

**Autoradiographische Untersuchungen  
zur Toxikokinetik von Myosmin in Ratten**

**Susanna Glas**

Aus dem  
Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. P. Eyer)

Betreuer:  
Prof. Dr. E. Richter

vorgelegt über das  
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
Lehrstuhl für Physiologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Prof. Dr. H.-J. Gabius)  
Arbeit angefertigt unter Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

---

## **Autoradiographische Untersuchungen zur Toxikokinetik von Myosmin in Ratten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Susanna Glas  
aus  
Steinhöring

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tiermedizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla  
Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. W. Hermanns

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

**meinen Eltern**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>		I
Abkürzungen		IV
1	<b>Einleitung</b>	1
2	<b>Literaturübersicht</b>	2
2.1	Klassifikation bösartiger Tumoren	2
2.2	Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese	2
2.3	Kausale Pathogenese der Tumoren	3
2.4	Vorkommen und Häufigkeit von Tumoren	4
2.5	Tabak und Tabakrauch	6
2.5.1	<b>Historischer Hintergrund</b>	6
2.5.2	<b>Inhaltsstoffe des Tabakrauches</b>	7
2.5.3	<b>Tabakalkaloide</b>	9
2.5.4	<b>Nitrosamine</b>	10
2.5.5	<b>Tabakspezifische Nitrosamine (TSNA)</b>	11
2.6	Exogene und endogene Nitrosaminbelastung	13
2.7	Kanzerogenität von <i>N</i> '-Nitrosornicotin (NNN)	14
2.8	Myosmin	15
2.8.1	<b>Entdeckung und Nachweismöglichkeiten</b>	15
2.8.2	<b>Vorkommen</b>	16
2.8.3	<b>Physikalisch-chemische Eigenschaften</b>	17
2.8.4	<b>Nitrosierung von Myosmin</b>	18
2.8.5	<b>Toxikologische Eigenschaften von Myosmin und Relevanz für die Kanzerogenese</b>	20
2.9	Pharmakokinetik und die Rolle von autoradiographischen Untersuchungen	20
2.9.1	<b>Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Elimination (ADME)</b>	20
2.9.2	<b>Eliminationskinetik</b>	23
2.9.3	<b>Autoradiographie</b>	24
3	<b>Material und Methodik</b>	26
3.1	Rahmenbedingungen	26
3.2	Material	26
3.2.1	<b>Tierversuch</b>	26
3.2.2	<b>Ganzkörper-Autoradiographie</b>	28
3.2.3	<b>Extraktion</b>	28

---

3.2.4	<b>Verbrennungsproben und Flüssigszintillationspektrometrie</b>	29
3.2.5	<b>Herstellung der Blutstandards</b>	29
3.2.6	<b>Bindungskapazität in vitro</b>	29
3.3	<b>Methodik</b>	30
3.3.1	<b>Synthese von <math>^{14}\text{C}</math> -Myosmin</b>	30
3.3.2	<b>Herstellung der radioaktiven Applikationslösungen</b>	31
3.3.2.1	$^3\text{H}$ -Myosmin	31
3.3.2.2	$^{14}\text{C}$ -Myosmin	32
3.3.3	<b>Messung des Radioaktivitätsgehalts</b>	32
3.3.3.1	$^3\text{H}$ -Myosmin	33
3.3.3.2	$^{14}\text{C}$ -Myosmin	33
3.3.4	<b>Kontrolle der Applikationslösung</b>	33
3.3.4.1	$^3\text{H}$ -Myosmin	34
3.3.4.2	$^{14}\text{C}$ -Myosmin	34
3.3.5	<b>Tierversuch</b>	35
3.3.5.1	Haltung und Ernährung der Tiere	35
3.3.5.2	Gesundheitszustand	35
3.3.5.3	Applikation und Dosierungen	35
3.3.5.3.1	<i><math>^3\text{H}</math>-Myosmin</i>	36
3.3.5.3.2	<i><math>^{14}\text{C}</math>-Myosmin</i>	36
3.3.5.4	Euthanasie	37
3.3.6	<b>Ganzkörper-Autoradiographie</b>	37
3.3.6.1	Anfertigen der Schnitte	37
3.3.6.2	Extraktion	39
3.3.6.3	Exposition und Scannen der Imageplatten	40
3.3.6.3.1	<i>Vorbereitungen</i>	40
3.3.6.3.2	<i>Exposition</i>	41
3.3.6.3.3	<i>Scanvorgang</i>	41
3.3.7	<b>Qualitative Auswertung</b>	42
3.3.8	<b>Quantitative Auswertung</b>	43
3.3.8.1	Herstellung der Blutstandards	43
3.3.8.2	Verwendung der Kalibrierungsfunktion	44
3.3.8.3	Auswerten der Regionen	44
3.3.8.4	Berechnung der gewichteten rekalkulierten Konzentrationen	45
3.3.8.5	Berechnung zur Zeitabhängigkeit	45
3.3.9	<b>Messung Restradioaktivität im Schwanz</b>	46
3.3.10	<b>Ausscheidung mit Urin und Faezes im Stoffwechselkäfig</b>	46
3.3.11	<b>Messung der Radioaktivität in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen</b>	47
3.3.12	<b>Bestimmung der in vitro Bindungskapazität mittels Autoradiographie</b>	47

---

4	<b>Ergebnisse</b>	49
4.1	Qualitative Auswertung	49
4.1.1	Vorbemerkungen	49
4.1.2	<b>Beschreibung der Ergebnisse der qualitativen Auswertung</b>	64
4.2	Quantitative Auswertung	65
4.2.1	<b>Melanin</b>	68
4.2.1.1	Konzentrationsverlauf	68
4.2.1.2	Bindung in vivo	70
4.2.1.3	Inkubation von Augenschnitten in vitro	71
4.2.2	<b>Ösophagus</b>	72
4.2.2.1	Konzentrationsverlauf	72
4.2.2.2	Bindung in vivo	74
4.2.2.3	Inkubation von Ösophagusschnitten in vitro	75
4.2.3	<b>Exkretion</b>	75
4.2.3.1	Ausscheidung mit Urin und Faezes im Stoffwechselläufig	75
4.2.3.2	Niere und Harnblase	75
4.2.3.3	Magen und Darm	77
4.2.3.4	Speichel	77
4.2.3.4.1	<i>Konzentrationsverlauf</i>	77
4.2.3.4.2	<i>Bindung</i>	77
4.2.4	<b>Nasenmuscheln</b>	78
4.2.5	<b>Akzessorische Geschlechtsdrüsen</b>	79
4.2.6	<b>Messung Restradioaktivität im Schwanz</b>	80
5	<b>Diskussion</b>	81
5.1	Verteilung von Myosmin	81
5.2	Ausscheidung von Myosmin	82
5.2.1	<b>Toxikologische Bewertung der Myosminausscheidung in den Magen</b>	83
5.3	Gewebebindung	84
5.3.1	<b>Toxikologische Bewertung der Myosminbindung im Ösophagus</b>	84
5.3.2	<b>Melaninbindung von Myosmin</b>	86
6	<b>Zusammenfassung</b>	89
7	<b>Summary</b>	90
8	<b>Literaturverzeichnis</b>	92
9	<b>Tabellenanhang</b>	101

## Abkürzungen

$^{14}\text{C}$ -Myosmin	[2'- $^{14}\text{C}$ ]-3-(1-Pyrrolin-2-yl)pyridin
$^3\text{H}$ -Myosmin	[Pyridin-5- $^3\text{H}$ ]-3-(1-Pyrrolin-2-yl)pyridin
AUC	area under the curve
BAS	Bio-Imaging Analyzer Systems
Bq	Bequerel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	decay per minute, radioaktiver Zerfall pro Minute
ETS	environmental tobacco smoke
h	Stunden
HPB (Ketoalkohol)	4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon
HS	Hauptstromrauch
HWZ	Halbwertszeit
i.v.	intravenös
ipm	Impulse pro Minute
<i>iso</i> -NNAC	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)butansäure
<i>iso</i> -NNAL	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol
LD	Letale Dosis
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
NAB	<i>N'</i> -Nitrosoanabasin
NAT	<i>N'</i> -Nitrosoanatabin
NDMA	<i>N'</i> -Nitrosodimethylamin
NMR	kernmagnetische Resonanz
NNA	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanal
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	nicotine derived nitrosamino ketone 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	<i>N'</i> -Nitrosonornicotin
NS	Nebenstromrauch
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PSL	photostimulierbare Lumineszenz
$R^2$	Quadrat des Korrelationskoeffizienten (Bestimmtheitsmaß)
RNA	Ribonukleinsäure
TSNA	tabakspezifische Nitrosamine

# 1 Einleitung

Der starke Anstieg der Inzidenz von Adenokarzinomen der Speiseröhre in allen westlichen Industrienationen (Bollschweiler et al., 2001) wird mit der Refluxkrankheit und Adipositas in Zusammenhang gebracht (Lagergren et al., 1999). Die wichtigsten Risikofaktoren für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, Alkohol und Rauchen, spielen dagegen beim Adenokarzinom nur eine geringe Rolle (Lagergren et al., 2000). Epidemiologische Untersuchungen zeigen einen Anstieg des Tumorrisikos für Ösophagus, Magen, Colon und Rectum mit zunehmendem Konsum von Getreideprodukten, Nudeln und Reis (Chatenoud et al., 1999). Myosmin, das bisher nur als Tabakalkaloid bekannt war, wurde in neuesten Untersuchungen aus unserem Arbeitskreis in einer Vielzahl vegetarischer Nahrungsmittel gefunden, darunter auch in Grundnahrungsmitteln wie Reis, Mais, Weizen und Kartoffeln (Tyroller et al., 2002a; Zwickenpflug et al., 1998). In Anwesenheit von Nitrit wird Myosmin im pH-Bereich zwischen 2 und 5 schnell und vollständig nitrosiert (Zwickenpflug, 2000; Wilp et al., 2002b). Die dabei entstehenden Reaktionsprodukte führen entweder direkt oder nach metabolischer Aktivierung zu DNA-Addukten, welche bei Ratten mit der Entstehung von Ösophagustumoren in Verbindung gebracht werden (Hecht, 1998). Myosmin aus der Nahrung könnte als Initiator für das Adenokarzinom der menschlichen Speiseröhre eine Rolle spielen.

Zum Stoffwechsel von Myosmin gab es bis vor kurzem außer einer qualitativen Untersuchung der Metaboliten im Urin von Ratten keinerlei Studien (Hecht et al., 1981). Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine erste Orientierung über die Verteilung und Bindung des Myosmins in Geweben bzw. Organen der Ratte mit Hilfe autoradiographischer Untersuchungen zu gewinnen. Diese Methode war für qualitative Untersuchungen bereits erfolgreich für verwandte Substanzen wie das Tabakalkaloid Nicotin und die tabakspezifischen Nitrosamine eingesetzt worden (Brittebo und Tjälve, 1980 und 1981; Castonguay et al., 1983b, 1984b und 1985; Domelöf et al., 1987; Hansson und Schmitterlöw, 1962; Tjälve et al., 1968; Tjälve und Castonguay, 1984; Waddell und Marlowe, 1976 und 1980). Durch Verwendung neuer computergestützter Technologie wurde in dieser Arbeit auch eine quantitative Auswertung der Autoradiogramme ermöglicht (Maas et al., 2000). Die zusätzliche Ermittlung von nicht extrahierbarer Radioaktivität sollte Hinweise auf eine Bindung an DNA oder Proteine geben (Brandt und Brittebo, 1989). Parallel zu den Untersuchungen an den Gewebeschnitten wurde im Stoffwechselläufig die Ausscheidung der Gesamtradioaktivität des markierten Myosmins in Urin und Faeces direkt bestimmt. Wegen der zu erwartenden Melaninbindung wurden neben unpigmentierten auch pigmentierte Ratten verwendet (Steiner und Bühring, 1990). Dadurch sollte abgeklärt werden, ob Haaranalysen wie sie beim Nicotin durchgeführt werden, auch für ein Biomonitoring der Myosminbelastung des Menschen geeignet sein könnten.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Klassifikation bösartiger Tumoren**

Unter Tumor im engeren Sinn versteht man eine abnorme umschriebene Gewebsmasse, welche durch autonome, zeitweise progressive und überschießende Proliferation körpereigener teilungsfähiger Zellen entsteht. Auch wenn der auslösende Reiz scheinbar nicht mehr wirksam ist hält das Tumorwachstum an. Sarkome stellen die bösartigen, heterotypisch wachsenden Formen der mesenchymalen Geschwülste des Binde-, Gefäß- und Stützgewebes dar. Karzinome sind bösartige, heterotypisch wachsende Tumoren, die sich aus drüsigen oder epithelialen Geweben entwickeln. Zu letzteren gehören neben exokrinen und endokrinen Drüsen auch Epithelien innerer und äußerer Oberflächen sowie der Leber, Lunge und Niere. Als Adenokarzinome werden die bösartigen Tumoren bezeichnet, welche vom Drüsenepithel ausgehen. Das Plattenepithelkarzinom tritt mit verschiedenen Differenzierungsgraden auf (Trautwein, 1971).

### **2.2 Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese**

Für Kanzerogene kann man keine sinnvollen Grenzwerte angeben, oberhalb derer eine Gefährdung der Gesundheit beginnt. Man spricht deshalb nur von einer Gefährdung, da theoretisch bereits ein Molekül für die Entstehung von Krebs verantwortlich sein kann.

Der Prozess der Krebsentstehung läuft über mehrere Stufen ab (Abb. 2-1). Die meisten Kanzerogene sind sogenannten Präkanzerogene und bedürfen einer metabolischen Aktivierung um ihr tumorerzeugendes Potential entfalten zu können. Das entstandene ultimale Kanzerogen ist dann als sogenannter Initiator in der Lage, kovalent an DNA, RNA, Proteine und andere Zellbestandteile zu binden und somit ins Zellgenom einzugreifen. Dies macht sich jedoch erst im zweiten Schritt der Kanzerogenese bemerkbar, in dem sogenannte Promotoren dazu beitragen, dass der beschädigte Teil der DNA abgelesen wird. Im Gegensatz zur Initiation, bei der bereits eine einzige Exposition zur Setzung des Schadens ausreicht, ist eine gleichmäßige und länger andauernde Aufnahme des Promotors nötig. Mit steigender Dosis des Kanzerogens und mit längerer Aufnahme von Promotoren steigt demnach das Risiko, an Tumoren zu erkranken. Wird genetisch veränderte DNA abgelesen, so entstehen Zellen, die ihre Fähigkeit bezüglich der Regulierung ihres Lebenszyklus eingebüßt haben (Cottier, 1980).

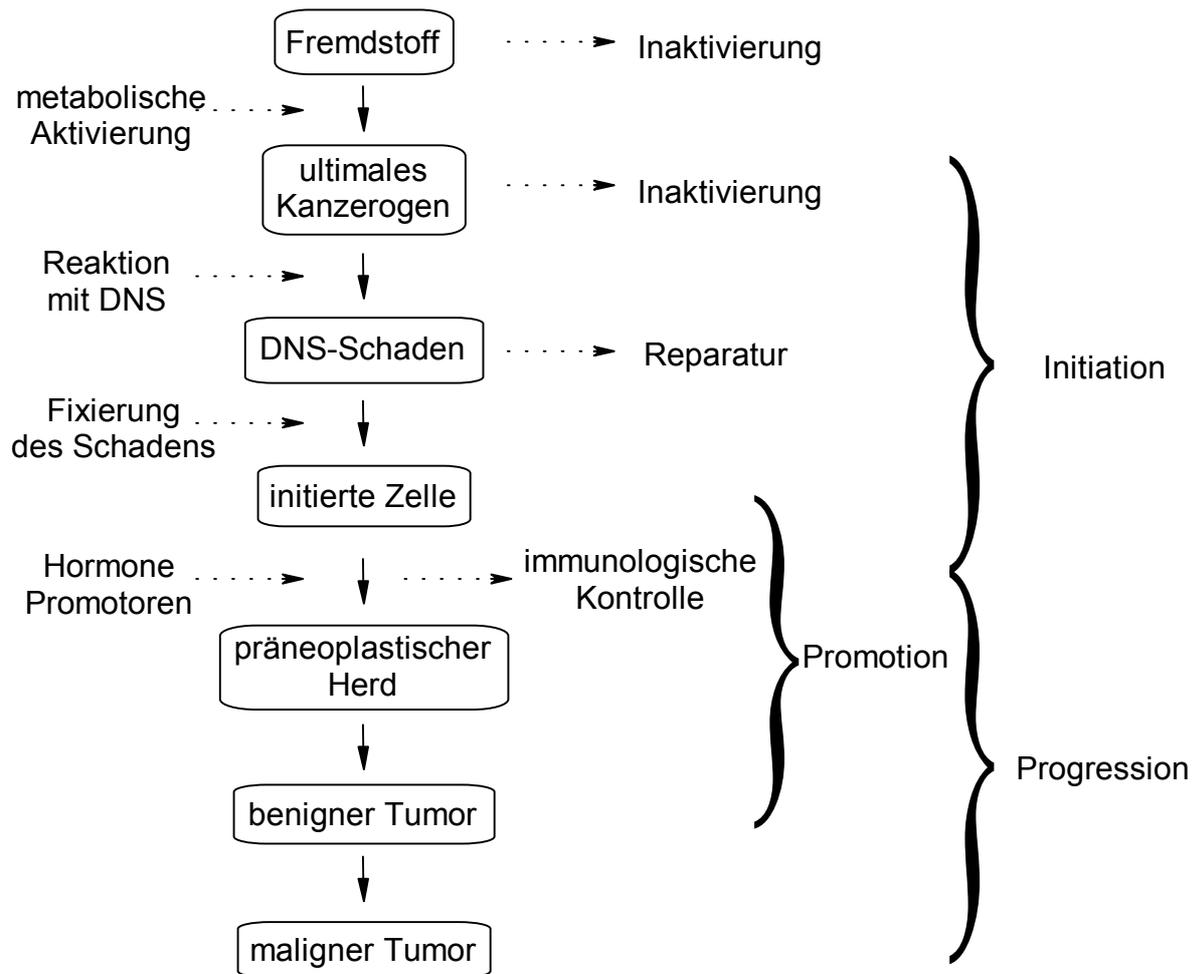


Abb. 2-1: Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese (nach Machholz und Lewerenz, 1989)

## 2.3 Kausale Pathogenese der Tumoren

Die Entstehung einer onkologischen Erkrankung beruht in der Regel nicht auf einer einzigen Ursache, sondern auf einem Geflecht verschiedenster Faktoren (Abb. 2-2). Von den vermeidbaren Risikofaktoren ist das Rauchen, das 25-30% aller Krebstodesfälle verursacht, von besonderer Bedeutung. Ein ähnlich großer, weniger genau abschätzbarer Anteil aller Krebstodesfälle von etwa 20-40% dürfte auf falsche Ernährungsweisen zurückzuführen sein, wie allgemeine Überernährung, einem zu hohen Anteil tierischen Fetts und einem zu geringen Anteil bestimmter Vitamine, Mineralien und unverdaulicher Faserstoffe aus frischem Obst und Gemüse. Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung bestimmter Krebskrankheiten sind genetische Faktoren, Infektionen, Expositionen am Arbeitsplatz, erhöhter Alkoholgenuss, und Einflüsse aus der Umwelt, wie beispielsweise die Sonneneinstrahlung (Doll und Peto, 1981).

