD	0,97	0,79	1,27	1,28	2,67	1,42	0,05	0,03	0,03	0,05	0,05	0,13
SE	0,56	0,46	0,73	0,74	1,54	0,82	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,08
min	8,18	4,59	2,92	5,57	72,16	19,90	3,70	0,31	0,17	0,11	0,21	2,67
max	10,00	6,07	5,41	8,11	77,45	22,70	3,79	0,37	0,23	0,20	0,30	2,92
5												
-1-	9,28	4,19	4,19	5,39	76,65	18,86	3,34	0,31	0,14	0,14	0,18	2,56
-2-	9,04	3,88	3,62	7,49	75,97	20,41	3,87	0,35	0,15	0,14	0,29	2,94
-3-	8,79	3,85	4,40	6,59	76,37	19,23	3,64	0,32	0,14	0,16	0,24	2,78
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	9,04	3,97	4,07	6,49	76,33	19,50	3,62	0,33	0,14	0,15	0,24	2,76
SD	0,25	0,19	0,40	1,06	0,34	0,81	0,27	0,02	0,01	0,01	0,06	0,19
SE	0,14	0,11	0,23	0,61	0,20	0,47	0,15	0,01	0,00	0,01	0,03	0,11
min	8,79	3,85	3,62	5,39	75,97	18,86	3,34	0,31	0,14	0,14	0,18	2,56
max	9,28	4,19	4,40	7,49	76,65	20,41	3,87	0,35	0,15	0,16	0,29	2,94
10												
-1-	10,40	4,27	4,00	7,73	73,60	22,40	3,75	0,39	0,16	0,15	0,29	2,76
-2-	8,59	4,99	4,16	6,93	75,35	20,51	3,61	0,31	0,16	0,15	0,25	2,72
-3-	9,38	4,83	3,75	6,97	75,07	21,18	3,73	0,35	0,18	0,14	0,26	2,80
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	9,46	4,69	3,97	7,21	74,67	21,36	3,70	0,35	0,17	0,15	0,27	2,76
SD	0,91	0,38	0,20	0,45	0,94	0,96	0,08	0,04	0,01	0,01	0,02	0,04
SE	0,52	0,22	0,12	0,26	0,54	0,55	0,04	0,02	0,01	0,00	0,01	0,02
min	8,59	4,27	3,75	6,93	73,60	20,51	3,61	0,31	0,16	0,14	0,25	2,72
max	10,40	4,99	4,16	7,73	75,35	22,40	3,75	0,39	0,18	0,15	0,29	2,80
25												
-1-	8,72	4,84	3,15	5,81	77,72	19,37	4,13	0,36	0,20	0,13	0,24	3,21
-2-	7,82	4,40	4,40	5,62	77,75	17,84	4,09	0,32	0,18	0,18	0,23	3,18
-3-	8,31	3,91	3,67	5,87	78,24	18,09	4,09	0,34	0,16	0,15	0,24	3,20
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,28	4,39	3,74	5,77	77,90	18,43	4,10	0,34	0,18	0,15	0,24	3,20
SD	0,45	0,47	0,63	0,13	0,29	0,82	0,02	0,02	0,02	0,03	0,01	0,02
SE	0,26	0,27	0,36	0,07	0,17	0,47	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01
min	7,82	3,91	3,15	5,62	77,72	17,84	4,09	0,32	0,16	0,13	0,23	3,18
max	8,72	4,84	4,40	5,87	78,24	19,37	4,13	0,36	0,20	0,18	0,24	3,21
50												
-1-	8,25	4,37	3,40	5,34	78,64	17,96	4,12	0,34	0,18	0,14	0,22	3,24
-2-	7,81	4,03	4,53	5,04	78,84	16,88	3,97	0,31	0,16	0,18	0,20	3,13
-3-	8,07	4,89	3,91	4,89	78,24	17,85	4,09	0,33	0,20	0,16	0,20	3,20
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,04	4,43	3,95	5,09	78,57	17,56	4,06	0,33	0,18	0,16	0,21	3,19
SD	0,22	0,43	0,57	0,23	0,31	0,59	0,08	0,02	0,02	0,02	0,01	0,06
SE	0,13	0,25	0,33	0,13	0,18	0,34	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03
min	7,81	4,03	3,40	4,89	78,24	16,88	3,97	0,31	0,16	0,14	0,20	3,13
max	8,25	4,89	4,53	5,34	78,84	17,96	4,12	0,34	0,20	0,18	0,22	3,24

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A8 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von Chlorzoxazon (CZ) auf den Umsatz von 49 μM NNK

c (CZ) [μM]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle						
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	
0													
-1-	10,08	6,54	4,90	14,99	63,49	31,61	3,67	0,37	0,24	0,18	0,55	2,33	
-2-	10,92	6,44	4,76	14,29	63,59	31,65	3,57	0,39	0,23	0,17	0,51	2,27	
-3-	10,76	6,10	4,65	14,24	64,24	31,10	3,44	0,37	0,21	0,16	0,49	2,21	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	10,59	6,36	4,77	14,51	63,77	31,45	3,56	0,38	0,23	0,17	0,52	2,27	
SD	0,45	0,23	0,13	0,42	0,41	0,31	0,12	0,01	0,02	0,01	0,03	0,06	
SE	0,26	0,13	0,07	0,24	0,24	0,18	0,07	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	
min	10,08	6,10	4,65	14,24	63,49	31,10	3,44	0,37	0,21	0,16	0,49	2,21	
max	10,92	6,54	4,90	14,99	64,24	31,65	3,67	0,39	0,24	0,18	0,55	2,33	
1													
-1-	11,08	5,99	4,49	9,88	68,86	26,95	3,34	0,37	0,20	0,15	0,33	2,30	
-2-	12,22	6,75	4,50	10,29	66,24	29,26	3,11	0,38	0,21	0,14	0,32	2,06	
-3-	10,36	6,47	5,18	9,71	68,28	26,54	3,09	0,32	0,20	0,16	0,30	2,11	
n	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	11,22	6,40	4,72	9,96	67,80	27,58	3,18	0,36	0,20	0,15	0,32	2,16	
SD	0,94	0,39	0,39	0,30	1,38	1,47	0,14	0,03	0,01	0,01	0,02	0,13	
SE	0,54	0,22	0,23	0,17	0,80	0,85	0,08	0,02	0,00	0,01	0,01	0,07	
min	10,36	5,99	4,49	9,71	66,24	26,54	3,09	0,32	0,20	0,14	0,30	2,06	
max	12,22	6,75	5,18	10,29	68,86	29,26	3,34	0,38	0,21	0,16	0,33	2,30	
5													
-1-	11,04	4,29	5,52	8,28	71,17	23,61	3,26	0,36	0,14	0,18	0,27	2,32	
-2-	9,17	5,92	4,73	8,58	71,60	23,67	3,38	0,31	0,20	0,16	0,29	2,42	
-3-	10,21	5,41	4,80	8,11	71,47	23,73	3,33	0,34	0,18	0,16	0,27	2,38	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	10,14	5,21	5,02	8,32	71,41	23,67	3,32	0,34	0,17	0,17	0,28	2,37	
SD	0,94	0,83	0,44	0,24	0,22	0,06	0,06	0,03	0,03	0,01	0,01	0,05	
SE	0,54	0,48	0,25	0,14	0,13	0,03	0,03	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03	
min	9,17	4,29	4,73	8,11	71,17	23,61	3,26	0,31	0,14	0,16	0,27	2,32	
max	11,04	5,92	5,52	8,58	71,60	23,73	3,38	0,36	0,20	0,18	0,29	2,42	
10													
-1-	9,68	4,19	4,52	7,42	74,19	21,29	3,10	0,30	0,13	0,14	0,23	2,30	
-2-	9,88	5,09	5,09	10,18	70,06	25,15	3,34	0,33	0,17	0,17	0,34	2,34	
-3-	9,06	4,53	3,88	8,74	73,79	22,33	3,09	0,28	0,14	0,12	0,27	2,28	
n	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	9,54	4,60	4,50	8,78	72,68	22,92	3,32	0,30	0,15	0,14	0,28	2,31	
SD	0,43	0,45	0,60	1,38	2,28	2,00	0,06	0,03	0,02	0,03	0,06	0,03	
SE	0,25	0,26	0,35	0,80	1,32	1,15	0,03	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	
min	9,06	4,19	3,88	7,42	70,06	21,29	3,09	0,28	0,13	0,12	0,23	2,28	
max	9,88	5,09	5,09	10,18	74,19	25,15	3,34	0,33	0,17	0,17	0,34	2,34	
25													
-1-	10,49	4,59	5,25	7,54	72,46	22,62	3,05	0,32	0,14	0,16	0,23	2,21	
-2-	11,44	5,56	5,56	8,50	68,63	25,50	3,06	0,35	0,17	0,17	0,26	2,10	
-3-	11,11	4,90	4,90	7,84	71,24	23,85	3,06	0,34	0,15	0,15	0,24	2,18	
n	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	11,01	5,02	5,23	7,96	70,78	23,99	3,06	0,34	0,15	0,16	0,24	2,16	
SD	0,48	0,49	0,33	0,49	1,96	1,45	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,06	
SE	0,28	0,28	0,19	0,28	1,13	0,83	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	
min	10,49	4,59	4,90	7,54	68,63	22,62	3,05	0,32	0,14	0,15	0,23	2,10	
max	11,44	5,56	5,56	8,50	72,46	25,50	3,06	0,35	0,17	0,17	0,26	2,21	
50													
-1-	9,88	4,32	4,01	6,48	75,31	20,68	3,24	0,32	0,14	0,13	0,21	2,44	
-2-	9,20	4,60	5,52	7,06	73,62	20,86	3,26	0,30	0,15	0,18	0,23	2,40	
-3-	9,29	4,33	4,95	6,50	74,92	20,12	3,23	0,30	0,14	0,16	0,21	2,42	
n	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	9,46	4,42	4,83	6,68	74,62	20,55	3,24	0,31	0,14	0,16	0,22	2,42	
SD	0,37	0,16	0,76	0,33	0,89	0,39	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02	
SE	0,21	0,09	0,44	0,19	0,51	0,22	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	
min	9,20	4,32	4,01	6,48	73,62	20,12	3,23	0,30	0,14	0,18	0,21	2,40	
max	9,88	4,60	5,52	7,06	75,31	20,86	3,26	0,32	0,15	0,13	0,23	2,44	

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung

Tabelle A9 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von Troleandomycin (TAO) auf den Umsatz von 46 nM NNK