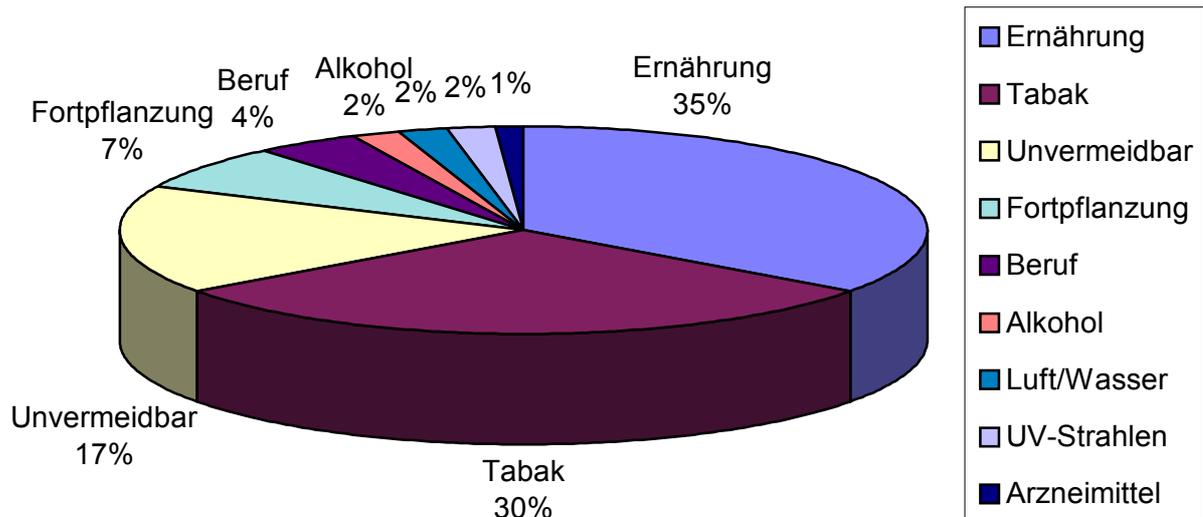


Abb. 2-2: Krebsrisikofaktoren (Doll und Peto, 1981)

## 2.4 Vorkommen und Häufigkeit von Tumoren

Maligne Tumoren sind in Deutschland neben Herz- und Kreislauferkrankungen die häufigsten Todesursachen. In Deutschland erlag jeder vierte Verstorbene im Jahr 2000 einem Krebsleiden. Bei den Männern hatten bösartige Erkrankungen der Verdauungsorgane (35000 Verstorbene) und der Atmungsorgane (30900 Verstorbene) die größte Bedeutung. Bei den Frauen dominieren bösartige Neubildungen der Verdauungsorgane und der Brustdrüse mit 34800 bzw. 17900 Sterbefällen (Amtliche Todesursachenstatistik, 2001).

Die Inzidenz beschreibt die Zahl der Neuerkrankungen innerhalb einer Population in einer bestimmten Zeitspanne. Die höchste Inzidenz wurde von Lungenkrebserkrankungen in Deutschland bei Männern Mitte der 70er bis Ende der 80er Jahre erreicht. Ein leicht rückläufiger Trend zeichnet sich in den letzten Jahren ab und liegt derzeit bei rund 27900 Neuerkrankungen jährlich (19% aller bösartigen Neubildungen). Bei den Frauen gehört der Lungenkrebs mit jährlich etwa 8900 Neuerkrankungen (5% aller bösartigen Neubildungen) inzwischen zu den sechs häufigsten Krebsformen, die Inzidenz steigt kontinuierlich an. Die unterschiedliche Trendentwicklung wird auf veränderte Rauchgewohnheiten bei Frauen und Männern zurückgeführt (AG Bevölkerungsbezogener Krebsregister, 2002).

Bei weltweiten Untersuchungen konnten altersstandardisierte Tumormortalitätsraten für verschiedene Organe beim Menschen angegeben werden. Abbildung 2-3 zeigt die entsprechenden Ergebnisse für Deutschland im Zeitraum 1990 bis 1994 (Levi et al., 1999).

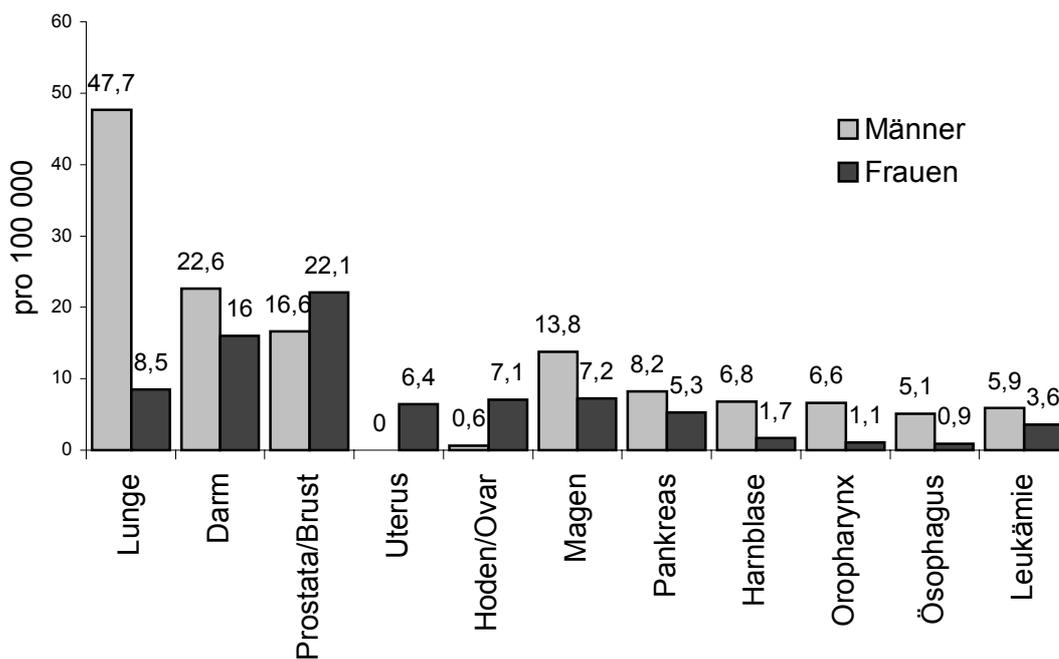


Abb. 2-3: Altersstandardisierte Tumormortalitätsraten in Deutschland 1990-1994

Bei Männern sind bis zu 90%, bei Frauen bis zu 60% der Lungenkrebserkrankungen auf das aktive Rauchen zurückzuführen. Zwischen der Anzahl der gerauchten Zigaretten und dem Lungenkrebsrisiko konnte eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung festgestellt werden (US Department of Health and Human Services, 1989; Royal College of Physicians, 1983).

Lungenkrebs besitzt eine Latenzzeit von etwa 20 Jahren. Meist wird er erst im Spätstadium erkannt und behandelt. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate mit Lungenkrebs ist mit etwa 9% bei Männern schlechter als für Frauen mit 17%. Damit gehört der Lungenkrebs zu den prognostisch ungünstigsten Krebsformen. Für einen Lungenkrebspatienten in Deutschland beträgt der Verlust an Lebenserwartung im Durchschnitt 12 bis 13 Jahre (AG Bevölkerungsbezogener Krebsregister, 2002).

Das Rauchen wird außerdem für Neoplasien in Speiseröhre, Nasenhöhle, Haut, Trachea, Mundhöhle, Leber und Pankreas verantwortlich gemacht (Hecht, 1998).

Die Inzidenzrate für Adenokarzinome des Ösophagus ist in den vergangenen Jahren stark angestiegen (Abb. 2-4). Mit einem jährlichen Zuwachs von etwa 15-30% erfährt diese Tumorart in Westeuropa und den USA von allen Krebstypen die höchste Steigerung (Bollschweiler et al., 2001). Epidemiologische Untersuchungen zeigen einen Anstieg des Tumorrisikos für Ösophagus, Magen, Colon und Rectum mit zunehmendem Konsum von Getreideprodukten, Nudeln und Reis (Chatenoud et al., 1999).

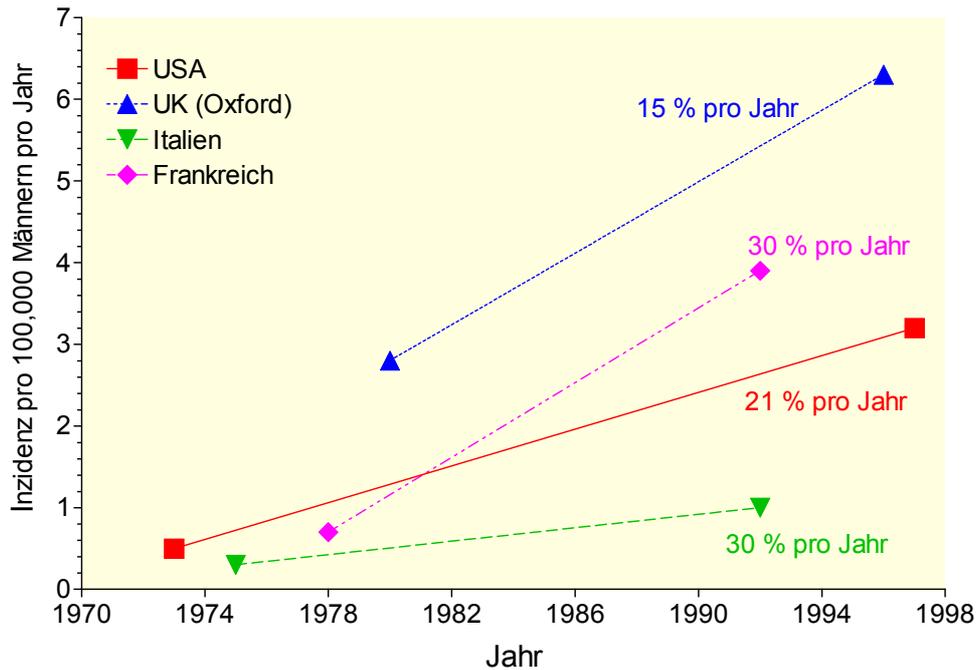


Abb. 2-4: Anstieg des Adenokarzinoms (Bollschweiler et al., 2001)

## 2.5 Tabak und Tabakrauch

### 2.5.1 Historischer Hintergrund

Tabak (*Nicotiana tabacum*, *N. rustica*, *Solanaceae*) war für die Spanier beim Betreten Amerikas noch unbekannt. Der Anblick Zigarren rauchender Indianer versetzte sie in Erstaunen. Um 1560 wurden Samen der Tabakpflanze nach Spanien exportiert, die daraus gewonnenen Pflanzen dienten zunächst als Gartenzierde. Jean Nicot, der französische Gesandte in Lissabon, sorgte für die Verbreitung der Pflanze und wurde so zum Namensgeber der Gattung. Erst Ende des 16. Jahrhunderts begannen die Spanier die eingerollten Blätter nach indianischem Vorbild zu rauchen. Diese neue Mode erlangte schnell große Beliebtheit. Vorübergehende Verbote wurden nicht eingehalten, woraufhin die Landesherren den Gebrauch zwar gestatteten, aber besteuerten (Franke, 1992). Bis zum 1. Weltkrieg war der Tabakkonsum in den USA, Europa und Japan eher bescheiden. 1920 lag der Pro-Kopf-Verbrauch (bezogen auf den Bevölkerungsanteil der über 15-jährigen) in den westlichen Staaten zwischen 400 und 800 Zigaretten pro Jahr und stieg dann in einer rasanten Entwicklung bis Mitte der 1960er Jahre auf 4400 Zigaretten an (Lee, 1975). Mit beginnendem Gesundheitsbewusstsein ging der Konsum in den industrialisierten Staaten zurück. So sank beispielsweise der jährliche Tabakverbrauch pro männlichen Erwachsenen in den USA von 4345 Zigaretten im Jahr 1963 auf 2493 im Jahr

1994. Im Gegensatz dazu konnte in den Entwicklungsländern im gleichen Zeitraum eine Steigerungsrate von bis zu 260% (China) verzeichnet werden (Giovino et al., 1994; World Health Organization, 1997).

## 2.5.2 Inhaltsstoffe des Tabakrauches

Im Tabak und Tabakrauch konnten mittlerweile mehr als 3000 individuelle Bestandteile isoliert werden (Hoffmann und Wynder, 1994; Hoffmann und Hoffmann, 1997). Unter anderem sind organspezifische Kanzerogene, Cokanzerogene, Tumorpromotoren wie auch -inhibitoren enthalten (Hoffmann et al., 1994; Hoffmann und Hecht, 1990). Der Hauptteil der Inhaltsstoffe findet sich in der Kondensatphase, die häufig umgangssprachlich „Teer“ genannt wird. Der Kondensatgehalt der Zigaretten in Deutschland lag 1975 zwischen ca. 9 und 25 mg mit Extremwerten von 2 und 30,9 mg (IARC, 1986). Als Folge der Tendenz zur „leichten Zigarette“ kam er mittlerweile auf etwa 12 mg zu liegen. Inzwischen weiß man jedoch, dass auch diese Zigaretten die Gesundheitsrisiken nicht in dem Maß reduzieren, dass sie den Raucher gegen die Gefahren des Rauchens schützen können (National Cancer Institute, 2001).

Beim Tabakrauch unterscheidet man zwischen Haupt- und Nebenstromrauch (Abbildung 2-5). Als Hauptstromrauch wird der Rauch bezeichnet, der die Zigarette, Zigarre oder Pfeife während des Zuges am Filterende verlässt und vom Raucher größtenteils inhaliert wird. Der Rauch, der während der Zugpausen an die Umgebung abgegeben wird, wird als Nebenstromrauch bezeichnet (Klus und Kuhn, 1982).