c (TAO) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle					
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
0												
-1-	4,42	7,27	2,86	12,47	72,73	24,16	3,85	0,17	0,28	0,11	0,48	2,80
-2-	4,12	6,64	3,66	10,53	75,29	21,29	4,37	0,18	0,29	0,16	0,46	3,29
-3-	6,31	9,97	3,99	15,95	63,79	20,27	3,01	0,19	0,30	0,12	0,48	1,92
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	4,95	7,96	3,50	12,98	70,60	21,91	3,74	0,18	0,29	0,13	0,47	2,67
SD	1,19	1,77	0,58	2,75	6,04	2,02	0,69	0,01	0,01	0,03	0,01	0,69
SE	0,69	1,02	0,34	1,59	3,49	1,16	0,40	0,01	0,01	0,02	0,01	0,40
min	4,12	6,64	2,86	10,53	63,79	20,27	3,01	0,17	0,28	0,11	0,46	1,92
max	6,31	9,97	3,99	15,95	75,29	24,16	4,37	0,19	0,30	0,16	0,48	3,29
1												
-1-	6,23	5,67	2,55	5,67	79,89	17,57	3,53	0,22	0,20	0,09	0,20	2,82
-2-	5,18	7,63	2,72	6,27	78,47	19,08	3,67	0,19	0,28	0,10	0,23	2,88
-3-	5,67	7,37	2,83	5,95	78,19	18,99	3,53	0,20	0,26	0,10	0,21	2,76
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,69	6,89	2,70	5,96	78,85	18,55	3,58	0,20	0,25	0,10	0,21	2,82
SD	0,53	1,07	0,14	0,30	0,91	0,85	0,08	0,02	0,04	0,01	0,02	0,06
SE	0,30	0,62	0,08	0,17	0,53	0,49	0,05	0,01	0,02	0,00	0,01	0,03
min	5,18	5,67	2,55	5,67	78,19	17,57	3,53	0,19	0,20	0,09	0,20	2,76
max	6,23	7,63	2,83	6,27	79,89	19,08	3,67	0,22	0,28	0,10	0,23	2,88
5												
-1-	4,64	7,10	2,73	6,83	78,69	18,57	3,66	0,17	0,26	0,10	0,25	2,88
-2-	5,04	6,44	3,36	7,00	78,15	18,48	3,57	0,18	0,23	0,12	0,25	2,79
-3-	5,52	6,63	3,04	7,18	77,62	19,33	3,62	0,20	0,24	0,11	0,26	2,81
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,07	6,73	3,04	7,01	78,15	18,79	3,62	0,18	0,24	0,11	0,25	2,83
SD	0,44	0,34	0,31	0,18	0,53	0,47	0,05	0,02	0,02	0,01	0,01	0,05
SE	0,25	0,20	0,18	0,10	0,31	0,27	0,03	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03
min	4,64	6,44	2,73	6,83	77,62	18,48	3,57	0,17	0,23	0,10	0,25	2,79
max	5,52	7,10	3,36	7,18	78,69	19,33	3,66	0,20	0,26	0,12	0,26	2,88
10												
-1-	6,91	4,97	3,04	6,91	78,18	18,79	3,62	0,25	0,18	0,11	0,25	2,83
-2-	6,69	5,29	3,34	7,24	77,16	19,22	3,59	0,24	0,19	0,12	0,26	2,77
-3-	6,67	5,56	3,33	6,94	77,50	19,17	3,60	0,24	0,20	0,12	0,25	2,79
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,75	5,27	3,24	7,03	77,61	19,06	3,60	0,24	0,19	0,12	0,25	2,80
SD	0,13	0,29	0,17	0,18	0,52	0,24	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03
SE	0,08	0,17	0,10	0,11	0,30	0,14	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02
min	6,67	4,97	3,04	6,91	77,16	18,79	3,59	0,24	0,18	0,11	0,25	2,77
max	6,91	5,56	3,34	7,24	78,18	19,22	3,62	0,25	0,20	0,12	0,26	2,83
25												
-1-	5,37	6,87	3,28	6,57	78,21	18,81	3,35	0,18	0,23	0,11	0,22	2,62
-2-	5,99	6,29	1,80	6,89	79,04	19,17	3,34	0,20	0,21	0,06	0,23	2,64
-3-	5,59	6,18	2,94	6,47	78,82	18,24	3,40	0,19	0,21	0,10	0,22	2,68
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,65	6,44	2,67	6,64	78,69	18,74	3,36	0,19	0,22	0,09	0,22	2,65
SD	0,31	0,37	0,78	0,22	0,43	0,47	0,03	0,01	0,01	0,03	0,01	0,03
SE	0,18	0,21	0,45	0,13	0,25	0,27	0,02	0,01	0,01	0,02	0,00	0,02
min	5,37	6,18	1,80	6,47	78,21	18,24	3,34	0,18	0,21	0,06	0,22	2,62
max	5,99	6,87	3,28	6,89	79,04	19,17	3,40	0,20	0,23	0,11	0,23	2,68
50												
-1-	5,07	7,16	1,79	5,37	80,30	17,60	3,35	0,17	0,24	0,06	0,18	2,69
-2-	5,69	5,69	1,50	6,29	80,54	17,67	3,34	0,19	0,19	0,05	0,21	2,69
-3-	5,41	6,61	1,80	6,31	79,88	18,33	3,33	0,18	0,22	0,06	0,21	2,66
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,39	6,49	1,70	5,99	80,24	17,87	3,34	0,18	0,22	0,06	0,20	2,68
SD	0,31	0,75	0,17	0,53	0,33	0,40	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02
SE	0,18	0,43	0,10	0,31	0,19	0,23	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01
min	5,07	5,69	1,50	5,37	79,88	17,60	3,33	0,17	0,19	0,05	0,18	2,66
max	5,69	7,16	1,08	6,31	80,54	18,33	3,35	0,19	0,24	0,06	0,21	2,69

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A10 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von Troleandomycin (TAO) auf den Umsatz von 49 µM NNK

c (TAO) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle						
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	
0													
-1-	7,32	7,62	4,57	12,80	67,38	27,74	3,28	0,24	0,25	0,15	0,42	2,21	
-2-	7,77	7,12	3,88	14,56	66,67	29,45	3,09	0,24	0,22	0,12	0,45	2,06	
-3-	7,94	7,62	4,44	13,02	66,98	28,58	3,15	0,25	0,24	0,14	0,41	2,11	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	7,67	7,45	4,30	13,46	67,01	28,59	3,17	0,24	0,24	0,14	0,43	2,13	
SD	0,32	0,29	0,37	0,96	0,36	0,86	0,10	0,01	0,02	0,02	0,02	0,08	
SE	0,18	0,17	0,21	0,55	0,21	0,49	0,06	0,00	0,01	0,01	0,01	0,04	
min	7,32	7,12	3,88	12,80	66,67	27,74	3,09	0,24	0,22	0,12	0,41	2,06	
max	7,94	7,62	4,57	14,56	67,38	29,45	3,28	0,25	0,25	0,15	0,45	2,21	
1													
-1-	7,60	6,00	3,20	9,20	74,80	22,80	2,50	0,19	0,15	0,08	0,23	1,87	
-2-	5,88	7,06	3,53	8,24	74,90	21,18	2,55	0,15	0,18	0,09	0,21	1,91	
-3-	7,14	5,56	3,97	8,33	75,00	21,03	2,52	0,18	0,14	0,10	0,21	1,89	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	6,88	6,20	3,57	8,59	74,90	21,67	2,52	0,17	0,16	0,09	0,22	1,89	
SD	0,89	0,77	0,39	0,53	0,10	0,98	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	
SE	0,51	0,45	0,22	0,31	0,06	0,57	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
min	5,88	5,56	3,20	8,24	74,80	21,03	2,50	0,15	0,14	0,08	0,21	1,87	
max	7,60	7,06	3,97	9,20	75,00	22,80	2,55	0,19	0,18	0,10	0,23	1,91	
5													
-1-	7,04	8,52	3,33	8,52	72,59	24,08	2,70	0,19	0,23	0,09	0,23	1,96	
-2-	6,83	7,19	4,32	7,91	73,38	21,93	2,78	0,19	0,20	0,12	0,22	2,04	
-3-	6,57	7,66	3,65	8,76	73,36	22,99	2,74	0,18	0,21	0,10	0,24	2,01	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	6,81	7,79	3,77	8,40	73,11	23,00	2,74	0,19	0,21	0,10	0,23	2,00	
SD	0,23	0,67	0,50	0,44	0,45	1,08	0,04	0,01	0,02	0,02	0,01	0,04	
SE	0,14	0,39	0,29	0,25	0,26	0,62	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	
min	6,57	7,19	3,33	7,91	72,59	21,93	2,70	0,18	0,20	0,09	0,22	1,96	
max	7,04	8,52	4,32	8,76	73,38	24,08	2,78	0,19	0,23	0,12	0,24	2,04	
10													
-1-	9,25	7,47	4,63	7,47	71,17	24,19	2,81	0,26	0,21	0,13	0,21	2,00	
-2-	8,27	8,27	3,24	6,83	73,38	23,37	2,78	0,23	0,23	0,09	0,19	2,04	
-3-	9,09	7,64	4,00	7,27	72,00	24,00	2,75	0,25	0,21	0,11	0,20	1,98	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	8,87	7,79	3,95	7,19	72,19	23,85	2,78	0,25	0,22	0,11	0,20	2,01	
SD	0,52	0,42	0,70	0,33	1,12	0,43	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	
SE	0,30	0,24	0,40	0,19	0,64	0,25	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	
min	8,27	7,47	3,24	6,83	71,17	23,37	2,75	0,23	0,21	0,09	0,19	1,98	
max	9,25	8,27	4,63	7,47	73,38	24,19	2,81	0,26	0,23	0,13	0,21	2,04	
25													
-1-	8,68	8,33	4,51	7,29	71,53	24,30	2,88	0,25	0,24	0,13	0,21	2,06	
-2-	8,73	8,00	3,64	6,55	73,09	23,28	2,75	0,24	0,22	0,10	0,18	2,01	
-3-	8,27	7,19	3,96	7,19	73,38	22,65	2,78	0,23	0,20	0,11	0,20	2,04	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	8,56	7,84	4,04	7,01	72,67	23,41	2,80	0,24	0,22	0,11	0,20	2,04	
SD	0,25	0,59	0,44	0,41	1,00	0,83	0,07	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	
SE	0,14	0,34	0,26	0,23	0,58	0,48	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
min	8,27	7,19	3,64	6,55	71,53	22,65	2,75	0,23	0,20	0,10	0,18	2,01	
max	8,73	8,33	4,51	7,29	73,38	24,30	2,88	0,25	0,24	0,13	0,21	2,06	
50													
-1-	8,42	7,33	3,66	7,33	73,63	23,08	2,73	0,23	0,20	0,10	0,20	2,01	
-2-	7,37	7,37	4,21	8,07	72,63	22,81	2,85	0,21	0,21	0,12	0,23	2,07	
-3-	7,72	6,62	2,94	7,72	75,00	22,06	2,72	0,21	0,18	0,08	0,21	2,04	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	7,84	7,10	3,60	7,71	73,75	22,65	2,77	0,22	0,20	0,10	0,21	2,04	
SD	0,54	0,42	0,64	0,37	1,19	0,53	0,07	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	
SE	0,31	0,24	0,37	0,21	0,69	0,31	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	
min	7,37	6,62	2,94	7,33	72,63	22,06	2,72	0,21	0,18	0,08	0,20	2,01	
max	8,42	7,37	4,21	8,07	75,00	23,08	2,85	0,23	0,21	0,12	0,23	2,07	

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A11 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung aller 4 Inhibitoren auf den Umsatz von 46 nM NNK

c (4 Inhibitoren) [μM]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle					
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
0												
-1-	6,57	6,57	3,28	11,11	72,73	24,25	3,96	0,26	0,26	0,13	0,44	2,88
-2-	5,43	8,27	3,10	9,82	73,39	23,52	3,87	0,21	0,32	0,12	0,38	2,84
-3-	6,38	7,14	3,06	10,46	72,96	23,98	3,92	0,25	0,28	0,12	0,41	2,86
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,12	7,33	3,15	10,46	73,02	23,92	3,92	0,24	0,29	0,12	0,41	2,86
SD	0,61	0,87	0,12	0,65	0,33	0,37	0,05	0,03	0,03	0,01	0,03	0,02
SE	0,35	0,50	0,07	0,37	0,19	0,21	0,03	0,02	0,02	0,00	0,02	0,01
min	5,43	6,57	3,06	9,82	72,73	23,52	3,87	0,21	0,26	0,12	0,38	2,84
max	6,57	8,27	3,28	11,11	73,39	24,25	3,96	0,26	0,32	0,13	0,44	2,88
1												
-1-	6,35	6,88	2,12	6,08	78,57	19,31	3,78	0,24	0,26	0,08	0,23	2,97
-2-	6,28	6,28	1,91	5,74	79,51	18,30	3,66	0,23	0,23	0,07	0,21	2,91
-3-	6,45	6,45	2,15	5,65	79,30	18,55	3,72	0,24	0,24	0,08	0,21	2,95
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,36	6,54	2,06	5,82	79,13	18,72	3,72	0,24	0,24	0,08	0,21	2,94
SD	0,08	0,31	0,13	0,23	0,49	0,53	0,06	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03
SE	0,05	0,18	0,07	0,13	0,28	0,30	0,03	0,00	0,01	0,00	0,01	0,02
min	6,28	6,28	1,91	5,65	78,57	18,30	3,66	0,23	0,23	0,07	0,21	2,91
max	6,45	6,88	2,15	6,08	79,51	19,31	3,78	0,24	0,26	0,08	0,23	2,97
5												
-1-	6,04	6,59	2,47	4,67	79,95	17,30	3,64	0,22	0,24	0,09	0,17	2,91
-2-	4,78	5,74	1,44	5,02	83,01	15,54	4,18	0,20	0,24	0,06	0,21	3,47
-3-	5,26	6,32	2,11	4,74	81,84	16,32	3,80	0,20	0,24	0,08	0,18	3,11
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	5,36	6,22	2,00	4,81	81,60	16,39	3,87	0,21	0,24	0,08	0,19	3,16
SD	0,64	0,43	0,53	0,19	1,55	0,88	0,28	0,01	0,00	0,02	0,02	0,28
SE	0,37	0,25	0,30	0,11	0,89	0,51	0,16	0,01	0,00	0,01	0,01	0,16
min	4,78	5,74	1,44	4,67	79,95	15,54	3,64	0,20	0,24	0,06	0,17	2,91
max	6,04	6,59	2,47	5,02	83,01	17,30	4,18	0,20	0,24	0,09	0,21	3,47
10												
-1-	7,20	6,65	1,94	3,32	80,89	17,17	3,61	0,26	0,24	0,07	0,12	2,92
-2-	5,46	5,74	2,19	4,37	82,24	15,57	3,66	0,20	0,21	0,08	0,16	3,01
-3-	6,58	5,75	2,19	3,84	81,64	16,17	3,65	0,24	0,21	0,08	0,14	2,98
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,41	6,05	2,11	3,84	81,59	16,30	3,64	0,23	0,22	0,08	0,14	2,97
SD	0,88	0,52	0,14	0,52	0,68	0,81	0,03	0,03	0,02	0,01	0,02	0,05
SE	0,51	0,30	0,08	0,30	0,39	0,47	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01	0,03
min	5,46	5,74	1,94	3,32	80,89	15,57	3,61	0,20	0,21	0,07	0,12	2,92
max	7,20	6,65	2,19	4,37	82,24	17,17	3,66	0,26	0,24	0,08	0,16	3,01
25												
-1-	8,05	5,75	2,01	3,45	80,75	17,25	3,48	0,28	0,20	0,07	0,12	2,81
-2-	6,84	6,27	1,42	4,56	80,63	17,67	3,51	0,24	0,22	0,05	0,16	2,83
-3-	7,41	5,98	1,71	3,99	80,91	17,38	3,51	0,26	0,21	0,06	0,14	2,84
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,43	6,00	1,72	4,00	80,76	17,43	3,50	0,26	0,21	0,06	0,14	2,83
SD	0,60	0,26	0,29	0,56	0,14	0,22	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02
SE	0,35	0,15	0,17	0,32	0,08	0,12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
min	6,84	5,75	1,42	3,45	80,63	17,25	3,48	0,24	0,20	0,05	0,12	2,81
max	8,05	6,27	2,01	4,56	80,91	17,67	3,51	0,28	0,22	0,07	0,16	2,84
50												
-1-	7,98	5,32	5,32	5,59	76,06	18,89	3,76	0,30	0,20	0,20	0,21	2,86
-2-	8,71	5,22	4,98	4,73	76,37	18,66	4,02	0,35	0,21	0,20	0,19	3,07
-3-	8,16	5,36	5,36	5,10	76,02	18,62	3,92	0,32	0,21	0,21	0,20	2,98
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,28	5,30	5,22	5,14	76,15	18,72	3,90	0,32	0,21	0,20	0,20	2,97
SD	0,38	0,07	0,21	0,43	0,19	0,15	0,13	0,03	0,01	0,01	0,01	0,11
SE	0,22	0,04	0,12	0,25	0,11	0,08	0,08	0,01	0,00	0,00	0,01	0,06
min	7,98	5,22	4,98	4,73	76,02	18,62	3,76	0,30	0,20	0,20	0,19	2,86
max	8,71	5,36	5,36	5,59	76,37	18,89	4,02	0,35	0,21	0,21	0,21	3,07