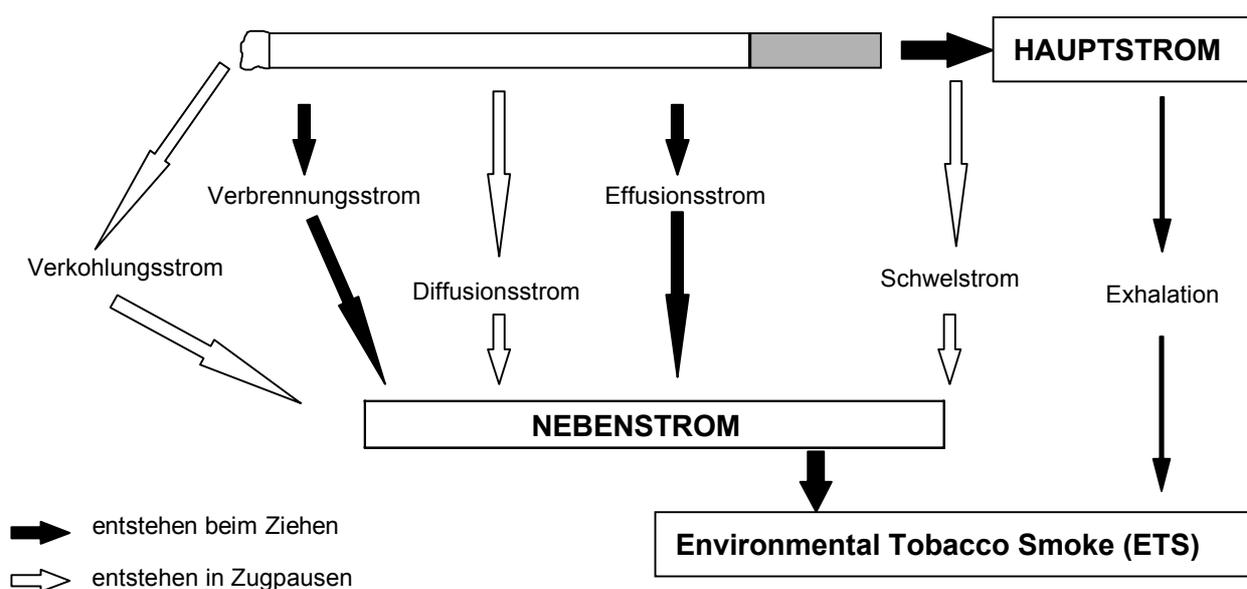


Abb. 2-5: Rauchströme einer Zigarette (nach Römpp Chemie Lexikon 1995)

Der Nebenstromrauch entsteht bei deutlich tieferen Temperaturen als der Hauptstromrauch und besitzt somit eine andere Zusammensetzung. Der vom Nichtraucher aus der Umgebung eingeatmete Tabakrauch wird als Environmental Tobacco Smoke (ETS) bezeichnet. Er stellt ein Gemisch aus 80 bis 85% Nebenstromrauch und 15 bis 20% exhalieren Hauptstromrauch dar (Scherer und Adlkofer, 1999). Sowohl Haupt- als auch Nebenstromrauch bestehen aus einer gasförmigen Phase, die flüchtige Substanzen enthält sowie einer Partikelphase, dem Kondensat, in dem sich die halbflüchtigen oder nichtflüchtigen Stoffe befinden wie Alkaloide (Nikotin und seine Derivate), aromatische Amine sowie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK). Die Verteilung der Bestandteile auf Haupt- und Nebenstromrauch ist von besonderem Interesse für die unfreiwillige Exposition gegenüber Tabakrauch, das sogenannte Passivrauchen (Klus und Kuhn, 1982; US National Research Council, 1986), das als Risikofaktor für Lungenkrebs beim Nichtraucher identifiziert werden konnte. Von der MAK-Kommission wurde der ETS 1998 in die höchste Klasse (IIIA1, eindeutig kanzerogen für den Menschen) der kanzerogenen Substanzen und Substanzgemische eingestuft (Anon, 1998). Eine Beurteilung des ETS hinsichtlich der individuellen Belastung des Menschen durch Kanzerogene sowie dessen Beitrag zur Umweltbelastung erweist sich jedoch als schwierig und wird von den Experten kontrovers diskutiert (Beratungskommission der DGPT, 1995; Marquardt, 1996, Richter, 1996; Witschi et al., 1997). Die Studie von *Bofetta et al.* (1998) ergibt ein zwar nur geringfügig, aber signifikant reduziertes Lungenkrebsrisiko nach Passivrauchexposition in der Kindheit. Nicht signifikant sind dagegen seine Ergebnisse bezüglich eines leicht erhöhten Risikos bei der Exposition im Erwachsenenalter. Als signifikant erhöht wird dagegen das Lungenkrebsrisiko in den ländlichen Gebieten Chinas nach Passivrauchbelastung in der Kindheit angegeben (Wang et al., 2000).

Tabelle 2-1 gibt einen Überblick über einige der etwa 40 nachweislich kanzerogenen Inhaltsstoffe im Tabakrauch wie Formaldehyd, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), aromatische Amine und tabakspezifische Nitrosamine (TSNA) sowie über deren Konzentrationen, Verteilung und die möglichen Zielorgane (Hoffmann und Wynder, 1994; National Cancer Institute, 1999).

Tab. 2-1: Einige der nachweislich kanzerogenen Verbindungen in Haupt- und Nebenstromrauch von Zigaretten

Substanz	µg/Zigarette (NS <sup>1</sup> )	relative Verteilung NS / HS <sup>1</sup>	Mögliche Zielorgane
Benzol	240-490	8 – 10 / 1	Knochenmark: Leukämie
Formaldehyd	1500	50 / 1	Nase
Teer (Gesamtpartikel)	14-30 mg	1 – 16 / 1	
Benzo[a]pyren	0,04-0,07	2,5 – 20 / 1	Lunge, Kehlkopf
N'-Nitrosodimethylamin	0,2-1,0	20 - 130 / 1	Leber (Niere)
4-Aminobiphenyl	0,14	29 - 70 / 1	Harnblase
N'-Nitrosornicotin (NNN)	0,15-1,7	0,5 - 5 / 1	Ösophagus, Mundhöhle
4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) <sup>2</sup>	0,2-1,4	1 - 22 / 1	Lunge, Kehlkopf, Pankreas, Leber
<sup>1</sup> NS, HS = Nebenstromrauch, Hauptstromrauch <sup>2</sup> NNK = nicotine derived nitrosamino ketone			

### 2.5.3 Tabakalkaloide

Als Alkaloide werden vorwiegend in Pflanzen auftretende, basische Naturstoffe mit einem oder mehreren, meist heterozyklisch eingebauten Stickstoff-Atomen im Molekül bezeichnet. Den Alkaloiden der Tabakpflanzen (*Nicotiana ssp.*) werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Als Stickstoffreserve und Wachstumsregulatoren sind sie an der Entwicklung der jungen Pflanze beteiligt. Außerdem stellen sie einen wirksamen Schutz gegen Insekten und Pflanzenfresser dar. Gleichzeitig sind die Alkaloide aber auch Produkte von Entgiftungsreaktionen bzw. Abfallprodukte im Pflanzenmetabolismus (Bush et al., 1993). Zu den wichtigsten und bekanntesten Vertretern der Tabakalkaloide zählen Nicotin, Nornicotin, Anabasin und Anatabin, bei denen ein in Position 3 substituierter Pyridyl-Ring das Grundgerüst bildet (Abb. 2-6). Nicotin ist in 34 von 65 Tabakarten als Hauptalkaloid vertreten, während in 19 Nornicotin den größten Anteil der Alkaloide ausmacht. Anabasin ist das dritthäufigste Alkaloid der *Nicotiana*-Arten.

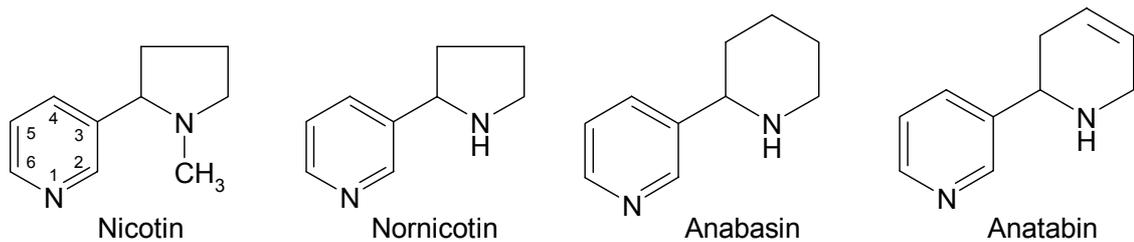


Abb. 2-6: Strukturen von Tabakalkaloiden

Pflanzenart, Anbauweise, Reifungsgrad sowie der Einsatz von Düngemitteln beeinflussen die Menge an Alkaloiden in der Pflanze. Den höchsten Gehalt an Nicotin besitzen die Tabakblätter, während man in den Wurzeln bereits weniger vorfindet und der Stengel den geringsten Anteil aufweist. Insbesondere während des Reifungsprozesses steigt der Gehalt an Alkaloiden an. Nach der Ernte wird der Wassergehalt der Tabakblätter durch verschiedene Trocknungsverfahren auf 20 - 25% reduziert, bei der anschließenden Fermentation kommt es dann zu einer Art Nachreifung (Franke, 1992).

## 2.5.4 Nitrosamine

Allen Nitrosaminen gemein ist das chemische Strukturmerkmal einer an ein Stickstoffatom gebundenen Nitrosogruppe. Nitrosamine entstehen bevorzugt im sauren Milieu aus sekundären Aminen und salpetriger Säure (Abb. 2-7).

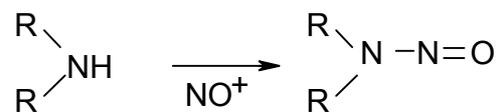


Abb. 2-7: Vereinfachtes Schema der Nitrosierung

In neutraler und alkalischer Lösung vermögen Stickoxide auch primäre und sekundäre Amine unabhängig von der Basizität des Amins zu nitrosieren (Machholz und Lewerenz, 1989). Ebenso ist eine Bildung aus tertiären Aminen möglich, allerdings verläuft die Reaktion wesentlich langsamer, da zuerst eine Stickstoff-Kohlenstoff-Bindung gespalten werden muss (Williams, 1988). Nitrit selbst ist nicht das eigentlich nitrosierende Agens. Die Nitrosierung erfolgt durch das Nitrosylkation,  $\text{NO}^+$  oder Nitrosylhalogenide,  $\text{NOX}$ , als reaktive Agenzien.

Der Anteil des Nitrosierungsmittels  $\text{NO}^+$  und somit die Ausbeute an Nitrosamin lässt sich über den eingestellten pH-Wert steuern (Ridd, 1961). Am besten verlaufen die meisten Nitrosierungsreaktionen bei einem pH-Wert zwischen 3,0 und 3,5. Ein niedrigerer pH-Wert bewirkt eine Protonierung des Stickstoffs des sekundären Amins zum Imminiumion und behindert die Reaktion mit nitrosierenden Substanzen. pH-Werte über 5 verhindern zunehmend die säurekatalysierte Nitrosierung. Als potenzielle Inhibitoren der Nitrosaminbildung sind alle Substanzen anzusehen, die mit salpetriger Säure schneller reagieren als mit sekundären Aminen. In Nahrungsmitteln können unter anderem Inhaltsstoffe wie Phenole aber auch die Vitamine C, E und A, hemmend wirken (Machholz und Lewerenz, 1989).

### 2.5.5 Tabakspezifische Nitrosamine (TSNA)

Bei der Nitrosierung von Tabakalkaloiden entstehen tabakspezifische Nitrosamine (TSNA). Abbildung 2-8 veranschaulicht die Bildung der sieben verschiedenen TSNA, welche bislang im Tabak nachgewiesen werden konnten: **NNK** (4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon), **NNAL** (4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol), **iso>NNAL** (4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol), **iso>NNAC** (4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)butansäure), **NNN** (*N'*-Nitrosornicotin), **NAB** (*N'*-Nitrosoanabasin), und **NAT** (*N'*-Nitrosoanatabin).

NNK entsteht unter Ringöffnung über Zwischenstufen aus Nicotin (Caldwell et al., 1993). Von allen tabakspezifischen Nitrosaminen konnte NNA bisher noch nicht im Tabak oder Tabakrauch identifiziert werden. Wegen der hohen Reaktivität der Aldehydgruppe wird eine schnelle Weiterreaktion zu *iso>NNAC* oder *iso>NNAL* angenommen (Hoffmann et al., 1994). Die Nitrosamine NNN, NAB und NAT entstehen durch Nitrosierung der entsprechenden Alkaloide Nicotin, Anabasin und Anatabin, die allesamt sekundäre Amine sind. Auch die Nitrosierung des tertiären Amins Nicotin trägt zur NNN-Bildung bei (Hecht et al., 1977; Caldwell et al., 1991). Obwohl die TSNA ein intensiv bearbeitetes Gebiet darstellen, konnte erst in jüngster Zeit gezeigt werden, dass nicht nur Nicotin sondern auch Myosmin leicht zu NNN nitrosiert werden kann (Zwickenpflug, 2000).

NNN, NNK und NAT kommen im Allgemeinen in größeren Mengen vor als die restlichen, wobei NNN, NNK und NNAL diejenigen mit dem höchsten kanzerogenen Potenzial sind (Hoffmann et al., 1994).

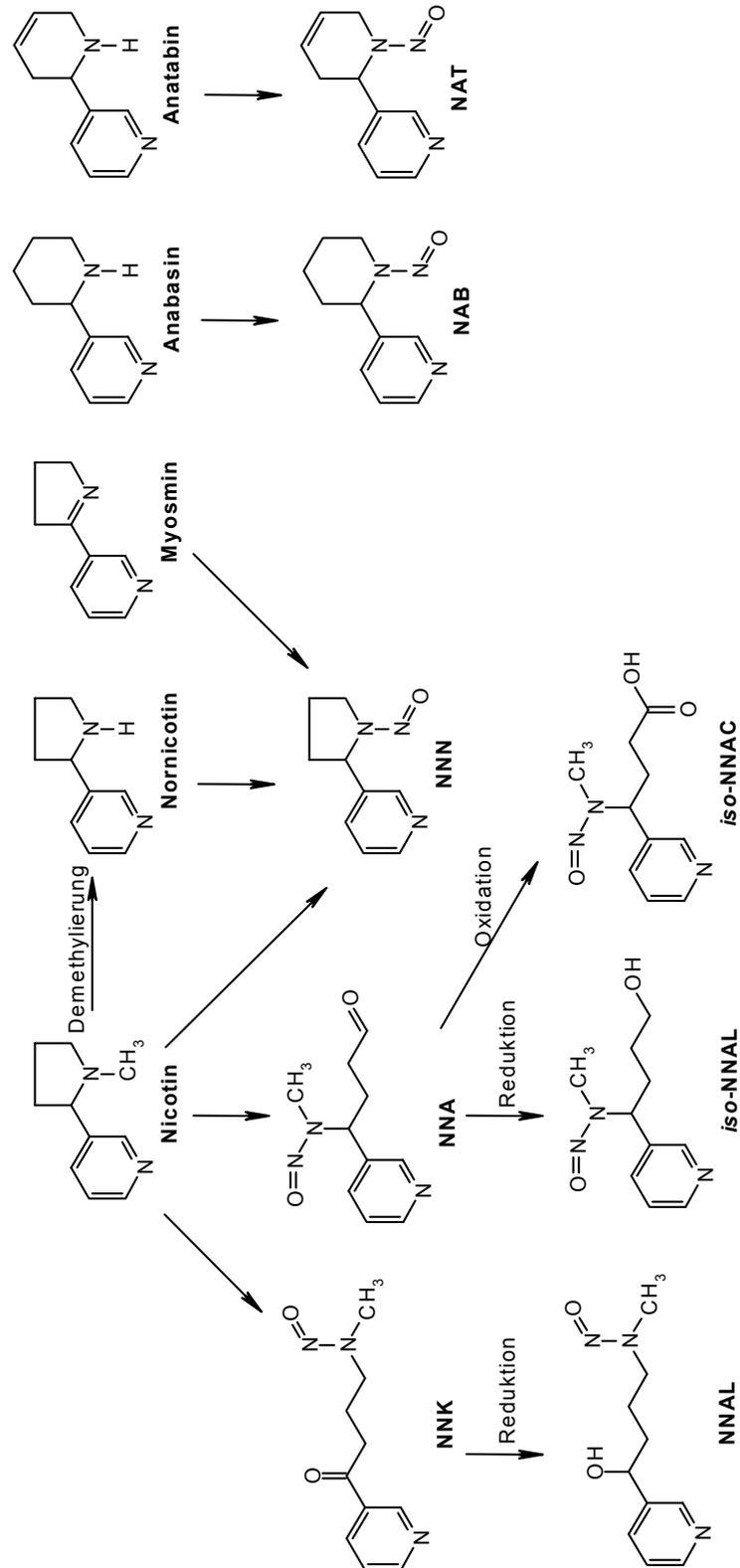


Abb. 2-8: Bildung der tabakspezifischen Nitrosamine (in Abwandlung nach Hoffmann et al., 1994)

## 2.6 Exogene und endogene Nitrosaminbelastung

Die Gesamtbelastung des Menschen mit Nitrosaminen erfolgt auf zwei Wegen. Zum einen findet eine exogene Belastung durch die Aufnahme von Nitrosaminen aus der Umwelt statt, die überwiegend vom Tabakrauch, aber auch von Nahrungsmitteln, Kosmetika, Medikamenten und Industrieemissionen herrührt. Mit dem Genuss von Tabakwaren setzt sich ein großer Teil der Bevölkerung einer besonders bedeutenden Nitrosaminquelle freiwillig aus. Mit der Nahrung nehmen die Menschen in Westeuropa pro Person und Tag durchschnittlich 0,5 µg Nitrosamine zu sich (Koehl und Eisenbrand, 1999). Besonders hohe Gehalte an Nitrosaminen findet man in gepökelten Fleischwaren (10-80 µg/kg NDMA in Salami), allen geräucherten Lebensmitteln und in getrocknetem Fisch. Um die Nitrosaminbildung zu verringern, wird neben der Senkung des Nitrit- und Nitratzusatzes zu gepökelten Fleischwaren der Zusatz von Hemmstoffen wie Ascorbinsäure empfohlen (Belitz und Grosch, 1992). Ascorbinsäure hat einen besonders stark hemmenden Effekt auf die *N*-Nitrosierung (Mirvish et al., 1972; Fiddler et al., 1973). Sie dient in der Fleischwarenherstellung außerdem als Umrötehilfe, da sie durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid die Bildung des roten Pökelfarbstoffes Stickoxidmyoglobin fördert.

Andererseits kann eine Bildung von Nitrosaminen aber auch *in vivo* erfolgen (Ohshima und Bartsch, 1981). Dies ist auf die Aufnahme nitrosierbarer Amine und nitrosierender Agenzien wie Nitrit, Nitrat, und Stickoxide ( $\text{NO}_x$ ) zurückzuführen. Vorläufer für *N*-Nitrosoverbindungen sind in der Umwelt weit verbreitet. Bei Vorliegen günstiger Bedingungen kann eine Vielzahl stickstoffhaltiger Substanzen mit Nitrit zu *N*-Nitrosoverbindungen reagieren. Als Nitrosierungsmittel muss neben Nitrit auch Nitrat gelten, weil es, beispielsweise durch bakterielle Reduktion, sehr leicht in Nitrit übergehen kann. Quellen von Nitrit aus Lebensmitteln sind gepökelte Fleisch- und Wurstwaren, denen die Substanz zur Umrötung, Geschmacksbildung und Konservierung zugesetzt wird. Hauptaufnahmequellen von Nitrat für den Menschen sind pflanzliche Lebensmittel wie Spinat oder Rote Bete, Trinkwasser und gepökelte Fleischprodukte (Selenka und Brand-Grimm, 1976). Nitrat, das mit der Nahrung aufgenommen wurde, wird im Gastrointestinaltrakt absorbiert und zu 25% mittels eines Anionentransportsystems in den Speichel abgesondert (Spiegelhalder et al., 1976; Tannenbaum et al., 1976; National Academy of Sciences, 1981). Speichel, der direkt aus den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen entnommen wird, enthält nur Nitrat, aber kein Nitrit (Tannenbaum et al., 1974). Nitrit wird erst in der Mundhöhle durch mikrobielle Reduktion aus Nitrat gebildet. Die Bakterien der Mundhöhle reduzieren mehr als 20% des Speichelnitrats (das entspricht 5% der aufgenommenen Menge) zu Nitrit, welches wiederum fast vollständig mit dem Speichel geschluckt wird und so die Hauptquelle (80%) für Nitrit im Magen darstellt (Eisenbrand et al., 1980; National Academy of Sciences, 1981). Die Nitritkonzentrationen im Speichel betragen bei gesunden Individuen 6-10 mg/L, können jedoch bei Aufnahme von nitratreicher Kost auf 500 mg/L ansteigen (Tannenbaum et al., 1976).

Trotzdem findet man im Magensaft von gesunden Probanden meist kein Nitrit. Dies liegt an der aktiven Sekretion von Ascorbinsäure, die mit dem Nitrit reagiert (Iijima et al., 2002; Moriya et al., 2002). Untersuchungen an Patienten mit chronischen Gastritiden oder Ulcera haben gezeigt, dass Nüchternmagensaft mit pH-Werten  $>5$ , also mit unzureichender Säurekonzentration, zum Teil erhebliche Mengen an Nitrit enthält. Verantwortlich hierfür ist auch die verstärkte Besiedelung des Magens mit nitritbildenden Bakterien wie *Escherichia coli* und *Proteus* (Walters et al., 1978; Koehl und Eisenbrand, 1999).

In Organen mit chronischer Infektion oder Entzündung können Makrophagen und Neutrophile als Antwort auf die Immunstimulation Stickoxide bilden. Unter Beteiligung des Enzyms NO-Synthetase wird in einer Sauerstoff- und NADPH-abhängigen Reaktion der endständige Guanidino-Stickstoff des L-Arginins zu Citrullin oxidiert und dabei NO freigesetzt, welches als Vasodilatator in den Arteriolen und als Neurotransmitter dient. Es wird jedoch in so großem Umfang produziert, dass der überwiegende Teil mit dem im Blut gelösten Sauerstoff zu den potenten Nitrosierungsagentien  $N_2O_3$  und  $N_2O_4$  reagiert (Mirvish, 1995; Vermeer, 2000).

## 2.7 Kanzerogenität von *N*<sup>7</sup>-Nitrosonornicotin (NNN)

NNN zählt neben NNK und NNAL zu den tabakspezifischen Nitrosaminen mit dem im Tierversuch nachgewiesenen höchsten kanzerogenen Potenzial (Hecht, 1998). Wichtigste Zielorgane des NNN sind bei Ratten der Ösophagus sowie die Nasenhöhle. Die Art der Applikation hat hierbei einen wichtigen Einfluss. In vier Studien an F344 Ratten konnten nach oraler Gabe über Trinkwasser, Futter oder Magensonde Tumoren in Ösophagus und Nasenhöhle induziert werden (Castonguay et al., 1984a; Hoffmann et al., 1975; Hecht et al., 1983; Stoner et al., 1998). Nach subkutaner Applikation von NNN wurden bei vier anderen Studien an F344 Ratten entweder ausschließlich oder vorherrschend Tumoren der Nasenhöhlen und zusätzlich Tumoren der Speiseröhre beobachtet (Hecht, 1980; Hoffmann et al., 1984; Castonguay et al., 1984a; Hecht et al., 1982), ähnlich verhielt es sich bei Verabreichung mittels Magensonde (Nachiappan et al., 1994). Die Schleimhäute von Ösophagus und Nasenhöhle vermögen NNN metabolisch zu aktivieren, in beiden sind DNA-Addukte nachweisbar. Interessanterweise konnten bei Sprague-Dawley Ratten nach oraler Verabreichung keine ösophagealen Tumoren induziert werden (Singer und Taylor, 1976), was nicht mit einem unterschiedlichen Metabolismus im Ösophagus der beiden Tierstämme zu erklären ist (Griciute et al., 1986).

Bei Mäusen verschiedener Stämme verursacht NNN Lungentumoren, jedoch in deutlich geringerem Umfang als NNK (Hecht et al., 1978; Castonguay et al., 1983a; Hecht et al., 1988). Durch Versuche mittels topischer Applikation konnte die Haut als Zielorgan ausgeschlossen werden (Deutsch-Wenzel et al., 1985).

Studien am Hamster führten zum Auftreten von Neoplasien in Trachea und Nasenhöhle (Hilfrich et al., 1977; McCoy et al., 1981; Hecht et al., 1983).

Beim Nerz, dem einzigen Nicht-Nager, an dem die Kanzerogenität des NNN geprüft wurde, wurde eine hohe Spezifität für die Induktion von Nasentumoren (Neuroepitheliome) mit Neigung zur Invasion ins Vorderhirn nachgewiesen (Koppang et al., 1992 und 1997).

## 2.8 Myosmin

### 2.8.1 Entdeckung und Nachweismöglichkeiten

Neben Nicotin war Myosmin zwar eines der ersten strukturell aufgeklärten Tabakalkaloide, es wurde jedoch bisher weit weniger erforscht. Es gelang *Tso* und *Jeffrey* (1953) die verschiedenen Alkaloide in *Nicotiana tabacum* mittels Papierchromatographie zu trennen und deren Gehalt mit anschließenden UV-Absorptionsspektren abzuschätzen. Bei einem Gesamtalkaloidanteil von 2,68% ergibt sich die Reihenfolge: Nornicotin (1,42%), Nicotin (0,47%), Anabasin (0,27%), Myosmin (0,14%). In Rohtabak liegt der Gehalt an Myosmin zwischen 0,9 und 2 mg/g. In einer anderen Methode zur quantitativen Bestimmung von Myosmin wird das Alkaloid nach Extraktion und Aufreinigung im sauren Milieu mit dem Derivatisierungsreagenz *o*-Aminobenzaldehyd umgesetzt. Der gelbe Farbkomplex besitzt ein definiertes Absorptionsmaximum und kann bei der entsprechenden Wellenlänge vermessen werden (Sisler, 1969).

In der heranwachsenden Pflanze entsteht Myosmin durch Dehydrogenierung von Nornicotin (Abb. 2-9; Kisaki und Tamaki, 1966; Leete und Chedekel, 1972). Nach Gabe von  $^{14}\text{C}$ -Nornicotin an intakte Tabakpflanzen über einen Zeitraum von acht Tagen, wurden 55% der Radioaktivität in Nornicotin und 15% in Myosmin wiedergefunden. Dass die Bildung von Myosmin irreversibel verläuft, konnte in Versuchen gezeigt werden, in denen *Nicotiana glauca*-Pflanzen  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Myosmin gegeben wurde. Es entstand weder markiertes Nicotin noch Nornicotin. Dagegen konnte die Bildung radioaktiv markierter Nicotinsäure beobachtet werden, wobei der Großteil der  $^{14}\text{C}$ -Atome in der Carboxyl-Gruppe gebunden war (Leete, 1984). Die weite Verbreitung von Myosmin in der Pflanzenwelt (siehe nächster Abschnitt), auch in Pflanzen die kein Nicotin enthalten, legt die Vermutung nahe, dass es noch andere, bisher nicht charakterisierte Biosynthesewege für dieses Alkaloid gibt.

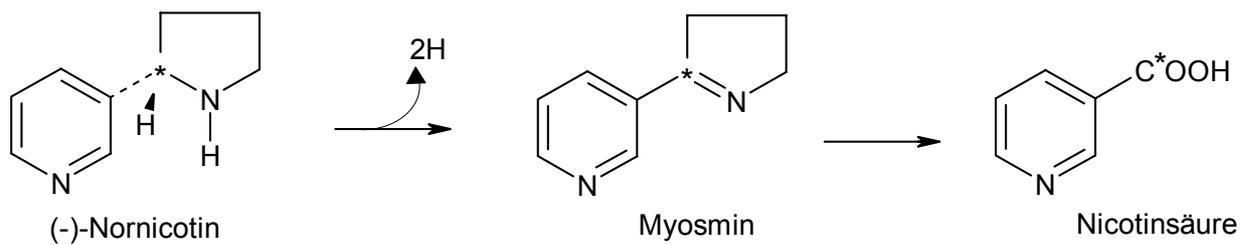


Abb. 2-9: Bildung von Myosmin aus Nornicotin, Abbau zu Nicotinsäure

## 2.8.2 Vorkommen

Das Vorkommen von Myosmin ist nicht allein auf den Tabak beschränkt. So konnte es in Blättern und Wurzeln der australischen Pflanze *Duboisia hopwoodii*, die wegen der narkotisierenden Wirkung ihrer Blätter von den Aborigines gekaut wird, nachgewiesen werden (Luanratana und Griffin, 1982). Der Beitrag dieser Pflanze zu einer tabakunabhängigen Myosmin-Exposition des Menschen ist für den Großteil der Weltbevölkerung jedoch unerheblich.

Eine weitaus größere Relevanz besitzt eine Quelle, die in unserem Arbeitskreis 1998 entdeckt wurde. In verschiedenen Nussproben konnte Myosmin in Konzentrationen zwischen 0,2 und 2 ng/g nachgewiesen werden (Zwickenpflug et al., 1998). Die gefundenen Mengen reichen an die durch Passivrauchen aufgenommenen Konzentrationen heran. Wird in einem Raum geraucht, so beläuft sich der Myosmingehalt der Luft auf 0,04 bis 0,185  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Jenkins et al., 1996). Bei einem Atemausatmavolumen von 20  $\text{m}^3/\text{Tag}$  und einer 70%-igen Inhalation des Alkaloids aus dem ETS (Benowitz, 1996) nimmt ein Erwachsener über die Passivrauchbelastung täglich 0,06-2,6  $\mu\text{g}$  Myosmin zu sich. Die mit dem Verzehr von 100 g Nüssen aufgenommene Menge Myosmin liegt mit 0,02 bis 0,2  $\mu\text{g}$  bereits in derselben Größenordnung. Weiterführende Arbeiten zeigten, dass Myosmin auch in Grundnahrungsmitteln wie Reis und Mais sowie in weiteren Lebensmitteln nachzuweisen ist. Tabelle 2-2 zeigt die in unserem Arbeitskreis auf Myosmin untersuchten Pflanzen (Tyroller et al., 2002a). Myosmin konnte in einigen dieser Pflanzen in Konzentrationen von 0,01 (Karotte) bis 5,7 ng/g (roher Popcornmais) nachgewiesen werden.

Außerdem konnte Myosmin in Kuhmilch und Sahne (bis zu 6,25 ng/g) gefunden werden (Tyroller et al., 2002a) und ist auch in Muttermilch vorhanden (Maier, pers. Mitt.). Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Bezeichnung *tabakspezifisches* Alkaloid für Myosmin nicht länger korrekt.

Tab. 2-2: Überblick über alle auf Myosmin untersuchten Pflanzen sowie Zuordnung zu Familien

Myosmin nachgewiesen		Myosmin nicht nachgewiesen	
Haselgewächse (Corylaceae)	Haselnuss	Korbblütler (Compositae lig.)	Blattsalat
Schmetterlingsblütler (Papilionaceae)	Erdnuss	Gänsefußgewächse (Chenopodiaceae)	Spinat
Nachtschattengewächse (Solanaceae)	Kartoffel Tomate	Kürbisgewächse (Scrophulariaceae)	Gurke
Doldenblütler (Umbelliferae)	Karotte	Lauchgewächse (Liliaceae)	Zwiebel
Sterkuliengewächse (Sterculiaceae)	Kakao	Weinrebengewächse (Vitaceae)	Weintraube
Rosengewächse (Rosaceae)	Apfel	Bananengewächse (Musaceae)	Banane
Ananasgewächse (Bromeliaceae)	Ananas	Rautengewächse (Rutaceae)	Mandarine Zitrone
Strahlengriffelgewächse (Actinidiaceae)	Kiwi		
Sauergräser	Hirse		
Süssgräser (Gramineae)	Weizen Reis Mais		

### 2.8.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Aus der Beobachtung, dass Myosmin mit wässriger Hydroxylamin-Lösung als Carbonyl-Komponente reagiert, konnte auf das in Abbildung 2-10 dargestellte reversible Hydrolysegleichgewicht (Ringtautomerie) geschlossen werden.

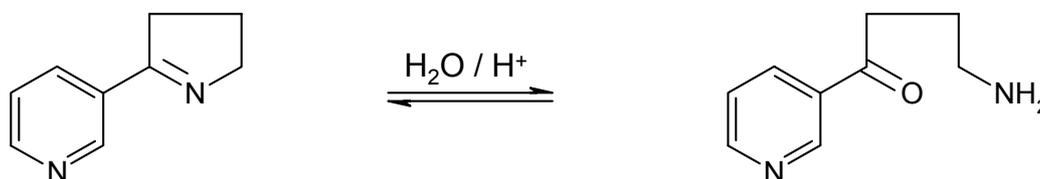


Abb. 2-10: Reversible Hydrolyse von Myosmin im sauren Milieu

Aufgrund von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren war es möglich, die pH-Abhängigkeit dieses Gleichgewichts zu beschreiben. Im sauren pH-Bereich liegt Myosmin als primäres Amin überwiegend

in der offenkettigen Aminoketon-Form vor. Im alkalischen Milieu dominiert die geschlossene Ringform (Brandänge und Rodriguez, 1983). Bei einem pH-Wert von 7,4 liegt nur 1% des Myosmins in der offenkettigen Form vor (Zoltewicz et al., 1989). Mit steigendem Anteil an offenkettiger Form erhöht sich auch die Hydrophilie der Verbindung.

Myosmin ist nicht wasserdampfflüchtig, sein Schmelzpunkt liegt zwischen 39 °C und 42 °C. Das Absorptionsmaximum im Infrarotbereich liegt bei  $\nu_{C=N} = 1618 \text{ cm}^{-1}$  (Brandänge und Lindblom, 1976; Witkop, 1954; Korte und Schulze-Steinen, 1962), das Maximum der Absorption ultravioletter Strahlung befindet sich bei  $\lambda_{\text{max}} = 234 \text{ nm}$  (Swain et al., 1949).

## 2.8.4 Nitrosierung von Myosmin

Der bis vor kurzem postulierte Verlauf des Myosmin-Stoffwechsels war der einer Nitrosierung des Myosmins zu NNN in zwei Schritten. Zunächst wurde Myosmin hydriert und das Produkt schließlich nitrosiert. NNN wurde dann durch metabolische Umwandlung aktiviert um schließlich eine Bindung mit der DNA oder mit Proteinen eingehen zu können (Hu et al., 1979). Die direkte Nitrosierung von Myosmin wurde von *Zwickenpflug* (2000) und *Wilp* et al. (2002b) untersucht. Man erhält ein Gemisch aus NNN und 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB), dessen Zusammensetzung sich mit dem pH-Wert der Reaktionslösung verändert (Abb. 2-11).

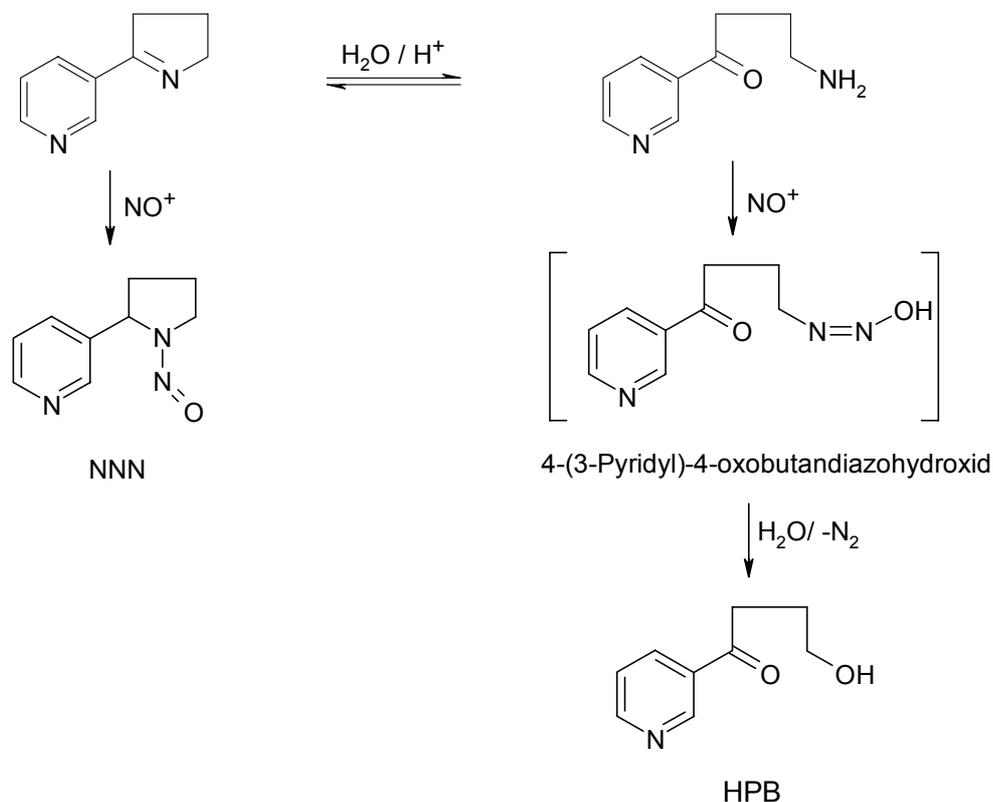


Abb. 2-11: pH-Abhängige Nitrosierung von Myosmin (*Zwickenpflug*, 2000)

Diese Beobachtungen werden mit dem bereits beschriebenen reversiblen Hydrolysegleichgewicht des Myosmins erklärt. Im Sauren liegt Myosmin vorwiegend in der offenkettigen Amino-ketonform vor. Die Nitrosierung liefert das instabile Diazohydroxid welches unter  $N_2$ -Abspaltung zum Ketoalkohol weiterreagiert.