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A12 Lebermikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung aller 4 Inhibitoren auf den Umsatz von 49 μM NNK

c (4 Inhibitoren) [μM]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle						
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	
0													
-1-	6,32	8,05	4,31	13,22	68,10	27,59	3,48	0,22	0,28	0,15	0,46	2,37	
-2-	6,87	7,16	4,48	16,42	65,07	30,45	3,35	0,23	0,24	0,15	0,55	2,18	
-3-	6,61	7,51	4,20	15,02	66,67	29,14	3,33	0,22	0,25	0,14	0,50	2,22	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	6,60	7,57	4,33	14,88	66,61	29,06	3,39	0,22	0,26	0,15	0,50	2,26	
SD	0,27	0,44	0,14	1,60	1,52	1,43	0,08	0,01	0,02	0,01	0,05	0,10	
SE	0,16	0,26	0,08	0,93	0,87	0,83	0,05	0,00	0,01	0,00	0,03	0,06	
min	6,32	7,16	4,20	13,22	65,07	27,59	3,33	0,22	0,24	0,14	0,46	2,18	
max	6,87	8,05	4,48	16,42	68,10	30,45	3,48	0,23	0,28	0,15	0,55	2,37	
1													
-1-	8,06	8,06	2,69	8,96	72,24	25,08	3,35	0,27	0,27	0,09	0,30	2,42	
-2-	7,85	7,85	3,63	8,16	72,51	23,86	3,31	0,26	0,26	0,12	0,27	2,40	
-3-	7,93	7,32	3,05	8,54	73,17	23,79	3,28	0,26	0,24	0,10	0,28	2,40	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	7,95	7,74	3,12	8,55	72,64	24,24	3,31	0,26	0,26	0,10	0,28	2,41	
SD	0,10	0,38	0,47	0,40	0,48	0,73	0,04	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	
SE	0,06	0,22	0,27	0,23	0,28	0,42	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	
min	7,85	7,32	2,69	8,16	72,24	23,79	3,28	0,26	0,24	0,09	0,27	2,40	
max	8,06	8,06	3,63	8,96	73,17	25,08	3,35	0,27	0,27	0,12	0,30	2,42	
5													
-1-	8,08	5,05	4,04	7,07	75,76	20,20	2,97	0,24	0,15	0,12	0,21	2,25	
-2-	9,30	6,98	3,65	5,98	74,09	22,26	3,01	0,28	0,21	0,11	0,18	2,23	
-3-	8,61	5,96	3,31	6,62	75,50	21,19	3,02	0,26	0,18	0,10	0,20	2,28	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	8,66	6,00	3,67	6,56	75,11	21,22	3,00	0,26	0,18	0,11	0,20	2,25	
SD	0,61	0,96	0,36	0,55	0,90	1,03	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	
SE	0,35	0,56	0,21	0,32	0,52	0,59	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	
min	8,08	5,05	3,31	5,98	74,09	20,20	2,97	0,24	0,15	0,10	0,18	2,23	
max	9,30	6,98	4,04	7,07	75,76	22,26	3,02	0,28	0,21	0,12	0,21	2,28	
10													
-1-	8,97	4,32	4,32	6,98	75,42	20,27	3,01	0,27	0,13	0,13	0,21	2,27	
-2-	9,15	5,49	3,05	5,79	76,83	20,43	3,28	0,30	0,18	0,10	0,19	2,52	
-3-	9,24	4,78	3,50	6,69	75,80	20,71	3,14	0,29	0,15	0,11	0,21	2,38	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	9,12	4,86	3,62	6,49	76,01	20,47	3,14	0,29	0,15	0,11	0,20	2,39	
SD	0,14	0,59	0,64	0,62	0,73	0,22	0,14	0,02	0,03	0,02	0,01	0,13	
SE	0,08	0,34	0,37	0,36	0,42	0,13	0,08	0,01	0,01	0,01	0,01	0,07	
min	8,97	4,32	3,05	5,79	75,42	20,27	3,01	0,27	0,13	0,10	0,19	2,27	
max	9,24	5,49	4,32	6,98	76,83	20,71	3,28	0,30	0,18	0,13	0,21	2,52	
25													
-1-	6,83	7,19	0,00	3,60	82,37	17,62	2,78	0,19	0,20	0,00	0,10	2,29	
-2-	7,00	7,33	0,00	4,00	81,67	18,33	3,00	0,21	0,22	0,00	0,12	2,45	
-3-	6,90	7,24	0,00	3,79	82,07	17,93	2,90	0,20	0,21	0,00	0,11	2,38	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	6,91	7,26	0,00	3,80	82,04	17,96	2,89	0,20	0,21	0,00	0,11	2,37	
SD	0,08	0,07	0,00	0,20	0,35	0,36	0,11	0,01	0,01	0,00	0,01	0,08	
SE	0,05	0,04	0,00	0,12	0,20	0,21	0,06	0,01	0,01	0,00	0,01	0,05	
min	6,83	7,19	0,00	3,60	81,67	17,62	2,78	0,19	0,20	0,00	0,10	2,29	
max	7,00	7,33	0,00	4,00	82,37	18,33	3,00	0,21	0,22	0,00	0,12	2,45	
50													
-1-	8,45	7,75	0,00	0,00	83,80	16,20	2,84	0,24	0,22	0,00	0,00	2,38	
-2-	9,96	8,12	0,00	0,00	81,92	18,08	2,71	0,27	0,22	0,00	0,00	2,22	
-3-	9,35	7,19	0,00	0,00	83,45	16,54	2,78	0,26	0,20	0,00	0,00	2,32	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
mean	9,26	7,69	0,00	0,00	83,06	16,94	2,78	0,26	0,21	0,00	0,00	2,31	
SD	0,76	0,46	0,00	0,00	1,00	1,00	0,07	0,02	0,01	0,00	0,00	0,08	
SE	0,44	0,27	0,00	0,00	0,58	0,58	0,04	0,01	0,01	0,00	0,00	0,05	
min	8,45	7,19	0,00	0,00	81,92	16,20	2,71	0,24	0,20	0,00	0,00	2,22	
max	9,96	8,12	0,00	0,00	83,80	18,08	2,84	0,27	0,22	0,00	0,00	2,38	

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung

Tabelle A13 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von α -Naphthoflavin (NF) auf den Umsatz von 46 nM NNK

c (NF) [μ M]	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
0										
-1-	10,40	6,00	3,60	80,00	16,40	2,50	0,26	0,15	0,09	2,00
-2-	10,56	5,99	3,87	79,58	16,55	2,84	0,30	0,17	0,11	2,26
-3-	10,53	6,02	3,76	79,70	16,55	2,66	0,28	0,16	0,10	2,12
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,50	6,00	3,74	79,76	16,50	2,67	0,28	0,16	0,10	2,13
SD	0,09	0,01	0,14	0,22	0,09	0,17	0,02	0,01	0,01	0,13
SE	0,05	0,01	0,08	0,13	0,05	0,10	0,01	0,01	0,01	0,08
min	10,40	5,99	3,60	79,58	16,40	2,50	0,26	0,15	0,09	2,00
max	10,56	6,02	3,87	80,00	16,55	2,84	0,30	0,17	0,11	2,26
1										
-1-	11,86	6,72	3,16	78,66	18,58	2,53	0,30	0,17	0,08	1,99
-2-	11,96	3,99	2,90	81,16	15,95	2,76	0,33	0,11	0,08	2,24
-3-	11,54	5,38	3,08	80,00	16,92	2,60	0,30	0,14	0,08	2,08
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	11,78	5,36	3,05	79,94	17,15	2,63	0,31	0,14	0,08	2,10
SD	0,22	1,37	0,13	1,25	1,33	0,12	0,02	0,03	0,00	0,13
SE	0,13	0,79	0,08	0,72	0,77	0,07	0,01	0,02	0,00	0,07
min	11,54	3,99	2,90	78,66	15,95	2,53	0,30	0,11	0,08	1,99
max	11,96	6,72	3,16	81,16	18,58	2,76	0,33	0,17	0,08	2,24
5										
-1-	12,50	4,84	3,63	79,44	17,34	2,48	0,31	0,12	0,09	1,97
-2-	11,81	5,12	2,36	81,10	16,93	2,54	0,30	0,13	0,06	2,06
-3-	12,99	4,72	3,15	79,13	17,71	2,54	0,33	0,12	0,08	2,01
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	12,43	4,89	3,05	79,89	17,33	2,52	0,31	0,12	0,08	2,01
SD	0,59	0,20	0,64	1,06	0,39	0,03	0,02	0,01	0,02	0,05
SE	0,34	0,12	0,37	0,61	0,23	0,02	0,01	0,00	0,01	0,03
min	11,81	4,72	2,36	79,13	16,93	2,48	0,30	0,12	0,06	1,97
max	12,99	5,12	3,63	81,10	17,71	2,54	0,33	0,13	0,09	2,06
10										
-1-	11,24	4,42	3,61	80,72	15,66	2,49	0,28	0,11	0,09	2,01
-2-	14,78	5,65	3,04	85,56	20,43	2,30	0,34	0,13	0,07	1,97
-3-	11,81	4,72	3,15	80,31	16,53	2,54	0,30	0,12	0,08	2,04
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	12,61	4,93	3,27	82,23	17,54	2,44	0,31	0,12	0,08	2,01
SD	1,90	0,64	0,30	2,97	2,54	0,13	0,03	0,01	0,01	0,04
SE	1,10	0,37	0,18	1,72	1,47	0,07	0,02	0,01	0,01	0,02
min	11,24	4,42	3,04	80,31	15,66	2,30	0,28	0,11	0,07	1,97
max	14,78	5,65	3,61	85,65	20,43	2,54	0,34	0,13	0,09	2,04
25										
-1-	11,62	5,81	3,32	79,25	17,43	2,41	0,28	0,14	0,08	1,91
-2-	11,98	5,37	3,31	79,75	17,35	2,42	0,29	0,13	0,08	1,93
-3-	11,57	5,79	3,72	78,93	17,36	2,42	0,28	0,14	0,09	1,91
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	11,72	5,66	3,45	79,31	17,38	2,42	0,28	0,14	0,08	1,92
SD	0,23	0,25	0,23	0,42	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
SE	0,13	0,14	0,14	0,24	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
min	11,57	5,37	3,31	78,93	17,35	2,41	0,28	0,13	0,08	1,91
max	11,98	5,81	3,72	79,75	17,43	2,42	0,29	0,14	0,09	1,93
50										
-1-	11,43	4,90	4,08	79,59	16,33	2,45	0,28	0,12	0,10	1,95
-2-	12,20	4,88	3,25	79,67	17,08	2,46	0,30	0,12	0,08	1,96
-3-	12,35	4,78	3,98	78,88	17,13	2,51	0,31	0,12	0,10	1,98
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	11,99	4,85	3,77	79,38	16,85	2,47	0,30	0,12	0,09	1,96
SD	0,49	0,06	0,45	0,43	0,45	0,03	0,02	0,00	0,01	0,02
SE	0,28	0,04	0,26	0,25	0,26	0,02	0,01	0,00	0,01	0,01
min	11,43	4,78	3,25	78,88	16,33	2,45	0,28	0,12	0,08	1,95
max	12,35	4,90	4,08	79,67	17,13	2,51	0,31	0,12	0,10	1,98