Bei einem basischen pH-Wert wird dagegen die Bildung von NNN aus der geschlossenen Iminform des Myosmins bevorzugt. Bei niedrigen pH-Werten  $<2$  wird allerdings ebenfalls mehr NNN als HPB gebildet (Wilp et al., 2002a und b). Während NNN eine metabolische Aktivierung benötigt, kann HPB aus Myosmin auch direkt durch Nitrosierung entstehen. Die instabile Zwischenstufe, die ebenso im NNN-Metabolismus vorkommt, ist ein starkes Elektrophil, welches kovalente Bindungen mit zellulären Makromolekülen wie DNA, RNA oder Proteinen eingehen kann (Abb. 2-12). Dies wurde mit radioaktiv markiertem Myosmin in Nitrosierungsansätzen in Gegenwart von Kalbsthymus DNA nachgewiesen (Wilp et al., 2002b).

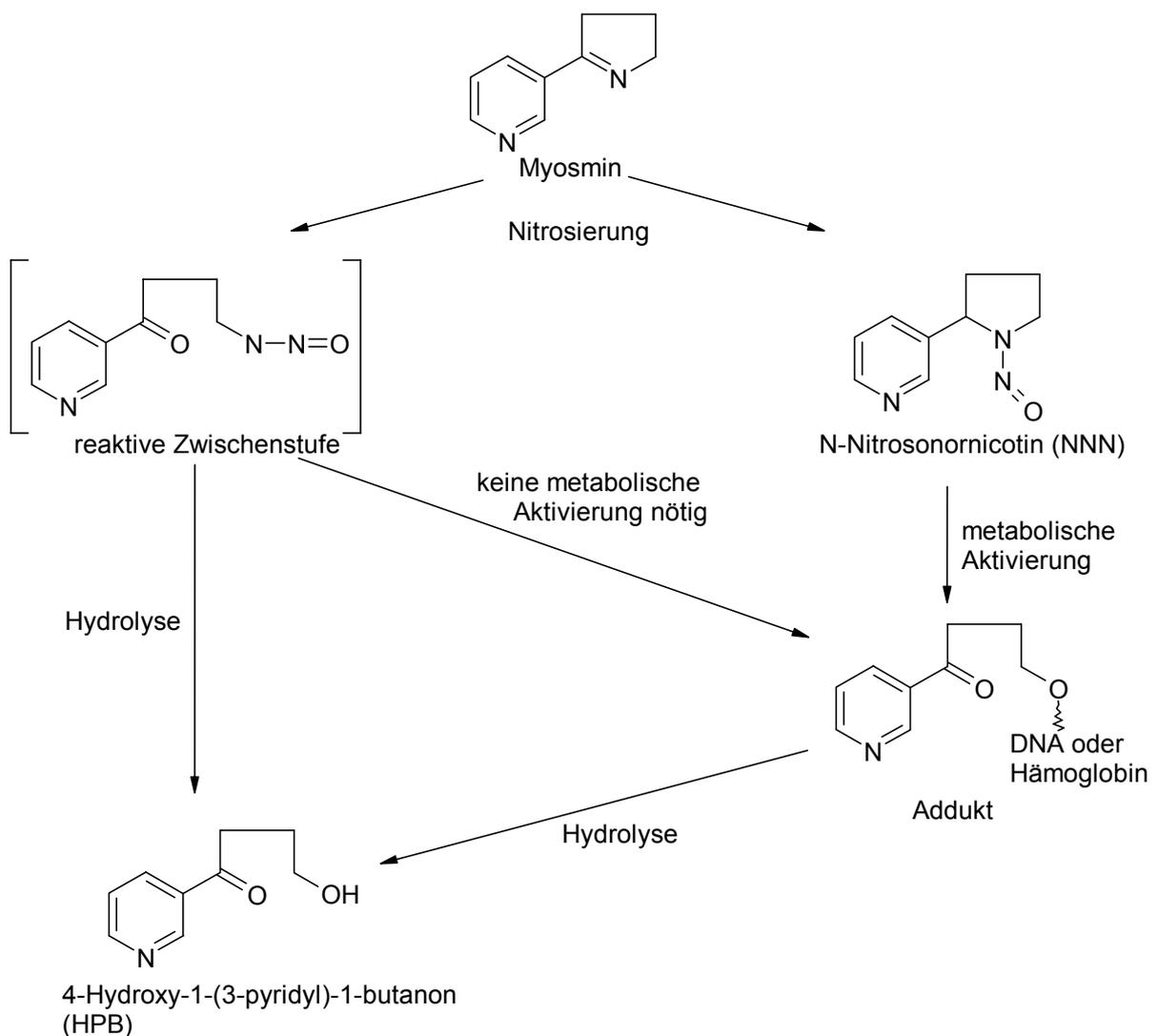


Abb. 2-12: Nitrosierung von Myosmin und Reaktionsfolge zum HPB

Aufgrund der direkten Bildung von HPB aus Myosmin ist demnach eine metabolische Aktivierung des Nitrosierungsprodukts im Organismus nicht zwingend erforderlich, um eine DNA- oder Protein-Bindung zu ermöglichen (Wilp et al., 2002b).

### **2.8.5 Toxikologische Eigenschaften von Myosmin und Relevanz für die Kanzerogenese**

Verglichen mit Nicotin, dessen tödliche Dosis für den Menschen auf 40-60 mg geschätzt wird, ist Myosmin weit weniger toxisch. Der LD<sub>50</sub>-Wert beträgt für Ratten zwischen 190 mg/kg bei intraperitonealer Applikation und 1875 mg/kg bei oraler Gabe (Römpf Chemie Lexikon, 1995; Werle und Schievelbein, 1961). Einen Versuch, in dem Mäusen über einen Zeitraum von 50 Wochen täglich je 0,5 mg Myosmin verabreicht wurden, überlebten 76% der Tiere, wohingegen in der Kontrollgruppe 98% überlebten (Werle und Schievelbein, 1961).

Aus Abbildung 2-12 wird ersichtlich, dass bei der Bildung von HPB eine instabile Zwischenstufe durchlaufen wird, infolge derer eine Bindung an DNA oder Proteine möglich ist. Die Adduktbildung erfolgt in einer sehr viel direkteren Reaktionsfolge als bislang angenommen (Zwickenpflug, 2000). Dies bedeutet, dass bei Vorhandensein nitrosierender Verbindungen im sauren Milieu bereits ohne Zutun des Organismus aus Myosmin eine Spezies entstehen kann, die kanzerogenes Potenzial besitzt. Im Ames-Test zeigte Myosmin keine mutagenen Eigenschaften, jedoch konnte die Induktion von DNA-Schäden im Testsystem *Escherichia coli* *poIA*<sup>+</sup>/*poIA*<sup>-</sup> beobachtet werden (Riebe et al., 1982). Während sich im Test auf die spontane Frequenz des Schwesterchromatid-Austausches in Ovarialzellen des Hamsters kein Effekt von Myosmin zeigte (Riebe und Westphal, 1983), konnte mit Hilfe des Comet-Assay ein genotoxisches Potenzial von Myosmin in humanen Lymphozyten und Nasenschleimhautzellen nachgewiesen werden (Kleinsasser et al., 2002). Unter Nitrosierungsbedingungen bei pH 3-5 wurde eine kovalente Bindung des Myosmins an Kalbsthymus-DNA nachgewiesen (Wilp et al., 2002b).

## **2.9 Pharmakokinetik und die Rolle von autoradiographischen Untersuchungen**

### **2.9.1 Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Elimination (ADME)**

Unter Pharmakokinetik (Toxikokinetik) versteht man das Verhalten chemischer Substanzen im Organismus. Dazu gehören Aufnahme (Absorption, Resorption), Verteilung (Distribution), sowie Speicherung und Bindung im Organismus, in den einzelnen Organen und Geweben, die chemische Veränderung der Stoffe (Metabolismus, Biotransformation) und schließlich die Aus-



bevorzugt in die am stärksten durchbluteten Organe. Erst in der späteren Phase der Verteilung kommt es zum Ausgleich, was bedeutet, dass im Anschluss an die initiale Verteilung eine Umverteilung aus den gut durchbluteten in die weniger gut durchbluteten Räume stattfindet.

Das Pharmakon kann entweder in den Körperflüssigkeiten gelöst vorliegen oder an bestimmte Körperbestandteile gebunden sein und sich an bestimmten Stellen im Körper bevorzugt anreichern. Das häufigste Phänomen einer solchen Anreicherung ist die Bindung an Plasma- oder Gewebsproteine. Die Bindung an Rezeptorproteine oder an Enzyme erfolgt spezifisch, bei der unspezifischen Bindung wird der Stoff an beliebige Proteine gebunden. In beiden Fällen kann die Proteinbindung reversibel oder irreversibel sein. Bei der reversiblen Bindung stellt sich zwischen gebundenen und nicht gebundenen Stoff ein Gleichgewicht ein. Irreversible Bindungen sind selten und meist kovalent. Eine Besonderheit stellt die starke Bindung einer Reihe von Pharmaka und Genussgiften an das Melanin dar (siehe Kap. 5.3.2).

Im Organismus wird die körperfremde Substanz metabolisiert. Bei diesen Reaktionen unterscheidet man Funktionalisierungsreaktionen (Phase I) und Konjugationsreaktionen (Phase II). Bei ersteren werden funktionelle Gruppen in das Molekül eingeführt oder entsprechende Gruppen freigelegt. Beispiele für Phase-II-Reaktionen sind Glucuronidierung, Sulfatierung, Acetylierung sowie die Konjugation mit Aminosäuren bzw. Glutathion. Die meisten Reaktionen werden durch Enzyme katalysiert, die sich in den Lebermikrosomen befinden. Durch die Metabolisierung erhöht sich meist auch die Wasserlöslichkeit, damit geht die Möglichkeit zur renalen Elimination einher. Lipophile Substanzen, die nur langsam oder gar nicht metabolisiert werden, reichern sich im Fettgewebe an. Extrembeispiele hierfür sind Organochlorverbindungen wie Hexachlorbenzol und Vertreter aus der Reihe der polychlorierten Biphenyle, Dibenzofurane und Dibenzodioxine, für die beim Menschen Halbwertszeiten von Jahren bis Jahrzehnten geschätzt wurden.

Als Ausscheidungsorgane kommen neben den Nieren und dem Darmkanal auch die Lunge sowie Drüsen (Schweiß-, Speichel-, Milch-, Schleim-, Talgdrüsen) in Betracht. Der wichtigste Ausscheidungsweg ist die renale Elimination, die durch die glomeruläre Filtration, die tubuläre Sekretion und die tubuläre Reabsorption bestimmt wird. Das Ausmaß der glomerulären Filtration eines Stoffes hängt entscheidend von seiner Bindung an Plasmaproteine ab. Die renal-tubuläre Sekretion beinhaltet den Transport von Substanzen aus dem peritubulären Raum in die Tubuluszelle und aus der Zelle in das Tubuluslumen. Im proximalen und distalen Nierentubulus gibt es mehrere Transportsysteme mit einer breiten Substratspezifität. Die Reabsorption von Stoffen aus dem Lumen kann durch passive Diffusion und/oder aktiven Transport erfolgen. In Abhängigkeit vom  $pK_a$ -Wert des Stoffes, dem Urin-pH und dem Urinfluss kann es zu einer nahezu kompletten Rückdiffusion aus dem Urin via Tubuluszelle in das Blut kommen.

Die Abgabe mit Faezes erfolgt nach biliärer oder intestinaler Ausscheidung. Bei ersterer wird der Stoff unverändert oder nach seiner Metabolisierung über die Galle in den Dünndarm abgegeben und kann mit den Faezes ausgeschieden werden. Wird der Stoff im Darm erneut resorbiert verzögert sich die Ausscheidung, man spricht von einem enterohepatischen Kreislauf. Bei der intestinalen Ausscheidung wird der Stoff entweder über die Schleimhaut des Magens oder des Darms in dessen Lumen sezerniert. Substanzen mit alkalischen  $pK_a$ -Wert, z.B. Alkaloide, werden in den Magen ausgeschieden. Sie liegen im Blut und im Zytoplasma bei einem pH-Wert von 7,4 zum Teil in nicht-ionisierter Form vor und können die Zellmembran passieren. Der saure pH im Magen bewirkt eine vollständige Ionisierung und verhindert die Rückresorption, es kommt zur Anreicherung im Magen. Dies macht sich die Gerichtsmedizin für den Nachweis von Giften wie Strychnin im Mageninhalt zunutze. Nach Alkalisierung des Magensafts im Dünndarm können diese Stoffe wieder rückresorbiert werden, es kommt zu einem enterogastralen Kreislauf.

Die Ausscheidung basischer Substanzen in die leicht bis stark sauren Sekrete der Speichel-, Tränen- und Schweißdrüsen, der Schleimhäute in Nase, Tracheobronchialtrakt, Vagina und Prostata wird ebenfalls durch das Ionenfallenprinzip begünstigt. Besondere Bedeutung für das Biomonitoring hat die Ausscheidung in den Speichel, der im Gegensatz zum Blut nicht-invasiv gewonnen werden kann (Derendorf und Garrett, 1987; Starke et al., 2001).

## 2.9.2 Eliminationskinetik

Die Eliminationsgeschwindigkeit der meisten Pharmaka ist in weiten Konzentrationsbereichen zur jeweiligen Plasmakonzentration proportional, d.h. die Konzentration fällt im Plasma zunächst rasch und mit abnehmender Plasmakonzentration immer langsamer ab. Der zeitliche Verlauf lässt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben. Liegen die Messpunkte nach Logarithmieren auf einer Geraden, spricht man von einer „Kinetik erster Ordnung“. Als Eliminationshalbwertszeit (HWZ) bezeichnet man diejenige Zeitspanne, in der die Konzentration um die Hälfte abnimmt. Zur Beschreibung des Zeitverlaufs können aber auch Summen von Exponentialfunktionen nötig sein, es lassen sich Halbwertszeiten für einzelne Phasen bestimmen (Kinetik 2. und höherer Ordnung). Als dominierende HWZ bezeichnet man diejenige Phase, die am meisten zur Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve, AUC) beiträgt, als terminale HWZ die des langsamsten Prozesses. Von einer „Kinetik nullter Ordnung“ spricht man, wenn die pro Zeiteinheit ausgeschiedene Menge eines Pharmakons konstant ist und damit unabhängig von der aktuellen Plasmakonzentration. Dies gilt beispielsweise für die Aufnahme hoher Mengen von Ethanol, bei denen die für die Elimination verantwortliche Enzymkapazität voll ausgelastet ist.

### 2.9.3 Autoradiographie

Antoine-Henri Becquerel hat 1896 die radioaktive Strahlung der Pechblende durch Schwärzung einer photographischen Platte entdeckt. Das älteste Verfahren zum Nachweis radioaktiver Strahlung, die Autoradiographie, beruht auf der Tatsache, dass diese Strahlung auf einer photographischen Emulsion dieselbe Wirkung wie Licht- und Röntgenstrahlung ausübt. Die Autoradiographie gehört zu den wichtigsten Nachweismethoden ionisierender Strahlung.

Die Methode der Ganzkörperautoradiographie, mit deren Hilfe es möglich ist, die Verteilung von radioaktiv gelabelten Substanzen in Geweben von Labortieren zu ermitteln, wurde erstmals von *Ullberg* vorgestellt. Heute ist es kaum noch vorstellbar, dass die Personen damals während der Schnittabnahme in einem auf  $-15\text{ °C}$  gekühlten Raum arbeiten mussten, um das Mikrotom zu bedienen (Ullberg 1954, 1958 und 1977). Die Technik der Schnittabnahme konnte seitdem deutlich modifiziert und verbessert werden. Sie erfolgt heute mit computergestützter Steuerung in einem Hochpräzisions-Großschnittkryomikrotom, wie es auch für diese Arbeit zur Verfügung gestanden hat.

Mit der Entwicklung der neuen Imageplatten, welche sich durch eine im Vergleich zu früher verwendeten, konventionellen Röntgenfilmen um eine etwa hundert mal höhere Sensitivität gegenüber der radioaktiven Strahlung auszeichnen, konnten die Expositionszeiten deutlich reduziert werden. Nicht mehr erforderlich ist zudem die Verwendung von Chemikalien zur Entwicklung bzw. eine Dunkelkammer. Die Platten können durch Belichtung gelöscht und wieder verwendet werden. Die erhaltenen Autoradiogramme werden digital gespeichert und verarbeitet und müssen nicht mehr in Filmarchiven gelagert werden. Die Imageplatten können mit Hilfe eines Bio-Imaging Analyzer Systems (BAS) ausgewertet werden (Mori und Hamaoka, 1994; Miyahara, 1989).