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung

Tabelle A14 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von α -Naphthoflavon (NF) auf den Umsatz von 49 μ M NNK

c (NF) [μ M]	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
0										
-1-	10,64	12,23	5,32	71,81	22,87	1,88	0,20	0,23	0,10	1,35
-2-	10,90	11,37	6,64	71,09	22,27	2,11	0,23	0,24	0,14	1,50
-3-	10,24	11,71	5,85	72,20	21,95	2,05	0,21	0,24	0,12	1,48
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,59	11,77	5,94	71,70	22,36	2,01	0,21	0,24	0,12	1,44
SD	0,33	0,43	0,66	0,56	0,47	0,12	0,02	0,01	0,02	0,08
SE	0,19	0,25	0,38	0,32	0,27	0,07	0,01	0,00	0,01	0,05
min	10,24	11,37	5,32	71,09	21,95	1,88	0,20	0,23	0,10	1,35
max	10,90	12,23	6,64	72,20	22,87	2,11	0,23	0,24	0,14	1,50
1										
-1-	15,24	6,67	3,81	74,76	21,91	2,10	0,32	0,14	0,08	1,57
-2-	13,51	5,86	4,50	76,13	19,37	2,22	0,30	0,13	0,10	1,69
-3-	13,88	5,74	3,83	76,56	19,62	2,09	0,29	0,12	0,08	1,60
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	14,21	6,09	4,05	75,81	20,30	2,14	0,30	0,13	0,09	1,62
SD	0,91	0,50	0,40	0,94	1,40	0,07	0,02	0,01	0,01	0,06
SE	0,53	0,29	0,23	0,54	0,81	0,04	0,01	0,01	0,01	0,04
min	13,51	5,74	3,81	74,76	19,37	2,09	0,29	0,12	0,08	1,57
max	15,24	6,67	4,50	76,56	21,91	2,22	0,32	0,14	0,10	1,69
5										
-1-	13,81	6,19	3,81	76,19	20,00	2,10	0,29	0,13	0,08	1,60
-2-	13,81	6,67	5,24	74,29	20,48	2,10	0,29	0,14	0,11	1,56
-3-	14,15	6,60	4,72	74,53	20,75	2,12	0,30	0,14	0,10	1,58
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	13,92	6,49	4,59	75,00	20,41	2,11	0,29	0,14	0,10	1,58
SD	0,20	0,26	0,72	1,04	0,38	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
SE	0,11	0,15	0,42	0,60	0,22	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01
min	13,81	6,19	3,81	74,29	20,00	2,10	0,29	0,13	0,08	1,56
max	14,15	6,67	5,24	76,19	20,75	2,12	0,30	0,14	0,11	1,60
10										
-1-	14,54	4,85	4,41	76,21	19,39	2,27	0,33	0,11	0,10	1,73
-2-	11,74	7,04	6,57	74,65	18,78	2,13	0,25	0,15	0,14	1,59
-3-	12,96	6,48	4,63	75,93	19,44	2,16	0,28	0,14	0,10	1,64
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	13,08	6,12	5,20	75,60	19,20	2,19	0,29	0,13	0,11	1,65
SD	1,40	1,14	1,19	0,83	0,37	0,07	0,04	0,02	0,02	0,07
SE	0,81	0,66	0,69	0,48	0,21	0,04	0,02	0,01	0,01	0,04
min	11,74	4,85	4,41	74,65	18,78	2,13	0,25	0,11	0,10	1,59
max	14,54	7,04	6,57	76,21	19,44	2,27	0,33	0,15	0,14	1,73
25										
-1-	13,82	5,53	5,07	75,58	19,35	2,17	0,30	0,12	0,11	1,64
-2-	14,49	6,28	5,31	74,40	20,77	2,07	0,30	0,13	0,09	1,54
-3-	13,46	6,25	4,33	75,96	19,71	2,08	0,28	0,13	0,09	1,58
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	13,93	6,02	4,90	75,31	19,94	2,11	0,29	0,13	0,10	1,59
SD	0,52	0,42	0,51	0,82	0,74	0,06	0,01	0,01	0,01	0,05
SE	0,30	0,25	0,30	0,47	0,43	0,03	0,01	0,00	0,01	0,03
min	13,46	5,53	4,33	74,40	19,35	2,07	0,28	0,12	0,09	1,54
max	14,49	6,28	5,31	75,96	20,77	2,17	0,30	0,13	0,11	1,64
50										
-1-	14,71	5,39	4,41	75,49	20,10	2,04	0,30	0,11	0,09	1,54
-2-	13,15	6,10	4,69	76,06	19,25	2,13	0,28	0,13	0,10	1,62
-3-	14,35	5,74	4,31	75,60	20,09	2,09	0,30	0,12	0,09	1,58
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	14,07	5,75	4,47	75,71	19,81	2,09	0,29	0,12	0,09	1,58
SD	0,82	0,36	0,20	0,30	0,49	0,05	0,01	0,01	0,01	0,04
SE	0,47	0,21	0,12	0,17	0,28	0,03	0,01	0,01	0,00	0,02
min	13,15	5,39	4,31	75,49	19,25	2,04	0,28	0,11	0,09	1,54
max	14,71	6,10	4,69	76,06	20,10	2,13	0,30	0,13	0,10	1,62

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung

Tabelle A15 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von 8-Methoxypsoralen (MOP) auf den Umsatz von 46 nM NNK

c (MOP) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
0										
-1-	9,24	8,03	2,01	80,72	17,27	2,49	0,23	0,20	0,05	2,01
-2-	7,94	7,94	2,78	81,35	15,88	2,52	0,20	0,20	0,07	2,05
-3-	8,37	7,97	2,79	80,88	16,34	2,51	0,21	0,20	0,07	2,03
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,51	7,98	2,52	80,98	16,50	2,51	0,21	0,20	0,06	2,03
SD	0,66	0,05	0,45	0,33	0,71	0,02	0,02	0,00	0,01	0,02
SE	0,38	0,03	0,26	0,19	0,41	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01
min	7,94	7,94	2,01	80,72	15,88	2,49	0,20	0,00	0,05	2,01
max	9,24	8,03	2,79	81,35	17,27	2,52	0,23	0,20	0,07	2,05
1										
-1-	8,88	6,56	3,09	81,85	15,44	2,59	0,23	0,17	0,08	2,12
-2-	8,8	6,90	4,60	79,31	15,71	2,61	0,23	0,18	0,12	2,07
-3-	8,05	6,90	3,83	81,23	14,95	2,61	0,21	0,18	0,10	2,12
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,58	6,79	3,84	80,80	15,37	2,60	0,22	0,18	0,10	2,10
SD	0,46	0,19	0,75	1,32	0,39	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03
SE	0,27	0,11	0,44	0,76	0,22	0,01	0,01	0,00	0,01	0,02
min	8,05	6,56	3,09	79,31	14,95	2,59	0,21	0,17	0,08	2,07
max	8,88	6,90	4,60	81,85	15,71	2,61	0,23	0,18	0,12	2,12
5										
-1-	6,83	6,83	5,40	80,94	13,66	2,78	0,19	0,19	0,15	2,25
-2-	9,82	4,36	5,09	80,73	14,18	2,75	0,27	0,12	0,14	2,22
-3-	8,21	5,71	6,07	80,00	13,92	2,80	0,23	0,16	0,17	2,24
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,29	5,64	5,52	80,55	13,92	2,78	0,23	0,16	0,15	2,24
SD	1,49	1,24	0,50	0,49	0,26	0,03	0,04	0,04	0,02	0,02
SE	0,86	0,71	0,29	0,28	0,15	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
min	6,83	4,36	5,09	80,00	13,66	2,75	0,19	0,12	0,14	2,22
max	9,82	6,83	6,07	80,94	14,18	2,80	0,27	0,19	0,17	2,25
10										
-1-	9,12	6,57	2,55	81,39	15,69	2,74	0,25	0,18	0,07	2,23
-2-	7,75	6,64	2,95	82,66	14,39	2,71	0,21	0,18	0,08	2,22
-3-	8,49	6,64	2,95	81,92	15,13	2,71	0,23	0,18	0,08	2,24
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,45	6,62	2,82	81,99	15,07	2,72	0,23	0,18	0,08	2,23
SD	0,69	0,04	0,23	0,64	0,65	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01
SE	0,40	0,02	0,13	0,37	0,38	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
min	7,75	6,57	2,55	81,39	14,39	2,71	0,21	0,18	0,07	2,22
max	9,12	6,64	2,95	82,66	15,69	2,74	0,25	0,18	0,08	2,24
25										
-1-	8,05	7,28	3,07	81,23	15,33	2,61	0,21	0,19	0,08	2,12
-2-	8,07	5,26	2,81	83,86	13,33	2,85	0,23	0,15	0,08	2,39
-3-	8,46	6,25	2,57	82,72	14,71	2,72	0,23	0,17	0,07	2,25
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,19	6,26	2,82	82,60	14,46	2,73	0,22	0,17	0,08	2,25
SD	0,23	1,01	0,25	1,32	1,02	0,12	0,01	0,02	0,01	0,14
SE	0,13	0,58	0,14	0,76	0,59	0,07	0,01	0,01	0,00	0,08
min	8,05	5,26	2,57	81,23	13,33	2,61	0,21	0,15	0,07	2,12
max	8,46	7,28	3,07	83,86	15,33	2,85	0,23	0,19	0,08	2,39
50										
-1-	7,41	6,67	3,33	82,59	14,08	2,70	0,20	0,18	0,09	2,23
-2-	8,27	7,52	3,76	80,45	15,79	2,66	0,22	0,20	0,10	2,14
-3-	7,84	6,72	3,36	82,09	14,56	2,68	0,21	0,18	0,09	2,20
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,84	6,97	3,48	81,71	14,81	2,68	0,21	0,19	0,09	2,19
SD	0,43	0,48	0,24	1,12	0,88	0,02	0,01	0,01	0,01	0,05
SE	0,25	0,28	0,14	0,65	0,51	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03
min	7,41	6,67	3,33	80,45	14,08	2,66	0,20	0,18	0,09	2,14
max	8,27	7,52	3,76	82,59	15,79	2,70	0,22	0,20	0,10	2,23