Die Platten sind mit hochdispersen Leuchtstoffkristallen, Barium-Fluorid-Halogenid  $\text{BaFX:Eu}^{2+}$  ( $X = \text{Cl, Br, I}$ ), beschichtet. Wenn eine radioaktiv markierte Probe mit der Platte in Kontakt gebracht wird, wird dessen Energie auf diesen photostimulierbaren Leuchtstoff transferiert und gespeichert. Wenn die so exponierte Imageplatte dann im Scanner durch einen Helium-Neon-Laser (rotes Licht, 633 nm) erneut angeregt wird, gibt sie die gefangenen Elektronen und Photonen als sichtbares blaues Licht (etwa 400 nm) frei. Dieser Prozess wird als photostimulierbare Lumineszenz (PSL) bezeichnet (Fujifilm Produktinformationen). Die Autoradiographie wird demnach heute auch als Autoradioluminographie bezeichnet (Kanekal et al., 1995).

Die Autoradiographie stellt in erster Linie ein qualitatives Nachweisverfahren dar. Da über einen breiten Bereich eine lineare Beziehung zwischen der Menge an Radioaktivität und der Abbildungsdichte besteht (Mori und Hamaoka, 1994), kann sie unter bestimmten Bedingungen

auch zu quantitativen Bestimmungen herangezogen werden. Umfassende Validierungen hierzu wurden weltweit im Rahmen gemeinsamer Bemühungen mehrerer pharmazeutischer Unternehmen, unter anderen auch dem Institut für Pharmakokinetik und Metabolismus der Firma Merck, durchgeführt (Steinke et al., 2000; Solon und Kraus, 2001) sowie komplexe Empfehlungen bezüglich einer Standardisierung der Methode gegeben (Maas et al., 2000; Klein et al., 2000; Solon und Lee, 2001, Shigematsu et al., 1999).

Die Autoradiographie kann unter anderem auch zur Lokalisation von Radioaktivität auf Flächen, wie beispielsweise auf Papierchromatogrammen oder Elektrophoresestreifen oder als Mikroautoradiographie in histologischen Schnitten verwendet werden.

Neben autoradiographischen Untersuchungen von Nicotin (Hansson und Schmitterlöw, 1964 und 1962, Tjälve et al., 1968) hat sich diese Methode auch zur Untersuchung tabakspezifischer Nitrosamine bereits bestens bewährt (Tjälve, 1991).

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Rahmenbedingungen

Der Versuch war von der Regierung von Oberbayern (AZ 211 2531-79/99) genehmigt. Durchführungsort des praktischen Teils dieser Arbeit sowie der qualitativen und quantitativen Auswertungen war das Institut für Pharmakokinetik und Metabolismus (PKM), 85567 Grafing der Merck KGaA, Darmstadt.

### 3.2 Material

Die folgenden Materialien wurden im Rahmen dieser Arbeit, nach Arbeitsschritten gegliedert, verwendet:

#### 3.2.1 Tierversuch

##### **Tiere:**

Spezies: Ratte  
Stämme: Fischer F344 (albinotisch)  
Long-Evans LE/Cbp Hsd (pigmentiert)  
Geschlecht: männlich  
Gewicht: 156 - 170 g  
Lieferant: HARLAN-WINKELMANN, Borcheln

##### **Tierhaltung:**

Thermohydrograph (LAMBRECHT, Göttingen)  
Polycarbonatkäfige Typ III (WOETHO, Emmendingen)  
Weichholzgranulat (ALTROMIN, Lage-Lippe)  
Standarddiät, pelletiert, SDS RM1 (E) Ratte - Haltung (ALECKWA, Waldsee)  
Tränkeflaschen mit aufgesetzten Tränkenippeln (WOETHO, Emmendingen)  
Stoffwechselkäfige aus Edelstahl, 12 x 20 x 12 cm (WOETHO, Emmendingen)

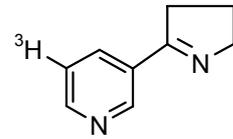
##### **Applikation:**

Zwangsrohre (Eigenbau Merck)  
Venenpunktionsbesteck Venofix<sup>®</sup> Luer Lock 25G 0,5x15 mm L:30 cm (BRAUN, Melsungen)  
Spritzen Luer 1 mL (BRAUN, Melsungen)

**Radionuklide:**

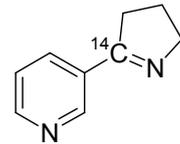
5-<sup>3</sup>H-Myosmin (HARTMANN ANALYTIK, Braunschweig)

Molekulargewicht:	146,2 mg/mmol
Spezifische Aktivität:	24 Ci/mmol
radiochemische Reinheit:	99,9%



2'-<sup>14</sup>C-Myosmin (Synthese bei MERCK)

Molekulargewicht:	148,19 mg/mmol
Spezifische Aktivität:	55,2 mCi/mmol
radiochemische Reinheit:	96,8%

**Materialien zur Synthese von <sup>14</sup>C-Myosmin:**

[Carboxyl-<sup>14</sup>C]-Nicotinsäure (HARTMANN ANALYTIK, Braunschweig)

1,1,1-Triethoxyethan (SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen)

N-Vinylpyrrolidon (MERCK, Darmstadt)

Natriumhydrid (MERCK, Darmstadt)

Toluol (MERCK, Darmstadt)

Salzsäure (MERCK, Darmstadt)

Chloroform (MERCK, Darmstadt)

Methanol (MERCK, Darmstadt)

Kieselgelsäule Isolut<sup>®</sup> SPE Columns (IST, Grenzach-Wyhlen)

HPLC-UV System (MERCK-HITACHI, Japan)

Radioaktivitätsdetektor LB 506C (BERTHOLD, Bad Wildbad)

Myosmin, inaktiv (WALTHER STRAUB-INSTITUT, München)

**Euthanasie:**

Weithals Flasche, 4L (VWR, Ismaning)

CO<sub>2</sub> (LINDE, Höllriegelskreuth)

**Einfrieren:**

Schermaschine und Scherkopf (HAUPTNER, Solingen)

Isopropylalkohol (MERCK, Darmstadt)

Trockeneis, in Scheiben geschnitten (AIR LIQUIDE, München)

Drahtkorb aus Edelstahl, 20 x 30 x 20 cm (VWR, Ismaning)

### 3.2.2 Ganzkörper-Autoradiographie

Hochpräzisions-Großschnittkryomikrotom Leica CM 3600 Cryomacrocut (LEICA, Nussloch)

Einbettrahmen, 120 x 200 mm (LEICA, Nussloch)

Objektplatten, orientierbar, 120 x 200 mm (LEICA, Nussloch)

Einmalmikrotommesser FEATHER (LEICA, Nussloch)

Schnittabnahmebänder:

Scotch Tape 810, Breite 60 mm (3M, Neuss)

Laboretiketten-Abdeckband scienceware<sup>®</sup>, Polyester, Breite 50,8 mm (BEL-ART PRODUCTS, NJ, USA)

Tapetenkleber Methylan<sup>®</sup> normal, Ansatz 1:80 (HENKEL, Düsseldorf)

Dehydratationsgestell mit Holzrahmen 250 x 400 mm (LEICA, Nussloch)

Pinsel

Baumwolltuch

Andrückstück aus Plastik

Talkum

Wundschnellverband, Spray novo, Ankerplast<sup>®</sup> (CHAUVIN ANKERPHARM, Rudolstadt)

Abdeckfolie Hostaphan, 2 µm (PÜTZ, Taunusstein-Wehen)

Radioaktive Tinte (eigene Herstellung)

Bio-Imaging Analysensystem BAS 2000 bestehend aus:

Workstation (486DX2 processor, 16 MB RAM, SVGA-Card) mit Grossbildschirm

Imageplatten-Scanner und Scansoftware BAS Reader 3.01 (FUJIFILM, Japan)

Imageplatten-Eraser BAS-IPE 2040 (FUJIFILM, Japan)

Imageplatte BAS-TR 2040 (FUJIFILM, Japan)

Imageplatten BAS-III 2040 (FUJIFILM, Japan)

Expositionskassetten BAS-Standard 2040 (FUJIFILM, Japan)

Abschirmungsbox BAS-SHB 2040 (FUJIFILM, Japan)

Scankassette BAS-IP-Magazin 2040 (FUJIFILM, Japan)

AIDA Bildanalysensoftware, Version 3.11 oder 3.22 (RAYTEST ISOTOPENMESSGERÄTE, Straubenhardt)

### 3.2.3 Extraktion

Ethanol (MERCK, Darmstadt)

Heptan (MERCK, Darmstadt)

Leitungswasser

Glasschalen, 220 x 150 x 55 mm (VWR, Ismaning)

Pinzette für Deckgläser, gebogen (VWR, Ismaning)  
Fixierplättchen aus Metall, 5 cm lang (eigene Herstellung)  
Stoppuhr (VWR, Ismaning)

### **3.2.4 Verbrennungsprouben und Flüssigszintillationspektrometrie**

Probenbecher mit Deckel, Polypropylen (VWR, Ismaning)  
Varipette, Micropipette mit kontinuierlicher Volumenwahl (EPPENDORF, Hamburg)  
Pipettenspitzen, diverse Volumen (EPPENDORF, Hamburg)  
Akucarboxymethylzellulose (MERCK, Darmstadt)  
Ultra Turrax T 25 (JANKE & KUNKEL, Staufen)  
Probenwaage AC 100 (METTLER, Giessen)  
Verbrennungskegel Combusto Cones (PACKARD-BIO SCIENCE, Dreieich)  
Heizschrank U60 (MEMMERT, Schwabach)  
Tablettenpresse (PARR INSTRUMENTS, Moline, USA)  
Verbrennungsgerät Tri-Carb 307 (PACKARD-BIO SCIENCE, Dreieich)  
Probenfläschchen LSC-Vials, Standard 20 ml (PACKARD-BIO SCIENCE, Dreieich)  
Szintillationsflüssigkeit Omni-Szintisol<sup>®</sup> (MERCK, Darmstadt)  
2-Methoxyethylamin (MERCK, Darmstadt)  
Szintillationsspektrometer Tri-Carb 2300 (PACKARD-BIO SCIENCE, Dreieich)

### **3.2.5 Herstellung der Blutstandards**

Rattenblut, ca. 7 mL  
Becherglas, 5 und 10 mL, DURAN<sup>®</sup> (SCHOTT, Mainz)  
Isofluran, Isoflo<sup>®</sup> (ESSEX TIERARZNEI, München)  
Braunüle<sup>®</sup>, Vasocan<sup>®</sup>, 18G/1 3/4", 96 ml/min (BRAUN, Melsungen)  
Na-Heparinat (SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen)  
Bohrmaschine mit 8-mm-Bohrer

### **3.2.6 Bindungskapazität in vitro**

Leica Kryostat-System CM 3050 (LEIKA, Nussloch)  
Gelatine, weiß, gepulvert (MERCK, Darmstadt)  
Kaliumchrom(III)-Sulfat (MERCK, Darmstadt)  
Aqua dest.  
Becherglas, 1 L, DURAN<sup>®</sup> (SCHOTT, Mainz)

Magnetrührer mit Heizung (Heidolph, Schwabach)

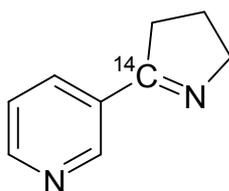
Färbegestell mit Glaskasten (MERCK, Darmstadt)

Objektträger, 26 x 76 mm (MARIENFELD, Lauda-Königshofen)

### 3.3 Methodik

#### 3.3.1 Synthese von $^{14}\text{C}$ -Myosmin

Die Durchführung der Versuche war ursprünglich mit  $^3\text{H}$ -markiertem Myosmin (HARTMANN ANALYTIK, Braunschweig) geplant. Da eine Auswertung damit erhaltener Autoradiogramme jedoch kaum möglich war (siehe 4.1.1), wurde  $^{14}\text{C}$ -Myosmin synthetisiert. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakokinetik und Metabolismus der Merck KGaA durch einen Chemiker des Walther Straub-Instituts (Tyroller et al., 2002b)



[2'- $^{14}\text{C}$ ]-3-(1-Pyrrolin-2-yl)pyridine

#### Durchführung:

~2,5 mg (~ 900  $\mu\text{Ci}$ )  $^{14}\text{C}$ -Nicotinsäure (0,02 mmol) wurden mit 7,3  $\mu\text{L}$  Triethylorthoessigsäure (0,04 mmol) in 200  $\mu\text{L}$  Toluol 16 Stunden unter Rückfluss erhitzt (130  $^{\circ}\text{C}$ ) und quantitativ zu Nicotinsäureethylester umgesetzt. Zu dem erkalteten Ansatz wurden 4  $\mu\text{L}$  *N*-Vinylpyrrolidon (0,037 mmol) in 10  $\mu\text{L}$  Toluol zugegeben. Anschließend wurden 15 mg NaH (60%ige Suspension in Paraffin, 0,39 mmol) in 150  $\mu\text{L}$  Toluol gegeben und langsam unter Gasentwicklung zugetropft. Nach zweistündigem Erhitzen unter Rückfluss (130  $^{\circ}\text{C}$ ) wurde dem erkalteten Reaktionsansatz eine Mischung aus 33  $\mu\text{L}$  rauchender HCl und 60  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  unter Rühren zugesetzt. Nach anfänglich starker Gasentwicklung wurde 15 Minuten weitergerührt, anschliessend zentrifugiert. Nach Einstellen des pH-Werts auf 4 wurde die Toluol-Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit 3 x 750  $\mu\text{L}$   $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (3/2, v/v) extrahiert. Der  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Extrakt wurde zur Trockene eingengt und mit 300  $\mu\text{L}$  rauchender HCl versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden unter Rückfluss erhitzt und nach Abkühlen auf pH 11 eingestellt. Nach Extraktion mit 3 x 750  $\mu\text{L}$   $\text{CHCl}_3$  wurde dieser Extrakt zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an einer Kieselgelkartusche (Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ; 9/1; v/v). Die Reinheitskontrolle erfolgte mittels Radio-HPLC.

### 3.3.2 Herstellung der radioaktiven Applikationslösungen

Die Herstellung der Lösungen erfolgte nach entsprechender Anforderung im Syntheselabor durch einen Mitarbeiter der Merck KGaA. Um Lösungsvorgänge beobachten zu können und spätere Probennahmen zu erleichtern, wurden zur Herstellung Klarglasgefäße genommen, die durch Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt wurden.

#### 3.3.2.1 <sup>3</sup>H-Myosmin

Anforderung		
Anzahl der Tiere:	5	
chemische Dosierung:	0,0015	mg/kg
radioaktive Dosierung:	10	MBq/kg
Applikationsvolumen	0,15	mL/100 g Tier
Gesamtvolumen:	2,25	mL
Gesamtmenge:	0,00225	mg
Gesamtaktivität:	15	MBq

Gesamtvolumen errechnen sich aus dem geschätzten Gewicht der Tiere am Applikationstag zuzüglich einer Reserve für eventuelle fehlerhafte Applikation und dem Restvolumen, welches im 30 cm langen Schlauch des Venenpunktionsbestecks nach Applikation verbleibt.

Herstellung		
Spezifische Aktivität:	6068	MBq/mg
Stammlösung:	37	MBq/mL
Zusammensetzung:	405	µL Stammlsg. (= 15 MBq)
Gelöst in:	0,9% NaCl	
Differenz zum Gesamtvolumen:	1,845	mL
Endvolumen:	2,25	mL

Zur Herstellung der Applikationslösung von  $^3\text{H}$ -Myosmin wurden demzufolge 405  $\mu\text{L}$  der Stammlösung (37 MBq/mL) entnommen und nach Überführen in ein geeignetes Gefäß mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9%) auf ein Endvolumen von 2,25 mL gebracht.

### 3.3.2.2 $^{14}\text{C}$ -Myosmin

Anforderung		
Anzahl der Tiere:	5	
chemische Dosierung:	0,26	mg/kg
radioaktive Dosierung:	3,6	MBq/kg
Applikationsvolumen	0,15	mL/100 g Tier
Gesamtvolumen:	1,67	mL
Gesamtmenge:	0,29	mg
Gesamtaktivität:	4	MBq

Herstellung		
Spezifische Aktivität:	13,75	MBq/mg
Stammlösung:	9,6	MBq/mL
Zusammensetzung:	417	$\mu\text{L}$ Stammlsg. (= 4 MBq)
Gelöst in:	0,9% NaCl	
Differenz zum Gesamtvolumen:	1,253	mL
Endvolumen:	1,67	mL

Für die Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin wurden 417  $\mu\text{L}$  der Stammlösung (9,6 MBq/mL) mit 0,9%ige NaCl-Lösung versetzt, das Endvolumen betrug 1,67 mL.

### 3.3.3 Messung des Radioaktivitätsgehalts

Nach Fertigstellen der Applikationslösung erfolgte die Messung des Radioaktivitätsgehalts durch einen Mitarbeiter der Synthese. Aus diesen Messwerten wurde über die spezifische Aktivität die Gesamtaktivität der Applikationslösung bzw. die Aktivität pro Applikationsvolumen berechnet.

### 3.3.3.1 <sup>3</sup>H-Myosmin

Messung der Applikationslösung:			
Entnommen 4 x 5 µL:	Messprobe 1	1694821	dpm
	Messprobe 2	1699789	dpm
	Messprobe 3	1703880	dpm
	Messprobe 4	1696299	dpm
	Mittelwert	1698697	dpm
Aktivität pro Applikationsvolumen:		50960917,5	dpm
	=	0,849348625	MBq
Gesamtaktivität der Lösung:		12,740	MBq
Gesamtgehalt der Lösung:		0,002	mg

### 3.3.3.2 <sup>14</sup>C-Myosmin

Messung der Applikationslösung:			
Entnommen 4 x 5 µL:	Messprobe 1	762962	dpm
	Messprobe 2	740293	dpm
	Messprobe 3	743061	dpm
	Messprobe 4	748793	dpm
	Mittelwert	748777	dpm
Aktivität pro Applikationsvolumen:		22463317,5	dpm
	=	0,374388625	MBq
Gesamtaktivität der Lösung:		4,168	MBq
Gesamtgehalt der Lösung:		0,302	mg

### 3.3.4 Kontrolle der Applikationslösung

Der Radioaktivitätsgehalt der Applikationslösung wurde unmittelbar vor der Applikation kontrolliert, um eine eventuelle Abweichung (tolerierbare Abweichung < 5%) zur ersten Messung nach Herstellung der Applikationslösung im Labor auszuschließen.

Hierzu wurden 20 mL Zählfläschchen verwendet. In diese wurden vier Aliquots zu je 5  $\mu\text{L}$  pipettiert. Für jede Pipettierung wurde eine neue Spitze verwendet. Diese wurde beim Aufziehen nur oberflächlich in die zu untersuchende Lösung eingetaucht. Beim Auslassen wurde sie unter die Oberfläche der Szintillatorlösung gebracht und durch mehrmaliges Ansaugen und Auslassen gespült. Die so hergestellten Messproben wurden im Flüssigszintillationszähler gemessen.

### 3.3.4.1 $^3\text{H}$ -Myosmin

Kontrolle der Applikationslösung:			
Entnommen 4 x 5 $\mu\text{L}$ :	Messprobe 1	1649603	dpm
	Messprobe 2	1679740	dpm
	Messprobe 3	1656421	dpm
	Messprobe 4	1669764	dpm
	Mittelwert	1663882	dpm
Aktivität pro Applikationsvolumen:		0,831941	MBq
Differenz zu Messung bei Synthese:		-2,05	%

### 3.3.4.2 $^{14}\text{C}$ -Myosmin

Kontrolle der Applikationslösung:			
Entnommen 4 x 5 $\mu\text{L}$ :	Messprobe 1	790475	dpm
	Messprobe 2	787668	dpm
	Messprobe 3	754221	dpm
	Messprobe 4	764257	dpm
	Mittelwert	774155,25	dpm
Aktivität pro Applikationsvolumen:		0,387077	MBq
Differenz zu Messung bei Synthese:		3,39	%

Da die Differenz jeweils weniger als 5% zur ersten Messung in der Synthese betrug, konnten die Ergebnisse der ersten Messung bei allen folgenden Berechnungen verwendet werden.

### **3.3.5 Tierversuch**

#### **3.3.5.1 Haltung und Ernährung der Tiere**

Die Räume, in denen die Ratten gehalten wurden, waren an eine automatische Klimaanlage angeschlossen, welche einen zehnfachen Raumluf austausch pro Stunde gewährleistete. Die Lufttemperatur lag bei 20-24 °C, die relative Luftfeuchtigkeit bei 40-60%. Die kontinuierliche Aufzeichnung erfolgte durch einen Thermohydrographen. Mittels automatischer Zeitschaltuhr wurde ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus simuliert. Die Ratten wurden in Polycarbonatkäfigen gehalten. Diese wurden mit Weichholzgranulat eingestreut, welches zweimal wöchentlich gewechselt wurde. Die Tiere wurden ad libitum mit pelletierter Standarddiät gefüttert. Die Trinkwasserversorgung erfolgte ad libitum über Tränkeflaschen mit aufgesetzten Tränkenippeln, welche mindestens dreimal wöchentlich gereinigt und gefüllt wurden. Die Gruppengröße betrug minimal zwei, maximal vier Tiere pro Käfig. Die Ratten wurden nach einer Adaptionszeit von einer Woche in den Versuch genommen.

Für die Ausscheidungsversuche wurden die Tiere (Ratte R9 und R10) nach der Applikation einzeln in Stoffwechselkäfige aus Edelstahl gesetzt und erhielten frühestens vier Stunden nach Applikation des Myosmins Futter ad libitum, um Einflüsse der Nahrungsbestandteile bei der Resorption möglichst zu vermeiden. Hierzu wurden die o. g. Futterpellets zu Pulver zermahlen und in einer mit Wasser dickbreiig angeteigten Mischung angeboten, um somit eine Kontamination der Exkretionsprodukte mit dem Futter gering zu halten.

#### **3.3.5.2 Gesundheitszustand**

Nach Anlieferung und Einstellen wurde das Allgemeinbefinden der Tiere adspektorisch geprüft. Während des Versuchs wurden die Tiere regelmäßig überwacht.

#### **3.3.5.3 Applikation und Dosierungen**

Die Applikationstechnik wurde zunächst an einer Phantom-Ratte mit Leitungswasser eingeübt, um beim Versuch eine extravasale Deposition der radioaktiv markierten Testsubstanz zu vermeiden. Zur Applikation wurden die Tiere mittels einer Zwangsröhre fixiert, wobei der Schwanz durch eine spezielle Öffnung nach Außen gebracht und, um eine Vasodilatation zu erreichen, in warmem Leitungswasser angewärmt wurde. Zur Injektion der Testsubstanz in die Schwanzvene wurden Venenpunktionsbesteck und 1 mL Spritzen verwendet. Die Substanzen wurden in folgenden Dosierungen appliziert:

**3.3.5.3.1  $^3\text{H}$ -Myosmin**

Versuch Nr.: V1 Tierstamm : Fischer F344 (albinotisch)

Tiernummer		R1
Zeit	h	0,1
Gewicht	g	165
Applikations- volumen	mL/g	0,15
	mL/Tier	0,25
chemische Dosierung	$\mu\text{g}/\text{kg}$	1,40
	$\mu\text{g}/\text{Tier}$	0,23
radioaktive Dosierung	MBq/kg	8,49
	MBq/Tier	1,40
	dpm/kg	504815400
	dpm/Tier	83294541

Die Autoradiogramme der Versuchstiere R2 bis R5 wurden nicht ausgewertet (vgl. Kapitel 4.1.1), daher wurde auf die Angaben bezüglich Dosierung dieser Ratten verzichtet.

**3.3.5.3.2  $^{14}\text{C}$ -Myosmin**

Versuch Nr.: V2 Tierstamm: LE/Cbp Hsd (pigmentiert)

Tiernummer		R6	R7	R8	R9	R10
Zeit	h	0,1	0,25	1	4	24
Gewicht	g	170,2	165,6	170,4	163,5	156,7
Applikations- volumen	mL/100g	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
	mL/Tier	0,26	0,25	0,26	0,25	0,24
chemische Dosierung	mg/kg	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
	mg/Tier	0,046	0,045	0,046	0,044	0,042
radioaktive Dosierung	MBq/kg	3,74	3,74	3,74	3,74	3,74
	MBq/Tier	0,637	0,620	0,638	0,612	0,587
	dpm/kg	22463400	22463400	22463400	22463400	22463400
	dpm/Tier	38232707	37199390	38277634	36727659	35200148

### 3.3.5.4 Euthanasie

Je ein Tier pro Versuchsgruppe wurde 0,1, 0,25, 1, 4 oder 24 Stunden nach der Applikation durch CO<sub>2</sub>-Asphyxiation getötet. Hierzu wurde ein Gefäß mit CO<sub>2</sub> vorgeflutet (~ 6 CO<sub>2</sub> : 4 O<sub>2</sub>), nach Bewusstseinsverlust des Tieres wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration auf 100% hochgefahren.

### 3.3.6 Ganzkörper-Autoradiographie

Die Autoradiographie erfolgte in Anlehnung an die von Ullberg entwickelte Methode (Ullberg, 1954, 1958 und 1977) unter Beachtung der Empfehlungen bezüglich der Möglichkeit zur quantitativen Auswertung (Maas et al., 2000; Klein et al., 2000; Solon und Lee, 2001, Shigematsu et al., 1999).

#### 3.3.6.1 Anfertigen der Schnitte

Die getöteten Ratten wurden zügig mit einer Schermaschine geschoren, in Seifenlösung abgewaschen und abgetrocknet. Danach wurden sie in Seitenlage in eine Mischung aus Isopropylalkohol und Trockeneis (ca. -75 °C) gelegt, bis sie völlig durchgefroren waren. Dann wurden Schwanz und Extremitäten abgetrennt. Zum Fixieren der Tierkörper wurde je ein Objektisch mit Metallrahmen (siehe Abb. 3-1) verwendet. In diesen Behälter, der sich zur Temperaturangleichung für 2 Stunden in einer Tiefkühltruhe befand, wurde als Einbettungsmedium eine Schicht kaltes Methylan<sup>®</sup>, ein Tapetenkleister, eingefüllt. Auf diese Schicht wurde der Tierkörper mit der linken Körperhälfte nach oben gelegt, vollständig mit Methylan<sup>®</sup> bedeckt und für mindestens 12 Stunden bei  $-20 \pm 5$  °C tiefgefroren (Abb. 3-2 zeigt eine Ratte nach Abtragen mehrerer Schichten).



Abb. 3-1: Objektisch mit Metallrahmen



Abb. 3-2: eingebettete Ratte

Nach Entfernen des Metallrahmens wurde der tiefgefrorene Block im Cryomakrocut Leica CM 3600 fixiert (siehe Abb. 3-3 und 3-4). Die Arbeitstemperatur in der Cryomakrocut-Kühlkammer betrug ca.  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Alle Einstellungen erfolgten über Maus und Tastatur der Bedieneinrichtung und wurden auf einem Bildschirm mit Windows<sup>®</sup>-Oberfläche angezeigt.



Abb. 3-3: Cryomakrocut mit Bedieneinrichtung



Abb. 3-4: Blick in die Kühlkammer

Nach dem Abtragen von nicht benötigten Körperschichten wurden in der Sagittallinie jeweils zwei Schnitte in 8 verschiedenen Ebenen der linken Körperhälfte angelegt. Die Schnittdickeneinstellung betrug  $40\text{ }\mu\text{m}$ , die Schneidgeschwindigkeit maximal  $80\text{ mm/s}$ .

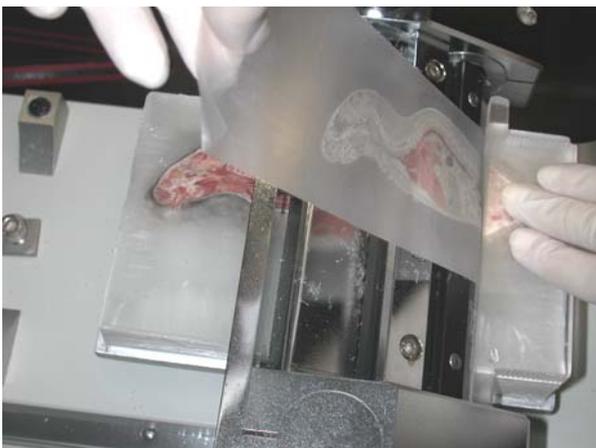


Abb. 3-5: Schnittabnahmetechnik

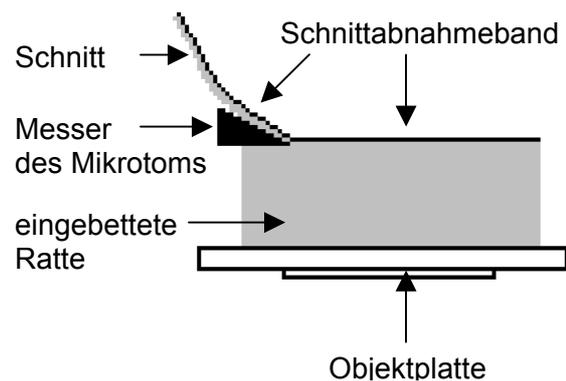


Abb. 3-6: Schema: Schnittabnahme

Der Probenblock wurde mit Hilfe des Kniehebels so positioniert, dass sich der linke Rand des Blocks direkt vor der Messerschneide befindet. Die Oberfläche des Blocks wurde mit einem gekühlten Pinsel vorsichtig gereinigt. Der auf die gewünschte Länge zugeschnittene Klebebandstreifen wurde nach kurzer Temperaturangleichung so auf den Block aufgebracht,

dass möglichst keine Luftblasen zwischen Blockoberfläche und Klebeband entstanden. Mit Hilfe eines gekühlten Baumwolltuches wurde das Band dann gleichmäßig fest aufgeklebt. Das linke Ende des Bandes wurde mit der linken Hand gehalten, mit der rechten Hand wurde ein gekühltes Andrückstück aus Plastik nahe an der Messerschneide auf den Block angedrückt. Die Schnittabnahme konnte dann mit Hilfe des Kniehebels erfolgen, wobei das Band in einem Winkel von etwa 45 Grad leicht nach links oben gezogen wurde, während der Druck mittels des Plastikstücks möglichst konstant gehalten wurde. Das Messer des Mikrotoms konnte auf diese Weise unter dem Band entlang schneiden und der Schnitt der Ratte klebte somit an dem Band fest (siehe Abb. 3-5 und 3-6).

Als Schnittabnahmebänder wurden abwechselnd entweder Scotch Tape 810 oder das lösungsmittelbeständige und somit für den Extraktionsversuch geeignete Laboretiketten-Abdeckband verwendet.

Um zu vermeiden, dass die gefrorenen Schnitte bei Raumtemperatur sofort auftauen und somit unbrauchbar wären, mussten sie in spezielle Holzrahmen geklebt und für mindestens 48 Stunden bei ca. -20 °C in der Cryomakrocut-Kühlkammer zum Dehydatisieren belassen werden. Beim  $^{14}\text{C}$ -Versuch wurden die abgenommenen Schnitte vor Dehydratisierungsbeginn mit Wundschnellverbandspray dünn eingesprüht, um das Entstehen von feinen Rissen und Abstauben der Gewebe zu verringern (nicht möglich beim  $^3\text{H}$ -Versuch aufgrund geringerer Strahlungsreichweite des Tritiums).

### 3.3.6.2 Extraktion

Eine Bestimmung der nicht extrahierbaren Radioaktivität kann Hinweise auf eine kovalente Bindung der Ausgangssubstanz oder ihrer Metaboliten an Makromoleküle geben. Ausgewählte Schnitte der Ebenen 1, 4, 7 und 8 wurden in einer Reihe polarer und unpolarer Lösungsmittel wie folgt extrahiert und dann luftgetrocknet (Brand und Brittebo, 1989; Castonguay et al., 1983b).

Ethanol 100%	2	Minuten
Heptan	0,5	Minuten
Heptan	0,5	Minuten
Ethanol 100%	1	Minute
Ethanol 50%	1	Minute
Wasser	2 x 5	Minuten

Die Extraktion konnte mittels Verwendung eines Laboretiketten-Abdeckbandes durchgeführt werden, da dieses im Gegensatz zum Standard-Autoradiographie-Abnahmeband Scotch Tape 810 lösungsmittelbeständig und zudem tiefgefriergeeignet ist und einen relativ guten Halt der Schnitte auf dem Band gewährleistet. Mit den so extrahierten Schnitten wurde dann wie mit den nicht extrahierten Schnitten verfahren.

### 3.3.6.3 Exposition und Scannen der Imageplatten

#### 3.3.6.3.1 Vorbereitungen

Um das Handling zu erleichtern und eine exakte Zuordnung der Schnitte zu gewährleisten wurden diese wie folgt zur Exposition vorbereitet:

<sup>3</sup>H: Es wurden jeweils Schnitte von vier verschiedenen Ebenen mit der Schnittfläche nach oben auf ein Blatt in Größe der Expositionskassette aufgeklebt und mit radioaktiver Tinte beschriftet. Um ein Anhaften der Schnitte an die Imageplatte zu verringern, wurden die Schnitte dann mit Talkum bestäubt.

<sup>14</sup>C: Die Schnitte wurden mit der Schnittfläche auf eine 2 µm dünne Folie gelegt. Diese ist für <sup>14</sup>C-markierte Substanzen dünn genug, um die Strahlung nicht wesentlich zu absorbieren und verhindert ein Anhaften der Schnitte an den Imageplatten. Um eine spätere quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurden zusätzlich jeweils zwei Blutstandardstreifen mit aufgelegt.

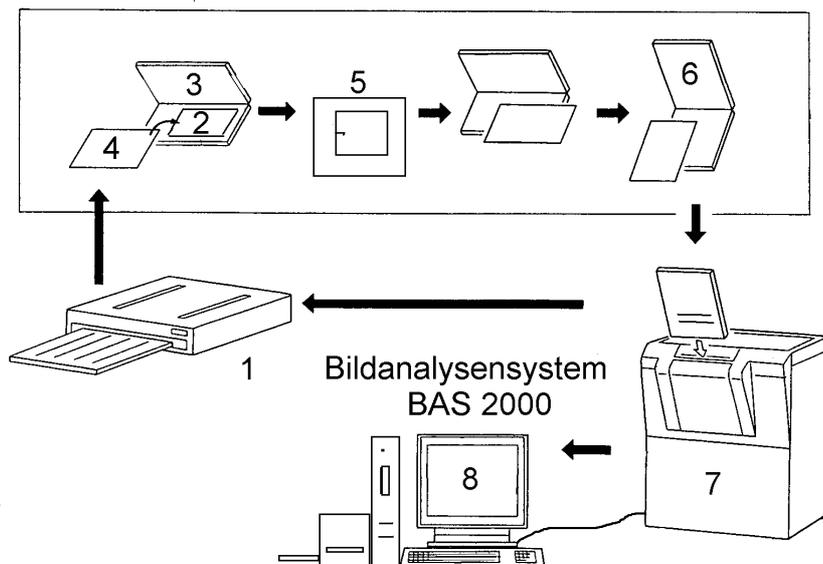


Abb. 3-7: Schematische Darstellung zur Vorgehensweise bei Exposition und Scannen der Schnitte (nach Mori und Hamaoka, 1994)

Vor jeder Benutzung wurden die Imageplatten eine Stunde im Eraser BAS-IPE 2040 (siehe Abb. 3-7: Nr.1) gelöscht. Der Scanner wurde jeweils eine halbe Stunde vor dem Scanvorgang zum Warmlaufen eingeschaltet.