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A16 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von 8-Methoxypsoralen (MOP) auf den Umsatz von 49 µM NNK

c (MOP) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
0										
-1-	10,27	9,82	3,57	76,34	20,09	2,24	0,23	0,22	0,08	1,71
-2-	10,62	9,73	3,54	75,66	20,35	2,24	0,24	0,22	0,08	1,71
-3-	10,18	9,29	3,98	76,55	19,47	2,26	0,23	0,21	0,09	1,73
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,35	9,62	3,70	76,18	19,97	2,25	0,23	0,22	0,08	1,72
SD	0,23	0,28	0,25	0,46	0,45	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
SE	0,13	0,16	0,14	0,27	0,26	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
min	10,18	9,29	3,54	75,66	19,47	2,24	0,23	0,21	0,08	1,71
max	10,62	9,82	3,98	76,55	20,35	2,26	0,24	0,22	0,09	1,73
1										
-1-	8,06	8,06	4,44	79,84	16,12	2,48	0,20	0,20	0,11	1,98
-2-	9,09	10,33	4,13	76,45	19,42	2,42	0,21	0,25	0,10	1,85
-3-	8,61	9,02	4,10	78,28	17,63	2,44	0,22	0,22	0,10	1,91
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,59	9,14	4,22	78,19	17,72	2,45	0,21	0,22	0,10	1,91
SD	0,51	1,14	0,19	1,70	1,65	0,03	0,01	0,03	0,01	0,07
SE	0,30	0,66	0,11	0,98	0,95	0,02	0,01	0,01	0,00	0,04
min	8,06	8,06	4,10	76,45	16,12	2,42	0,20	0,20	0,10	1,85
max	7,60	7,06	3,97	75,00	22,80	2,48	0,22	0,25	0,11	1,98
5										
-1-	11,30	8,37	3,77	76,99	19,67	2,39	0,27	0,20	0,09	1,84
-2-	10,04	9,61	2,18	78,17	19,65	2,29	0,23	0,22	0,05	1,79
-3-	10,68	8,55	3,42	77,35	19,23	2,34	0,25	0,20	0,08	1,81
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,67	8,84	3,12	77,50	19,52	2,34	0,25	0,21	0,07	1,81
SD	0,63	0,67	0,83	0,60	0,25	0,05	0,02	0,01	0,02	0,03
SE	0,36	0,39	0,48	0,35	0,14	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
min	10,04	8,37	2,18	76,99	19,23	2,29	0,23	0,20	0,05	1,79
max	11,30	9,61	3,77	78,17	19,67	2,39	0,27	0,22	0,09	1,84
10										
-1-	10,04	8,79	6,28	74,90	18,83	2,39	0,24	0,21	0,15	1,79
-2-	8,86	8,02	2,53	80,17	16,88	2,37	0,21	0,19	0,06	1,90
-3-	9,32	8,47	4,24	77,97	17,79	2,36	0,22	0,20	0,10	1,84
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	9,41	8,43	4,35	77,68	17,83	2,37	0,22	0,20	0,10	1,84
SD	0,60	0,39	1,87	2,65	0,98	0,02	0,02	0,01	0,05	0,06
SE	0,34	0,22	1,08	1,53	0,56	0,01	0,01	0,01	0,03	0,03
min	8,86	8,02	2,53	74,90	16,88	2,36	0,21	0,19	0,06	1,79
max	10,04	8,79	6,28	80,17	18,83	2,39	0,24	0,21	0,15	1,90
25										
-1-	9,61	7,86	6,11	76,42	17,47	2,29	0,20	0,18	0,14	1,75
-2-	10,64	6,81	4,26	78,72	17,45	2,35	0,25	0,16	0,10	1,85
-3-	10,00	7,83	4,35	77,83	17,83	2,30	0,23	0,18	0,10	1,79
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,08	7,50	4,91	77,66	17,58	2,31	0,23	0,17	0,11	1,80
SD	0,52	0,60	1,05	1,16	0,21	0,03	0,02	0,01	0,02	0,05
SE	0,30	0,35	0,60	0,67	0,12	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03
min	9,61	6,81	4,26	76,42	17,45	2,29	0,20	0,16	0,10	1,75
max	10,64	7,86	6,11	78,72	17,83	2,35	0,25	0,18	0,14	1,85
50										
-1-	10,55	8,44	4,22	76,79	18,99	2,37	0,25	0,20	0,10	1,82
-2-	11,30	8,26	3,48	76,96	19,56	2,30	0,26	0,19	0,08	1,77
-3-	11,21	7,76	3,88	77,16	18,97	2,32	0,26	0,18	0,09	1,79
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	11,02	8,15	3,86	76,97	19,17	2,33	0,26	0,19	0,09	1,79
SD	0,41	0,35	0,37	0,18	0,34	0,04	0,01	0,01	0,01	0,03
SE	0,24	0,20	0,21	0,10	0,19	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01
min	10,55	7,76	3,48	76,79	18,97	2,30	0,25	0,18	0,08	1,77
max	11,30	8,44	4,22	77,16	19,56	2,37	0,26	0,20	0,10	1,82

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A17 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von Chlorzoxazon (CZ) auf den Umsatz von 46 nM NNK

c (CZ) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
0										
-1-	6,90	7,66	2,68	82,76	14,56	2,61	0,18	0,20	0,07	2,16
-2-	5,56	6,35	2,38	85,71	11,91	2,52	0,14	0,16	0,06	2,16
-3-	7,12	7,49	3,00	82,40	14,61	2,67	0,19	0,20	0,08	2,20
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,52	7,17	2,69	83,62	13,69	2,60	0,17	0,19	0,07	2,17
SD	0,84	0,71	0,31	1,82	1,54	0,08	0,03	0,02	0,01	0,02
SE	0,49	0,41	0,18	1,05	0,89	0,04	0,02	0,01	0,01	0,01
min	5,56	6,35	2,38	82,40	11,91	2,52	0,14	0,16	0,06	2,16
max	7,12	7,66	3,00	85,71	14,61	2,67	0,19	0,20	0,08	2,20
1										
-1-	4,94	8,37	3,04	83,65	13,31	2,63	0,13	0,22	0,08	2,20
-2-	4,71	6,52	2,54	86,23	11,23	2,76	0,13	0,18	0,07	2,38
-3-	5,20	7,81	2,97	84,01	13,01	2,69	0,14	0,21	0,08	2,26
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	4,95	7,56	2,85	84,63	12,52	2,69	0,13	0,20	0,08	2,28
SD	0,25	0,95	0,27	1,40	1,12	0,07	0,01	0,02	0,01	0,09
SE	0,14	0,55	0,16	0,81	0,65	0,04	0,00	0,01	0,00	0,05
min	4,71	6,52	2,54	83,65	11,23	2,63	0,13	0,18	0,07	2,20
max	5,20	8,37	3,04	86,23	13,31	2,76	0,14	0,21	0,08	2,38
5										
-1-	7,35	8,16	2,04	82,45	15,51	2,45	0,18	0,20	0,05	2,02
-2-	6,20	6,59	2,33	84,88	12,79	2,58	0,16	0,17	0,06	2,19
-3-	6,72	7,11	2,37	83,79	13,83	2,53	0,17	0,18	0,06	2,12
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,76	7,29	2,25	83,71	14,04	2,52	0,17	0,18	0,06	2,11
SD	0,57	0,80	0,18	1,22	1,37	0,07	0,01	0,02	0,01	0,09
SE	0,33	0,46	0,10	0,70	0,79	0,04	0,01	0,01	0,00	0,05
min	6,20	6,59	2,04	82,45	12,79	2,45	0,16	0,17	0,05	2,02
max	7,35	8,16	2,37	84,88	15,51	2,58	0,18	0,20	0,06	2,19
10										
-1-	6,30	6,67	2,96	84,07	12,97	2,70	0,17	0,18	0,08	2,27
-2-	7,60	7,22	1,90	82,89	14,82	2,63	0,20	0,19	0,05	2,18
-3-	6,82	7,58	2,27	83,33	14,40	2,64	0,18	0,20	0,06	2,20
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,91	7,16	2,38	83,43	14,06	2,66	0,18	0,19	0,06	2,22
SD	0,66	0,46	0,54	0,60	0,97	0,04	0,02	0,01	0,02	0,05
SE	0,38	0,26	0,31	0,35	0,56	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03
min	6,30	6,67	1,90	82,89	12,97	2,63	0,17	0,18	0,05	2,18
max	7,60	7,58	2,96	84,07	14,82	2,70	0,20	0,20	0,08	2,27
25										
-1-	6,54	8,85	0,00	84,23	15,39	2,60	0,17	0,23	0,00	2,19
-2-	6,23	8,17	0,00	85,60	14,40	2,57	0,16	0,21	0,00	2,20
-3-	6,27	8,24	0,00	85,49	14,51	2,55	0,16	0,21	0,00	2,18
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,35	8,42	0,00	85,11	14,77	2,57	0,16	0,22	0,00	2,19
SD	0,17	0,37	0,00	0,76	0,54	0,03	0,01	0,01	0,00	0,01
SE	0,10	0,22	0,00	0,44	0,31	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
min	6,23	8,17	0,00	84,23	14,40	2,55	0,16	0,21	0,00	2,18
max	6,54	8,85	0,00	85,60	15,39	2,60	0,17	0,23	0,00	2,20
50										
-1-	5,68	6,44	0,00	88,26	12,12	2,64	0,15	0,17	0,00	2,33
-2-	6,61	7,78	0,00	85,60	14,39	2,57	0,17	0,20	0,00	2,20
-3-	6,90	6,90	0,00	86,21	13,80	2,61	0,18	0,18	0,00	2,25
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,40	7,04	0,00	86,69	13,44	2,61	0,17	0,18	0,00	2,26
SD	0,64	0,68	0,00	1,39	1,18	0,04	0,02	0,02	0,00	0,07
SE	0,37	0,39	0,00	0,80	0,68	0,02	0,01	0,01	0,00	0,04
min	5,68	6,44	0,00	85,60	12,12	2,57	0,15	0,17	0,00	2,20
max	6,90	7,78	0,00	88,26	14,39	2,64	0,18	0,20	0,00	2,33

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A18 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von Chlorzoxazon (CZ) auf den Umsatz von 49 μM NNK

c (CZ) [μM]	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
0										
-1-	9,73	8,85	3,54	77,88	18,58	2,26	0,22	0,20	0,08	1,76
-2-	8,33	8,77	3,07	79,82	17,10	2,28	0,19	0,22	0,07	1,82
-3-	10,04	9,61	3,93	76,42	19,65	2,29	0,23	0,22	0,09	1,75
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	9,37	9,08	3,51	78,04	19,29	2,28	0,21	0,21	0,08	1,78
SD	0,91	0,46	0,43	1,71	1,28	0,02	0,02	0,01	0,01	0,04
SE	0,53	0,27	0,25	0,99	0,74	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
min	8,33	8,77	3,07	76,42	17,10	2,26	0,19	0,20	0,07	1,75
max	10,04	9,61	3,93	79,82	19,65	2,29	0,23	0,22	0,09	1,82
1										
-1-	8,26	8,70	0,00	83,48	16,96	2,30	0,19	0,20	0,00	1,92
-2-	8,17	8,65	0,00	83,17	16,82	2,08	0,17	0,18	0,00	1,73
-3-	7,73	8,58	2,58	81,12	16,31	2,33	0,18	0,20	0,06	1,89
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,05	8,64	0,86	82,59	16,70	2,24	0,18	0,19	0,02	1,85
SD	0,29	0,06	1,49	1,28	0,34	0,14	0,01	0,01	0,03	0,10
SE	0,17	0,03	0,86	0,74	0,20	0,08	0,01	0,01	0,02	0,06
min	7,73	8,58	0,00	81,12	16,31	2,08	0,17	0,18	0,00	1,73
max	8,26	8,70	2,58	83,48	16,96	2,33	0,19	0,20	0,06	1,92
5										
-1-	7,01	9,81	3,27	79,91	16,82	2,14	0,15	0,21	0,07	1,71
-2-	7,63	9,32	3,39	79,66	16,95	2,36	0,18	0,22	0,08	1,88
-3-	7,27	9,09	3,18	80,45	16,36	2,20	0,16	0,20	0,07	1,77
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,30	9,41	3,28	80,01	16,71	2,23	0,16	0,21	0,07	1,79
SD	0,31	0,37	0,10	0,41	0,31	0,11	0,02	0,01	0,01	0,09
SE	0,18	0,21	0,06	0,23	0,18	0,07	0,01	0,01	0,00	0,05
min	7,01	9,09	3,18	79,66	16,36	2,14	0,15	0,20	0,07	1,71
max	7,63	9,81	3,39	80,45	16,95	2,36	0,18	0,22	0,08	1,88
10										
-1-	6,96	9,57	4,35	78,70	16,53	2,30	0,16	0,22	0,10	1,81
-2-	8,56	7,66	4,05	79,73	16,22	2,22	0,19	0,17	0,09	1,77
-3-	7,62	8,52	3,59	80,27	16,14	2,23	0,17	0,19	0,08	1,79
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,71	8,58	4,00	79,56	16,30	2,25	0,17	0,19	0,09	1,79
SD	0,80	0,96	0,38	0,80	0,21	0,04	0,02	0,03	0,01	0,02
SE	0,46	0,55	0,22	0,46	0,12	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
min	6,96	7,66	3,59	78,70	16,14	2,22	0,16	0,17	0,08	1,77
max	8,56	9,57	4,35	80,27	16,53	2,30	0,19	0,22	0,10	1,81
25										
-1-	7,17	8,02	3,38	81,43	15,19	2,37	0,17	0,19	0,08	1,93
-2-	7,14	7,98	3,36	81,09	15,12	2,38	0,17	0,19	0,08	1,93
-3-	6,49	8,66	2,16	82,68	15,15	2,31	0,15	0,20	0,05	1,91
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,94	8,22	2,97	81,74	15,15	2,35	0,16	0,19	0,07	1,92
SD	0,38	0,38	0,70	0,84	0,04	0,04	0,01	0,01	0,02	0,01
SE	0,22	0,22	0,40	0,48	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01	0,01
min	6,49	7,98	2,16	81,09	15,12	2,31	0,15	0,19	0,05	1,91
max	7,17	8,66	3,38	82,68	15,19	2,38	0,17	0,20	0,08	1,93
50										
-1-	8,33	9,26	0,00	81,94	17,59	2,16	0,18	0,20	0,00	1,77
-2-	6,93	7,79	0,00	85,71	14,72	2,31	0,16	0,18	0,00	1,98
-3-	8,00	8,00	0,00	84,00	16,00	2,25	0,18	0,18	0,00	1,89
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,75	8,35	0,00	83,89	16,10	2,24	0,17	0,19	0,00	1,88
SD	0,74	0,79	0,00	1,89	1,44	0,08	0,01	0,01	0,00	0,11
SE	0,42	0,46	0,00	1,09	0,83	0,04	0,01	0,01	0,00	0,06
min	6,93	7,79	0,00	81,94	14,72	2,16	0,16	0,18	0,00	1,77
max	8,33	9,26	0,00	85,71	17,59	2,31	0,18	0,20	0,00	1,98

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung

Tabelle A19 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von Troleandomycin (TAO) auf den Umsatz von 46 nM NNK

c (TAO) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
0										
-1-	10,73	6,90	4,21	78,54	17,63	2,61	0,28	0,18	0,11	2,05
-2-	11,40	6,99	3,31	78,68	18,39	2,72	0,31	0,19	0,09	2,14
-3-	10,49	7,49	3,75	78,28	17,98	2,67	0,28	0,20	0,10	2,09
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,87	7,12	3,76	78,50	18,00	2,67	0,29	0,19	0,10	2,09
SD	0,47	0,32	0,45	0,20	0,38	0,06	0,02	0,01	0,01	0,05
SE	0,27	0,19	0,26	0,12	0,22	0,03	0,01	0,01	0,01	0,03
min	10,49	6,90	3,31	78,28	17,63	2,61	0,28	0,18	0,09	2,05
max	11,40	7,49	4,21	78,68	18,39	2,72	0,31	0,20	0,11	2,14
1										
-1-	10,61	6,94	3,27	78,78	17,55	2,45	0,26	0,17	0,08	1,93
-2-	10,24	5,91	5,91	77,95	16,15	2,54	0,26	0,15	0,15	1,98
-3-	9,68	6,45	4,44	79,44	16,13	2,48	0,24	0,16	0,11	1,97
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,18	6,43	4,54	78,72	16,61	2,49	0,25	0,16	0,11	1,96
SD	0,47	0,52	1,32	0,74	0,81	0,05	0,01	0,01	0,04	0,03
SE	0,27	0,30	0,76	0,43	0,47	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02
min	9,68	5,91	3,27	77,95	16,13	2,45	0,24	0,15	0,08	1,93
max	10,61	6,94	5,91	79,44	17,55	2,54	0,26	0,17	0,15	1,98
5										
-1-	11,24	6,59	3,88	77,91	17,83	2,58	0,29	0,17	0,10	2,01
-2-	10,18	5,09	4,36	80,36	15,27	2,75	0,28	0,14	0,12	2,21
-3-	10,49	5,99	3,75	79,78	16,48	2,67	0,28	0,16	0,10	2,13
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,64	5,89	3,99	79,35	16,53	2,67	0,28	0,16	0,11	2,12
SD	0,54	0,75	0,33	1,28	1,28	0,09	0,01	0,02	0,01	0,10
SE	0,31	0,44	0,19	0,74	0,74	0,05	0,00	0,01	0,01	0,06
min	10,18	5,09	3,75	77,91	15,27	2,58	0,28	0,14	0,10	2,01
max	11,24	6,59	4,36	80,36	17,83	2,75	0,29	0,17	0,12	2,21
10										
-1-	12,50	6,25	3,52	77,73	18,75	2,56	0,32	0,16	0,09	1,99
-2-	4,87	4,87	4,87	84,96	9,74	2,26	0,11	0,11	0,11	1,92
-3-	8,30	5,81	4,15	81,74	14,11	2,41	0,20	0,14	0,10	1,97
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,56	5,64	4,18	81,48	14,20	2,41	0,21	0,14	0,10	1,96
SD	3,82	0,71	0,68	3,62	4,51	0,15	0,11	0,03	0,01	0,04
SE	2,21	0,41	0,39	2,09	2,60	0,09	0,06	0,01	0,01	0,02
min	4,87	4,87	3,52	77,73	9,74	2,26	0,11	0,11	0,09	1,92
max	12,50	6,25	4,87	84,96	18,75	2,56	0,32	0,16	0,11	1,99
25										
-1-	9,41	5,49	4,71	80,39	14,90	2,55	0,24	0,14	0,12	2,05
-2-	10,89	5,06	3,50	80,54	15,95	2,57	0,28	0,13	0,09	2,07
-3-	10,28	5,53	3,95	80,24	15,81	2,53	0,26	0,14	0,10	2,03
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,19	5,36	4,05	80,39	15,55	2,55	0,26	0,14	0,10	2,05
SD	0,74	0,26	0,61	0,15	0,57	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
SE	0,43	0,15	0,35	0,09	0,33	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01
min	9,41	5,06	3,50	80,24	14,90	2,53	0,24	0,13	0,09	2,03
max	10,89	5,53	4,71	80,54	15,95	2,57	0,28	0,14	0,12	2,07
50										
-1-	11,63	6,20	3,49	78,68	17,83	2,58	0,30	0,16	0,09	2,02
-2-	12,00	7,20	2,80	78,00	19,20	2,50	0,30	0,18	0,07	1,95
-3-	13,59	8,25	3,88	74,28	21,84	2,06	0,28	0,17	0,08	1,98
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	12,41	7,22	3,39	76,99	19,62	2,38	0,29	0,17	0,08	1,98
SD	1,04	1,03	0,55	2,37	2,04	0,28	0,01	0,01	0,01	0,04
SE	0,60	0,59	0,32	1,37	1,18	0,16	0,01	0,01	0,01	0,02
min	11,63	6,20	2,80	74,28	17,83	2,06	0,28	0,16	0,07	1,95
max	13,59	8,25	3,88	78,68	21,84	2,58	0,30	0,18	0,09	2,02

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A20 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von Troleandomycin (TAO) auf den Umsatz von 49 µM NNK

c (TAO) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
0										
-1-	12,99	4,33	5,19	77,49	17,32	2,31	0,30	0,10	0,12	1,79
-2-	12,39	7,26	5,56	74,79	19,65	2,34	0,29	0,17	0,13	1,75
-3-	11,48	9,84	4,92	73,77	21,32	2,44	0,28	0,24	0,12	1,80
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	12,29	7,14	5,22	75,35	19,43	2,36	0,29	0,17	0,12	1,78
SD	0,76	2,76	0,32	1,92	2,01	0,07	0,01	0,07	0,01	0,03
SE	0,44	1,59	0,18	1,11	1,16	0,04	0,01	0,04	0,00	0,02
min	11,48	4,33	4,92	73,77	17,32	2,31	0,28	0,10	0,12	1,75
max	12,99	9,84	5,56	77,49	21,32	2,44	0,30	0,24	0,13	1,80
1										
-1-	13,49	7,44	3,72	75,35	20,93	2,15	0,29	0,16	0,08	1,62
-2-	12,21	8,92	4,69	74,18	21,13	2,13	0,26	0,19	0,10	1,58
-3-	12,90	8,29	4,61	74,19	21,19	2,17	0,28	0,18	0,10	1,61
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	12,87	8,22	4,34	74,57	21,08	2,15	0,28	0,18	0,09	1,60
SD	0,64	0,74	0,54	0,67	0,14	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02
SE	0,37	0,43	0,31	0,39	0,08	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
min	12,21	7,44	3,72	74,18	20,93	2,13	0,26	0,16	0,08	1,58
max	13,49	8,92	4,69	75,35	21,19	2,17	0,29	0,19	0,10	1,62
5										
-1-	14,35	6,28	4,04	75,34	20,63	2,23	0,32	0,14	0,09	1,68
-2-	12,04	7,41	4,17	76,39	19,45	2,16	0,26	0,16	0,09	1,65
-3-	12,84	6,42	3,67	77,06	19,26	2,18	0,28	0,14	0,08	1,68
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	13,08	6,70	3,96	76,26	19,78	2,19	0,29	0,15	0,09	1,67
SD	1,17	0,61	0,26	0,87	0,74	0,04	0,03	0,01	0,01	0,02
SE	0,68	0,35	0,15	0,50	0,43	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01
min	12,04	6,28	3,67	75,34	19,26	2,16	0,26	0,14	0,08	1,65
max	14,35	7,41	4,17	77,06	20,63	2,23	0,32	0,16	0,09	1,68
10										
-1-	13,00	7,62	3,59	75,78	20,62	2,23	0,29	0,17	0,08	1,69
-2-	11,42	6,85	4,57	77,17	18,27	2,19	0,25	0,15	0,10	1,69
-3-	12,90	6,91	4,15	76,04	19,81	2,17	0,28	0,15	0,09	1,65
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	12,44	7,13	4,10	76,33	19,57	2,20	0,27	0,16	0,09	1,68
SD	0,89	0,43	0,49	0,74	1,19	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02
SE	0,51	0,25	0,28	0,43	0,69	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
min	11,42	6,85	3,59	75,78	18,27	2,17	0,25	0,15	0,08	1,65
max	13,00	7,62	4,57	77,17	20,62	2,23	0,29	0,17	0,10	1,69
25										
-1-	13,55	5,61	3,27	77,57	19,16	2,14	0,29	0,12	0,07	1,66
-2-	12,77	5,96	4,68	76,17	18,73	2,35	0,30	0,14	0,11	1,79
-3-	13,51	5,41	4,05	77,03	18,92	2,22	0,30	0,12	0,09	1,71
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	13,28	5,66	4,00	76,92	18,94	2,24	0,30	0,13	0,09	1,72
SD	0,44	0,28	0,71	0,71	0,22	0,11	0,01	0,01	0,02	0,07
SE	0,26	0,16	0,41	0,41	0,12	0,06	0,00	0,01	0,01	0,04
min	12,77	5,41	3,27	76,17	18,73	2,14	0,29	0,12	0,07	1,66
max	13,55	5,96	4,68	77,57	19,16	2,35	0,30	0,14	0,11	1,79
50										
-1-	13,51	6,76	4,05	75,68	20,72	2,22	0,30	0,15	0,09	1,68
-2-	10,96	6,85	4,57	77,17	17,81	2,19	0,24	0,15	0,10	1,69
-3-	11,87	5,48	4,57	78,08	17,35	2,19	0,26	0,12	0,10	1,71
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	12,11	6,36	4,40	76,98	18,63	2,20	0,27	0,14	0,10	1,69
SD	1,29	0,77	0,30	1,21	1,83	0,02	0,03	0,02	0,01	0,02
SE	0,75	0,44	0,17	0,70	1,16	0,01	0,02	0,01	0,00	0,01
min	10,96	5,48	4,05	75,68	17,35	2,19	0,24	0,12	0,09	1,68
max	13,51	6,85	4,57	78,08	20,72	2,22	0,30	0,15	0,10	1,71

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A21 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung aller 4 Inhibitoren auf den Umsatz von 46 nM NNK

c (4 Inhibitoren) [µM]	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
0										
-1-	7,75	7,01	2,95	82,66	14,76	2,71	0,21	0,19	0,08	2,24
-2-	7,17	6,81	3,58	82,44	13,98	2,79	0,20	0,19	0,10	2,30
-3-	7,64	6,55	3,64	82,18	14,19	2,75	0,21	0,18	0,10	2,26
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,52	6,79	3,39	82,43	14,31	2,75	0,21	0,19	0,09	2,27
SD	0,31	0,23	0,38	0,24	0,40	0,04	0,01	0,01	0,01	0,03
SE	0,18	0,13	0,22	0,14	0,23	0,02	0,00	0,00	0,01	0,02
min	7,17	6,55	2,95	82,18	13,98	2,71	0,20	0,18	0,08	2,24
max	7,75	7,01	3,64	82,66	14,76	2,79	0,21	0,19	0,10	2,30
1										
-1-	7,17	6,48	3,07	83,28	13,65	2,93	0,21	0,19	0,09	2,44
-2-	7,75	7,75	2,82	81,34	15,50	2,84	0,22	0,22	0,08	2,31
-3-	7,27	6,92	3,46	82,35	14,19	2,89	0,21	0,20	0,10	2,38
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,39	7,05	3,12	82,32	14,45	2,89	0,21	0,20	0,09	2,38
SD	0,31	0,64	0,32	0,97	0,95	0,05	0,01	0,02	0,01	0,07
SE	0,18	0,37	0,19	0,56	0,55	0,03	0,00	0,01	0,01	0,04
min	7,17	6,48	2,82	81,34	13,65	2,84	0,21	0,19	0,08	2,31
max	7,75	7,75	3,46	83,28	15,50	2,93	0,22	0,22	0,10	2,44
5										
-1-	7,84	8,63	0,00	83,92	16,47	2,55	0,20	0,22	0,00	2,14
-2-	8,15	8,15	0,00	83,70	16,30	2,70	0,21	0,22	0,00	2,26
-3-	8,11	7,72	0,00	84,17	15,83	2,59	0,22	0,20	0,00	2,18
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,03	8,17	0,00	83,93	16,20	2,61	0,21	0,21	0,00	2,19
SD	0,17	0,45	0,00	0,23	0,33	0,08	0,01	0,01	0,00	0,06
SE	0,10	0,26	0,00	0,13	0,19	0,04	0,01	0,01	0,00	0,04
min	7,84	7,72	0,00	83,70	15,83	2,55	0,20	0,20	0,00	2,14
max	8,15	8,63	0,00	84,17	16,47	2,70	0,22	0,22	0,00	2,26
10										
-1-	8,18	8,92	0,00	83,27	17,10	2,69	0,22	0,24	0,00	2,24
-2-	6,69	7,43	0,00	85,50	14,12	2,69	0,18	0,20	0,00	2,30
-3-	7,43	7,81	0,00	84,76	15,24	2,69	0,20	0,21	0,00	2,28
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	7,43	8,05	0,00	84,51	15,49	2,69	0,20	0,22	0,00	2,27
SD	0,74	0,77	0,00	1,14	0,33	0,00	0,02	0,02	0,00	0,03
SE	0,43	0,45	0,00	0,66	0,19	0,00	0,01	0,01	0,00	0,02
min	6,69	7,43	0,00	83,27	14,12	2,69	0,18	0,20	0,00	2,24
max	8,18	8,92	0,00	85,50	17,10	2,69	0,22	0,24	0,00	2,30
25										
-1-	9,09	8,00	0,00	83,27	17,09	2,75	0,25	0,22	0,00	2,29
-2-	8,40	6,87	0,00	84,73	15,27	2,62	0,22	0,18	0,00	2,22
-3-	8,92	7,43	0,00	83,64	16,35	2,69	0,24	0,20	0,00	2,25
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	8,80	7,44	0,00	83,88	16,24	2,69	0,24	0,20	0,00	2,25
SD	0,36	0,56	0,00	0,76	0,92	0,07	0,02	0,02	0,00	0,04
SE	0,21	0,33	0,00	0,44	0,53	0,04	0,01	0,01	0,00	0,02
min	8,40	6,87	0,00	83,27	15,27	2,62	0,22	0,18	0,00	2,22
max	9,09	8,00	0,00	84,73	17,09	2,75	0,25	0,22	0,00	2,29
50										
-1-	10,03	4,21	0,00	85,44	14,24	3,09	0,31	0,13	0,00	2,64
-2-	12,59	6,64	0,00	81,12	19,23	2,86	0,36	0,19	0,00	2,32
-3-	11,49	6,08	0,00	82,43	17,57	2,96	0,34	0,18	0,00	2,44
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	11,37	5,64	0,00	83,00	17,01	2,97	0,34	0,17	0,00	2,47
SD	1,28	1,28	0,00	2,21	2,54	0,12	0,03	0,03	0,00	0,16
SE	0,74	0,74	0,00	1,28	1,47	0,07	0,01	0,02	0,00	0,09
min	10,03	4,21	0,00	81,12	14,24	2,86	0,31	0,13	0,00	2,32
max	12,59	6,64	0,00	85,44	19,23	3,09	0,36	0,19	0,00	2,64

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A22 Lungenmikrosomen: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung aller 4 Inhibitoren auf den Umsatz von 49 μM NNK

c (4 Inhibitoren) [μM]	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
0										
-1-	10,00	7,39	4,35	77,83	17,39	2,30	0,23	0,17	0,10	1,79
-2-	9,50	7,44	4,96	77,69	16,94	2,42	0,23	0,18	0,12	1,88
-3-	9,48	7,76	4,31	78,45	17,24	2,32	0,22	0,18	0,10	1,82
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	9,66	7,53	4,54	77,99	17,19	2,35	0,23	0,18	0,11	1,83
SD	0,29	0,20	0,36	0,41	0,23	0,06	0,01	0,01	0,01	0,05
SE	0,17	0,12	0,21	0,23	0,13	0,04	0,00	0,00	0,01	0,03
min	9,48	7,39	4,31	77,69	16,94	2,30	0,22	0,17	0,10	1,79
max	10,00	7,76	4,96	78,45	17,39	2,42	0,23	0,18	0,12	1,88
1										
-1-	10,57	8,94	3,25	76,83	19,51	2,46	0,26	0,22	0,08	1,89
-2-	9,35	10,16	3,66	76,83	19,51	2,46	0,23	0,25	0,09	1,89
-3-	10,13	9,28	2,53	78,06	19,41	2,37	0,24	0,22	0,06	1,85
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,02	9,46	3,15	77,24	19,48	2,43	0,24	0,23	0,08	1,88
SD	0,62	0,63	0,57	0,71	0,06	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02
SE	0,36	0,36	0,33	0,41	0,03	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
min	9,35	8,94	2,53	76,83	19,41	2,37	0,23	0,22	0,06	1,85
max	10,57	10,16	3,66	78,06	19,51	2,46	0,26	0,25	0,09	1,89
5										
-1-	12,40	8,26	0,00	79,34	20,66	2,42	0,30	0,20	0,00	1,92
-2-	10,46	9,21	0,00	80,75	19,67	2,39	0,25	0,22	0,00	1,93
-3-	11,72	8,37	0,00	79,92	20,09	2,39	0,28	0,20	0,00	1,91
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	11,52	8,61	0,00	80,00	20,14	2,40	0,28	0,21	0,00	1,92
SD	0,98	0,52	0,00	0,71	0,50	0,02	0,03	0,01	0,00	0,01
SE	0,57	0,30	0,00	0,41	0,29	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01
min	10,46	8,26	0,00	79,34	19,67	2,39	0,25	0,20	0,00	1,91
max	12,40	9,21	0,00	80,75	20,66	2,42	0,30	0,22	0,00	1,93
10										
-1-	14,40	7,41	0,00	78,60	21,81	2,43	0,35	0,18	0,00	1,91
-2-	11,74	7,39	0,00	80,87	19,13	2,30	0,27	0,17	0,00	1,86
-3-	12,50	7,50	0,00	80,00	20,00	2,40	0,30	0,18	0,00	1,92
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	12,88	7,43	0,00	79,82	20,31	2,38	0,31	0,18	0,00	1,90
SD	1,37	0,06	0,00	1,15	1,37	0,07	0,04	0,01	0,00	0,03
SE	0,79	0,03	0,00	0,66	0,79	0,04	0,02	0,00	0,00	0,02
min	11,74	7,39	0,00	78,60	19,13	2,30	0,27	0,17	0,00	1,86
max	14,40	7,50	0,00	80,87	21,81	2,43	0,35	0,18	0,00	1,92
25										
-1-	10,87	9,57	0,00	79,13	20,44	2,30	0,25	0,22	0,00	1,82
-2-	10,87	7,83	0,00	81,74	18,70	2,30	0,25	0,18	0,00	1,88
-3-	10,39	8,66	0,00	80,52	19,05	2,31	0,24	0,20	0,00	1,86
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,71	8,68	0,00	80,46	19,40	2,30	0,25	0,20	0,00	1,85
SD	0,28	0,87	0,00	1,31	0,92	0,01	0,01	0,02	0,00	0,03
SE	0,16	0,50	0,00	0,75	0,53	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02
min	10,39	7,83	0,00	79,13	18,70	2,30	0,24	0,18	0,00	1,82
max	10,87	9,57	0,00	81,74	20,44	2,31	0,25	0,22	0,00	1,88
50										
-1-	8,71	7,88	0,00	83,82	16,59	2,41	0,21	0,19	0,00	2,02
-2-	10,53	6,07	0,00	83,81	16,60	2,47	0,26	0,15	0,00	2,07
-3-	9,39	6,94	0,00	83,67	16,33	2,45	0,23	0,17	0,00	2,05
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	9,54	6,97	0,00	83,77	16,51	2,44	0,23	0,17	0,00	2,05
SD	0,92	0,91	0,00	0,08	0,15	0,03	0,03	0,02	0,00	0,03
SE	0,53	0,52	0,00	0,05	0,09	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01
min	8,71	6,07	0,00	83,67	16,33	2,41	0,21	0,15	0,00	2,02
max	10,53	7,88	0,00	83,82	16,60	2,47	0,26	0,19	0,00	2,07

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung

Tabelle A23 Lebermikrosomen: Einfluss von 15 µM Nicotin und 142 µM Cotinin auf den Umsatz von 46 nM NNK

	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle						
	Kontrolle	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
-1-		5,10	7,14	3,06	11,73	72,96	23,97	3,92	0,20	0,28	0,12	0,46	2,86
-2-		5,64	8,21	3,33	12,31	70,77	26,16	3,90	0,22	0,32	0,13	0,48	2,76
-3-		5,14	6,68	2,83	10,80	74,55	22,62	3,89	0,20	0,26	0,11	0,42	2,90
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		5,29	7,34	3,07	11,61	72,76	24,25	3,90	0,21	0,29	0,12	0,45	2,84
SD		0,30	0,78	0,25	0,76	1,90	1,79	0,02	0,01	0,03	0,01	0,03	0,07
SE		0,17	0,45	0,15	0,44	1,10	1,03	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,04
min		5,10	6,68	2,83	10,80	70,77	22,62	3,89	0,20	0,26	0,11	0,42	2,76
max		5,64	8,21	3,33	12,31	74,55	26,16	3,92	0,22	0,32	0,13	0,48	2,90
	Nicotin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
-1-		5,54	7,71	4,34	11,08	71,33	24,33	4,15	0,23	0,32	0,18	0,46	2,96
-2-		4,80	6,82	3,79	10,61	73,74	22,54	3,96	0,19	0,27	0,15	0,42	2,92
-3-		4,96	7,20	3,97	10,92	72,95	23,08	4,03	0,20	0,29	0,16	0,44	2,94
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		5,10	7,24	4,03	10,87	72,67	23,32	4,05	0,21	0,29	0,16	0,44	2,94
SD		0,39	0,45	0,28	0,24	1,23	0,92	0,10	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
SE		0,23	0,26	0,16	0,14	0,71	0,53	0,06	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
min		4,80	6,82	3,79	10,61	71,33	22,54	3,96	0,19	0,27	0,15	0,42	2,92
max		5,54	7,71	4,34	11,08	73,74	24,33	4,15	0,23	0,32	0,18	0,46	2,96
	Cotinin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
-1-		5,70	7,12	3,99	10,83	72,36	23,65	3,51	0,20	0,25	0,14	0,38	2,54
-2-		5,38	7,37	3,40	9,63	74,22	22,38	3,53	0,19	0,26	0,12	0,34	2,62
-3-		6,47	6,18	2,94	8,82	75,88	21,47	3,40	0,22	0,21	0,10	0,30	2,58
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		5,85	6,89	3,44	9,76	74,16	22,50	3,48	0,20	0,24	0,12	0,34	2,58
SD		0,56	0,63	0,53	1,01	1,76	1,09	0,07	0,02	0,03	0,02	0,04	0,04
SE		0,32	0,36	0,30	0,58	1,02	0,63	0,04	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02
min		5,38	6,18	2,94	8,82	72,36	21,47	3,40	0,19	0,21	0,10	0,30	2,54
max		6,47	7,37	3,99	10,83	75,88	23,65	3,53	0,22	0,26	0,14	0,38	2,62
	Nicotin + Cotinin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
-1-		6,38	4,64	4,06	11,01	73,62	22,03	3,45	0,22	0,16	0,14	0,38	2,54
-2-		6,84	5,70	3,13	10,26	74,36	22,80	3,51	0,24	0,20	0,11	0,36	2,61
-3-		5,75	5,17	4,02	11,49	73,56	22,41	3,48	0,20	0,18	0,14	0,40	2,56
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		6,32	5,17	3,74	10,92	73,85	22,41	3,48	0,22	0,18	0,13	0,38	2,57
SD		0,55	0,53	0,52	0,62	0,44	0,39	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04
SE		0,32	0,31	0,30	0,36	0,26	0,22	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
min		5,75	4,64	3,13	10,26	73,56	22,03	3,45	0,20	0,16	0,11	0,36	2,54
max		6,84	5,70	4,06	11,49	74,36	22,80	3,51	0,24	0,20	0,14	0,40	2,61

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A24 Lebermikrosomen: Einfluss von 15 mM Nicotin und 142 mM Cotinin auf den Umsatz von 49 μ M NNK

c (4 Inhibitoren) [μ M]	Anteil der Metaboliten [%]						% Kontrolle					
	Kontrolle	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB
-1-	6,43	8,19	4,68	13,16	67,54	27,78	3,42	0,22	0,28	0,16	0,45	2,31
-2-	6,18	7,94	4,12	14,71	67,06	28,83	3,40	0,21	0,27	0,14	0,50	2,28
-3-	5,97	8,66	3,58	14,33	67,16	28,96	3,35	0,20	0,29	0,12	0,48	2,25
n	3	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3
mean	6,19	8,26	4,13	14,06	67,26	28,52	3,39	0,21	0,28	0,14	0,48	2,28
SD	0,23	0,36	0,55	0,81	0,26	0,65	0,04	0,01	0,01	0,02	0,03	0,03
SE	0,13	0,21	0,32	0,47	0,15	0,37	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
min	5,97	7,94	3,58	13,16	67,06	27,78	3,35	0,20	0,27	0,12	0,45	2,25
max	6,43	8,66	4,68	14,71	67,54	28,96	3,42	0,22	0,29	0,16	0,50	2,31
Nicotin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
-1-	9,78	10,33	4,35	5,43	70,65	25,54	1,84	0,18	0,19	0,08	0,10	1,30
-2-	12,29	9,50	6,15	5,03	67,04	26,82	1,79	0,22	0,17	0,11	0,09	1,20
-3-	10,38	10,93	5,46	5,46	67,76	26,77	1,83	0,19	0,20	0,10	0,10	1,24
n	3	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3
mean	10,82	10,25	5,32	5,31	68,48	26,38	1,82	0,20	0,19	0,10	0,10	1,25
SD	1,31	0,72	0,91	0,24	1,91	0,73	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,05
SE	0,76	0,42	0,52	0,14	1,10	0,42	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03
min	9,78	9,50	4,35	5,03	67,04	25,54	1,79	0,18	0,17	0,08	0,09	1,20
max	12,29	10,93	6,15	5,46	70,65	26,82	1,84	0,22	0,20	0,11	0,10	1,30
Cotinin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
-1-	20,69	0,00	6,90	0,00	72,41	20,69	1,16	0,24	0,00	0,08	0,00	0,84
-2-	18,58	0,00	7,96	0,00	73,45	18,58	1,13	0,21	0,00	0,09	0,00	0,83
-3-	23,01	0,00	7,08	0,00	69,03	23,01	1,13	0,26	0,00	0,08	0,00	0,78
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	20,76	0,00	7,31	0,00	71,63	20,76	1,14	0,24	0,00	0,08	0,00	0,82
SD	2,21	0,00	0,57	0,00	2,31	2,21	0,02	0,03	0,00	0,01	0,00	0,03
SE	1,28	0,00	0,33	0,00	1,34	1,28	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02
min	18,58	0,00	6,90	0,00	69,03	18,58	1,13	0,21	0,00	0,08	0,00	0,78
max	23,01	0,00	7,96	0,00	73,45	23,01	1,16	0,26	0,00	0,09	0,00	0,84
Nicotin + Cotinin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	HPB	NNAL
-1-	20,34	0,00	8,47	0,00	72,03	20,34	1,18	0,24	0,00	0,10	0,00	0,85
-2-	24,35	0,00	7,83	0,00	67,83	24,35	1,15	0,28	0,00	0,09	0,00	0,78
-3-	22,41	0,00	7,76	0,00	68,97	22,41	1,16	0,26	0,00	0,09	0,00	0,80
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	22,37	0,00	8,02	0,00	69,61	22,37	1,16	0,26	0,00	0,09	0,00	0,81
SD	2,00	0,00	0,40	0,00	2,18	2,00	0,02	0,02	0,00	0,01	0,00	0,04
SE	1,16	0,00	0,23	0,00	1,26	1,16	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02
min	20,34	0,00	7,76	0,00	67,83	20,34	1,15	0,24	0,00	0,09	0,00	0,78
max	24,35	0,00	8,47	0,00	72,03	24,35	1,18	0,28	0,00	0,10	0,00	0,85

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung

Tabelle A25 Lungenmikrosomen: Einfluss von 15 µM Nicotin und 142 µM Cotinin auf den Umsatz von 46 nM NNK

	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle					
	Kontrolle	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
-1-		7,92	6,79	3,77	81,51	14,71	2,65	0,21	0,18	0,10	2,16
-2-		8,30	7,55	4,15	80,00	15,85	2,65	0,22	0,20	0,11	2,12
-3-		7,72	7,72	3,86	80,31	15,44	2,59	0,20	0,20	0,10	2,08
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		7,98	7,35	3,93	80,61	15,33	2,63	0,21	0,19	0,10	2,12
SD		0,29	0,49	0,20	0,80	0,58	0,03	0,01	0,01	0,01	0,04
SE		0,17	0,29	0,11	0,46	0,33	0,02	0,01	0,01	0,00	0,02
min		7,72	6,79	3,77	80,00	14,71	2,59	0,20	0,18	0,10	2,08
max		8,30	7,72	4,15	81,51	15,85	2,65	0,22	0,20	0,11	2,16
Nicotin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	
-1-		9,72	8,87	3,63	78,23	18,59	2,48	0,23	0,22	0,09	1,94
-2-		7,92	7,08	5,00	80,00	15,00	2,40	0,19	0,17	0,12	1,92
-3-		8,26	7,85	4,96	78,93	16,11	2,42	0,20	0,19	0,12	1,91
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		8,49	7,94	4,53	79,05	16,57	2,43	0,21	0,19	0,11	1,92
SD		0,71	0,90	0,78	0,89	1,84	0,04	0,02	0,03	0,02	0,02
SE		0,41	0,52	0,45	0,52	1,06	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
min		7,92	7,08	3,63	78,23	15,00	2,40	0,19	0,17	0,09	1,91
max		9,27	8,87	5,00	80,00	18,59	2,48	0,23	0,22	0,12	1,94
Cotinin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	
-1-		10,48	8,73	5,24	75,98	19,21	2,29	0,24	0,20	0,12	1,74
-2-		11,95	7,96	4,42	75,66	19,91	2,26	0,27	0,18	0,10	1,71
-3-		11,16	8,04	5,36	75,45	19,20	2,24	0,25	0,18	0,12	1,69
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		11,20	8,24	5,01	75,70	19,44	2,26	0,25	0,19	0,11	1,71
SD		0,73	0,42	0,51	0,27	0,41	0,03	0,02	0,01	0,01	0,03
SE		0,42	0,25	0,29	0,16	0,24	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
min		10,48	7,96	4,42	75,45	19,20	2,24	0,24	0,18	0,10	1,69
max		11,95	8,73	5,36	75,98	19,91	2,29	0,27	0,20	0,12	1,74
Nicotin + Cotinin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	
-1-		9,61	6,99	4,37	79,04	16,60	2,29	0,22	0,16	0,10	1,81
-2-		9,78	8,00	4,89	77,33	17,78	2,25	0,22	0,18	0,11	1,74
-3-		8,93	8,04	4,02	78,57	16,97	2,24	0,20	0,18	0,09	1,76
n		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean		9,44	7,67	4,42	78,31	17,12	2,26	0,21	0,17	0,10	1,77
SD		0,45	0,60	0,44	0,88	0,60	0,03	0,01	0,01	0,01	0,04
SE		0,26	0,34	0,25	0,51	0,35	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02
min		8,93	6,99	4,02	77,33	16,60	2,24	0,20	0,16	0,09	1,74
max		9,78	8,04	4,89	79,04	17,78	2,29	0,22	0,18	0,11	1,81

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α-Hydroxylierung

Tabelle A26 Lungenmikrosomen: Einfluss von 15 mM Nicotin und 142 mM Cotinin auf den Umsatz von 49 μ M NNK

	Anteil der Metaboliten [%]					% Kontrolle				
	Kontrolle	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³
-1-	10,13	8,44	5,06	76,37	18,57	2,37	0,24	0,20	0,12	1,81
-2-	9,44	9,01	4,72	76,39	18,45	2,33	0,22	0,21	0,11	1,78
-3-	10,34	9,48	5,17	75,43	19,82	2,32	0,24	0,22	0,12	1,75
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mean	9,97	8,98	4,99	76,07	18,95	2,34	0,23	0,21	0,12	1,78
SD	0,47	0,52	0,24	0,55	0,76	0,03	0,01	0,01	0,01	0,03
SE	0,27	0,30	0,14	0,32	0,44	0,02	0,01	0,01	0,00	0,02
Min	9,44	8,44	4,72	75,43	18,45	2,32	0,22	0,20	0,11	1,75
Max	10,34	9,48	5,17	76,39	19,82	2,37	0,24	0,22	0,12	1,81
Nicotin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
-1-	16,00	8,00	5,14	70,86	24,00	1,75	0,28	0,14	0,09	1,24
-2-	13,95	9,88	6,40	69,77	23,83	1,72	0,24	0,17	0,11	1,20
-3-	15,03	8,09	6,94	69,94	23,12	1,73	0,26	0,14	0,12	1,21
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mean	14,99	8,66	6,16	70,19	23,65	1,73	0,26	0,15	0,11	1,22
SD	1,02	1,06	0,92	0,59	0,47	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
SE	0,59	0,61	0,53	0,34	0,27	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Min	13,95	8,00	5,14	69,77	23,12	1,72	0,24	0,14	0,09	1,20
Max	16,00	9,88	6,94	70,86	24,00	1,75	0,28	0,17	0,12	1,24
Cotinin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
-1-	19,35	0,00	8,87	70,97	19,35	1,24	0,24	0,00	0,11	0,88
-2-	18,26	0,00	8,70	73,04	18,26	1,15	0,21	0,00	0,10	0,84
-3-	21,14	0,00	6,50	72,36	21,14	1,23	0,26	0,00	0,08	0,89
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mean	19,58	0,00	8,02	72,12	19,58	1,21	0,24	0,00	0,10	0,87
SD	1,45	0,00	1,32	1,06	1,45	0,05	0,03	0,00	0,02	0,03
SE	0,84	0,00	0,76	0,61	0,84	0,03	0,01	0,00	0,01	0,02
Min	18,26	0,00	6,50	70,97	18,26	1,15	0,21	0,00	0,08	0,84
Max	21,14	0,00	8,87	73,04	21,14	1,24	0,26	0,00	0,11	0,89
Nicotin + Cotinin	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL	Σ Alpha ⁴	Gesamt	OH ¹	Keto ²	N-O ³	NNAL
-1-	24,00	0,00	10,00	67,00	24,00	1,00	0,24	0,00	0,10	0,67
-2-	27,66	0,00	9,57	62,77	27,66	0,94	0,26	0,00	0,09	0,59
-3-	25,74	0,00	9,90	64,36	25,74	1,01	0,24	0,00	0,10	0,65
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
mean	25,80	0,00	9,83	64,71	25,80	0,98	0,25	0,00	0,10	0,64
SD	1,83	0,00	0,22	2,14	1,83	0,04	0,01	0,00	0,01	0,04
SE	1,06	0,00	0,13	1,23	1,06	0,02	0,01	0,00	0,00	0,02
min	24,00	0,00	9,57	62,77	24,00	0,94	0,24	0,00	0,09	0,59
max	27,66	0,00	10,00	67,00	27,66	1,01	0,26	0,00	0,10	0,67

¹ OH Hydroxysäure² Keto Ketosäure³ N-O NNK-N-Oxid⁴ Σ Alpha Summe der Metaboliten der α -Hydroxylierung

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Elmar Richter für die Überlassung des Themas und den großen Freiraum, den ich erleben durfte. Mein besonderer Dank gilt der schier grenzenlosen Unterstützung im persönlichen Bereich, die ich erfahren habe - ich werde das nie vergessen.

Auch danke ich Herrn Professor Dr. Eyer und Herrn Professor Dr. Richter als kommissarische Leiter, sowie Herrn Professor Dr. Gudermann als neuen Vorstand des Walther-Straub-Instituts für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Dem gesamten AK Richter danke ich für die allseits vorhandene Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre im Alltag und bei den immer gelungenen Feiern.

Ich danke Francine für die gemeinsamen Pausen - denk auch Du gelegentlich daran, wie wir den Enten beim Großwerden zusahen.

Ich danke meinen Freunden, die mich in dieser Zeit begleitet haben. Dabei besonders Manuela für die immer wieder einmal nötige Ablenkung, sowie Michael für das immerwährende Verständnis.

Ich danke Bernd für die Geduld, für lange Diskussionen, das unermüdliche Schubsen in neue Richtungen und allen weiteren "Heldentaten".

Ich danke meiner Familie. Dabei besonders meiner Oma, die mir gezeigt hat, Neuem gegenüber immer offen zu sein.

Nicht nur Dank, vielmehr meine Gedanken gehen an meine Mama - auf zur nächsten Etappe, die es für Dich zu Erleben gilt...