### 3.3.6.3.2 **Exposition**

In einem abgedunkelten Raum wurden die zur Exposition vorbereiteten Schnitte (Abb. 3-7: Nr. 2) in spezielle Expositionskassetten (3-7: Nr. 3) gelegt. Die Schnitte wurden hierbei waagrecht zur Scanrichtung aufgelegt. Als Imageplatten (Abb. 3-7: Nr. 4) wurden für die  $^3\text{H}$ -Schnitte eine BAS-TR 2040 Platte benutzt, für  $^{14}\text{C}$ -Schnitte BAS-III 2040 Platten (FUJIFILM, Japan).

Die Imageplatte wurde dann so aufgelegt, dass die Beschichtungsseite der Imageplatte entweder direkt mit der talkumbestäubten Schnittfläche der Ratten (bei  $^3\text{H}$ ) oder aber mit der dünnen Abdeckfolie (bei  $^{14}\text{C}$ ) in Kontakt trat. Durch Verwendung einer speziellen Expositionskassette konnte ein einheitlicher Kontakt zwischen Imageplatte und aufgetragenen Schnitten sichergestellt werden.

Die Proben befanden sich zur Exposition also in folgender Schichtung in der Kassette:

Expositionskassette	
Imageplatte	Trägerschicht Photo-stimulierbare Leuchtstoffschicht Schutzschicht (bei BAS III Platte)
Talkum (oder Sprühkleber und Abdeckfolie)	
Probenmaterial	Rattenschnittfläche Schnittabnahmeband
Papier	
Expositionskassette	

Die verschlossene Kassette wurde zur Exposition für 48 Stunden (bei  $^3\text{H}$ ) bzw. 24 Stunden (bei  $^{14}\text{C}$ ) in eine spezielle Abschirmungsbox (Abb. 3-7: Nr. 5) gelegt, welche mit Schichten aus extrem strahlungsarmen Blei und sauerstoff-freiem Kupfer ausgekleidet ist. Mit Hilfe dieser Box kann die Hintergrundstrahlung aus der Umwelt stark reduziert und somit die Sensitivität der Imageplatten weiter erhöht werden.

### 3.3.6.3.3 **Scanvorgang**

Die Imageplatten wurden nach Ende der Expositionszeit aus der Expositionskassette entnommen und in eine spezielle Scan-Kassette (Abb. 3-7: Nr. 6) eingelegt und mit dieser unverzüglich in den bereits warmgelaufenen Scanner (Abb. 3-7: Nr. 7) eingeschoben. Am PC Bildschirm (Abb. 3-7: Nr. 8) wurde der BAS Reader 3.01 aufgerufen und mit folgenden Parametereinstellungen gescannt:

---

Latitude:	4
Pixel size:	100 $\mu\text{m}$
IP Type:	20 x 40 cm
Sensitivity:	10 000
Bits per pixel:	10

Die für die  $^{14}\text{C}$ -Versuche verwendeten Imageplatten können schließlich am Eraser wieder gelöscht und somit erneut verwendet werden. (Abb. 3.7: Nr. 1). Bei den Imageplatten für  $^3\text{H}$  ist dies nur in begrenztem Umfang möglich.

### 3.3.7 Qualitative Auswertung

Bei der Darstellung der Autoradiogramme am Computerbildschirm wurde vorwiegend die Farbpalette „Rainbow Colors“ gewählt. Hier erscheinen intensive Bildpunkte rot bis gelb, schwache Bildpunkte erscheinen grün bis blau, Bildpunkte mit Grauwert Null erscheinen weiß. Alternativ dazu ist eine Darstellung in Graustufen möglich, bei der intensive Bildpunkte schwarz bis dunkelgrau, schwache Bildpunkte weiß bis hellgrau erschienen.

Der Kontrast des jeweiligen Autoradiogramms lässt sich mit Hilfe des Dialogfensters „Display control“ einstellen. An einem Farbbalken wird die aktuelle Farbpalette und ihre Umsetzung auf die Graustufen der Bildinformation dargestellt, wobei „full range“ den größtmöglichen Grauwert-Bereich beschreibt. Die Grenzen der Palette lassen sich beliebig variieren.

Abhängig von der jeweils vorhandenen Radioaktivitätskonzentration stellen sich auch die einzelnen Gewebe der Ratten auf den Autoradiogrammen in verschiedenen Farben bzw. Graustufen dar. Im Vergleich zur farblichen Darstellung der benachbarten Gewebe ließen sich somit diejenigen Bereiche ermitteln, in denen eine Anreicherung von Radioaktivität stattfand.

Die radioaktiv markierten Gewebe wurden am Computerbildschirm visuell erfasst und mit dem Originalschnitt verglichen und identifiziert. Der zur Verfügung gestandene hochauflösende Bildschirmmonitor erleichterte die Auswertung erheblich, mit Hilfe der Auswertungssoftware konnten zudem Ausschnitte stark vergrößert werden. Um die anatomische Zuordnung zu erleichtern, konnten die Autoradiogramme außerdem in Originalgröße auf durchsichtige Folie gedruckt werden. Diese Ausdrücke wurden direkt auf den Originalschnitt gelegt und mit diesem verglichen.

Die so identifizierten Organe und Gewebe konnten mit Hilfe der Auswertungssoftware Aida beschriftet und als Bitmap-Datei exportiert werden. Für die Abbildungen der Autoradio-

gramme in der Doktorarbeit wurde eine einheitliche Darstellung von Ebenen bzw. Ausschnittsvergrößerungen gewählt, welche es dem Leser erleichtern soll, diese miteinander zu vergleichen. Falls nicht anders erwähnt wurde eine Kontrastbreite von 300 bis 900 gewählt.

### **3.3.8 Quantitative Auswertung**

Es wurden nur die Autoradiogramme des  $^{14}\text{C}$ -Versuchs quantitativ ausgewertet.

#### **3.3.8.1 Herstellung der Blutstandards**

Die Konzentration der Radioaktivität kann für die meisten Organe im direkten Vergleich zu radioaktiven Standards quantifiziert werden. Für die  $^{14}\text{C}$ -Versuche wurden daher solche Standards hergestellt und geschnitten und diese jeweils parallel zu den Schnitten exponiert.

Um den experimentellen Bedingungen der Ganzkörperschnitte möglichst nahe zu kommen, wurden anstelle der kommerziell erhältlichen Standardstreifen eigens hergestellte Blutstandards aus Rattenblut verwendet. Blut besitzt eine, verglichen mit anderen Organen und Geweben, mittlere Selbstabsorption an Radioaktivität und erscheint damit als repräsentativ (Steinke et al., 2000, Klein et al., 2000).

Eine Ratte wurde hierzu in Inhalationsnarkose laparotomiert und über die Aorta abdominalis entblutet. Das gewonnene Blut wurde in einem Becherglas aufgefangen, in der als Anticoagulans Na-Heparinat vorgelegt wurde. Mit diesem Blut wurde eine Verdünnungsreihe mit einer radioaktiven Lösung hergestellt. Hierzu kann eine beliebige Lösung des gleichen Radionuklids verwendet werden.

Um die tatsächliche Radioaktivitätskonzentration je Standard zu ermitteln, wurden von jeder so hergestellten Verdünnung eine Probe gezogen, gewogen und diese nach Verbrennung mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen.

In einen auf einen Objektträger aufgefrorenen Block aus Tapetenkleister wurden mit einem 8-mm Bohrer zehn Löcher gebohrt, die vorbereiteten Standards eingefüllt und tiefgefroren. Das Schneiden und Gefriertrocknen der Standards erfolgte dann unter den gleichen Bedingungen wie bei der Ganzkörperautoradiographie. Pro Imageplatte wurden je zwei Blutstandard-Streifen zusammen mit den Rattenschnitten exponiert um Zeitunterschiede und Umwelteinflüsse bei der Exposition auszugleichen.

Mit den Messprobenergebnissen obiger Proben konnte eine Umrechnung in die äquivalente Menge (ng/g) Myosmin erfolgen. Die Werte befinden sich in der Tabelle A2 im Anhang.

### 3.3.8.2 Verwendung der Kalibrierungsfunktion

Das Kalibrieren der Eichkurve erfolgte mit Hilfe der Auswertungssoftware Aida 3.11 bzw. 3.12.

Hierzu wurden für jede einzelne eingescannte Imageplatte zunächst die Regionen der Blutstandards sowie Hintergrundregionen erfasst und dann eine Eichfunktion bestimmt, mit Hilfe derer die automatische Umrechnung aller gemessenen Intensitäten erfolgte.

Bei der Messung radioaktiver Intensitäten ist es unvermeidlich, dass eine geringe Hintergrundaktivität auf den Platten auch an Stellen gemessen wird, auf denen keine Probe aufgelegt wurde und die eigentlich keine Aktivität enthalten sollten. Dies ist auf die natürliche Radioaktivität oder Kontaminationen der Platten zurückzuführen. Bei Regionen mit schwachen Intensitäten trägt der Untergrund oft wesentlich zum gemessenen Inhalt bei und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden. Kontaminationen der Platten können, wenn sie permanent sind, durch Scannen der leeren Platte 24 Stunden nach dem Löschen im Eraser überprüft werden.

Mittels definierter Untergrundregionen (pro Imageplatte acht Messungen je 589 mm<sup>3</sup>) konnte die Untergrundkorrektur vom Auswerteprogramm automatisch vorgenommen werden. Die untere Grenze, bei der die Proben noch quantifiziert werden konnten bzw. bei der ein über der Hintergrundaktivität liegendes Signal noch zu visualisieren war, lag bei 3792 dpm/g bzw. 4,56 ng/g.

Die Eichkurve wurde durch eine logarithmisch gewichtete Regression aus den Daten der Eichregionen bestimmt. Die Qualität der Eichkurve war im jeweils zugehörigen „Region Calibration Report“ zu kontrollieren. Abweichungen zwischen der Sollwert-Spalte „Std. Conc. [ng/g]“ und der Spalte „Recalc. Conc. [ng/g]“, welche die nach der Eichfunktion neu berechneten Werte enthält, sollten dabei möglichst gering sein. Das Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup> lag zwischen 0,9999 und 0,9985.

In der Tabelle A3 im Anhang findet sich ein Beispiel einer Datentabelle, mit der unter Verwendung der Software Aida die Kalibrierung einer Eichkurve durchgeführt wurde.

### 3.3.8.3 Auswerten der Regionen

Mit Hilfe der Menüoption „Regions“ wurden interessante Bereiche des Autoradiogramms markiert, benannt und die darin automatisch aufgezeichnete Intensität gemessen.

Die innerhalb der Region gemessene Intensität, der Flächeninhalt der Region und alle weiteren für die Auswertung wichtigen Informationen werden im Reportfenster „Region Report“ in

Tabellenform angezeigt. Ein Beispiel für einen solchen „Region Report“ zeigt Tabelle A3 im Anhang.

#### **3.3.8.4 Berechnung der gewichteten rekalkulierten Konzentrationen**

Wie bereits unter 3.3.6.3.1 erwähnt, war es aus Platzgründen nicht möglich, alle acht geschnittenen Ebenen gemeinsam auf einer Imageplatte zu exponieren. Folglich bezogen sich die im Aida erhaltenen „Region Reports“ immer nur auf jeweils vier Ebenen (Ebene 1 bis 4 oder 5 bis 8) einer Ratte. Die Wichtung der im Aida erhaltenen rekalkulierten Konzentration erfolgte unter Bezug auf die Flächeninhalte der Regionen nach folgender Formel :

$$\text{gewichtete rekalkulierte Konzentration [ng/g]} = \frac{\text{Area [mm}^2\text{]} * \text{Rekalk. Konz. [ng/g]}}{\text{Summe Area [mm}^2\text{]}}$$

Anschließend wurden die Einzelwerte der Regionen aufsummiert um die gewichtete Konzentration (entsprechend dem gewichteten Mittelwert) je Organ zu erhalten. Die Daten wurden hierzu im ASCII-Format in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Office 2000<sup>®</sup>, Microsoft Corporation, Redmond, USA) exportiert, dort zusammengefasst und berechnet.

Als Beispiel sind in Tabelle A5 im Anhang der Rechenweg sowie die dadurch erhaltenen Ergebnisse aus der Zusammenführung der Ebenen 1 bis 4 mit den Ebenen 5 bis 8 der akzessorischen Geschlechtsdrüsen der Ratte R6 dargestellt. Ebenso wurde mit allen anderen Organen bzw. Schnitten verfahren. Eine Darstellung aller Tabellen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Daher wurden nur die Ergebnisse sämtlicher Berechnungen je Zeitpunkt zusammengefasst und im Anhang (Tabellen A6 bis A10) abgedruckt.

#### **3.3.8.5 Berechnung zur Zeitabhängigkeit**

Für Abbildungen und Berechnungen zur Zeitabhängigkeit wurde das Programm GraphPad Prism 3.0<sup>®</sup> (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) verwendet.

Die vorliegenden Daten können nur deskriptiv hinsichtlich der Konzentrationsverteilung in den Geweben, der Zeitabhängigkeit und des gebundenen Anteils dargestellt werden. Konfirmatorische (statistische) Berechnungen und somit Signifikanzberechnungen sind wegen der Einzelfallbetrachtung nicht möglich.

Die Analyse der Messergebnisse zur Berechnung der Halbwertszeit erfolgte mittels monophasischer Exponentialfunktion (nichtlineare Regression auf Basis des natürlichen Logarithmus), als Anpassungsmöglichkeit für die Berechnung wurde bei Bedarf nach  $1/Y$  gewichtet.

### 3.3.9 Messung Restradioaktivität im Schwanz

Um auszuschließen, dass die Applikation versehentlich paravenös erfolgte, wurden die vom Rattenkörper abgetrennten Schwänze in ca. 2 g schwere Stücke geschnitten, in Verbrennungskegel gelegt und 12 Stunden bei 60 °C im Heizschrank getrocknet. Die Kegel wurden über der Probe gefaltet und dann mit einer Tablettenpresse gepresst und im Verbrennungsgerät Tri-Carb 307 (Packard, Frankfurt) in einer glühenden Platinspirale zu  $\text{CO}_2$  und Wasser verbrannt. Dieses Gerät verarbeitet die Proben automatisch, als Brenngas dient reiner Sauerstoff. Die Restradioaktivität im  $^{14}\text{CO}_2$  (abgefangen in Methoxyethylamin) bzw. im  $^3\text{H}_2\text{O}$  wurde nach Zusatz von Szintillationsflüssigkeit im Szintillationsspektrometer Tri-Carb 2300 (Packard, Frankfurt) gezählt.

Zusammensetzung der Verbrennungproben:

$^3\text{H}$ -Proben:	15 ml	Omni-Szintisol <sup>®</sup>
$^{14}\text{C}$ -Proben:	13 ml	Omni-Szintisol <sup>®</sup>
	7 ml	2-Methoxymethylamin

Bei der Flüssigkeitsszintillationsmessung werden von den Beta-Elektronen im Szintillationscocktail Lichtblitze erzeugt, die von einem Photomultiplier registriert und gezählt werden. Bei Zugabe der Probe wird der Energieübertrag gestört, die zugegebene Fremdschubstanz wirkt als Quencher („Löschher“). Gemessen werden somit die Impulse pro Minute (ipm). Durch Bestimmung der Quenchung eines externen Standards und mit Hilfe einer Eichkurve werden die tatsächlichen Zerfälle pro Minute (dpm) vom Zähler automatisch errechnet und ausgedruckt bzw. gespeichert.

### 3.3.10 Ausscheidung mit Urin und Faezes im Stoffwechselkäfig

Für die Ausscheidungsversuche wurden die Tiere, wie bereits oben beschrieben, in Stoffwechselkäfigen gehalten, welche eine getrennte quantitative Sammlung von Urin und Faezes erlaubten.

Urin wurde in den Intervallen 0-4 Stunden bzw. 4-24 Stunden nach Applikation gesammelt, eine Faezesprobe nur im Intervall 0-24 Stunden. Um in den Käfigen eventuell noch verblie-

bene Radioaktivität zu erfassen, wurden diese nach Beendigung des Versuches mit Wasser ausgespült und dieses ebenfalls zur Messung gesammelt.

Die Faezesproben wurden nach Zugabe von Akucarboxymethylzellulose als Bindemittel homogenisiert und davon Dreifachproben zu je 1 g in Verbrennungskegel abgewogen. Diese Proben wurden 12 Stunden bei 60 °C im Heizschrank getrocknet, mit einer Tablettenpresse gepresst und dann wie unter 3.3.9 beschrieben verbrannt und die aufgefangene Radioaktivität gezählt.

Mit einer Eppendorf-Pipette wurden je 3 Aliquots der Urinproben (100 oder 200 µL) bzw. dem Waschwasser (200 µL) in Zählfläschchen pipettiert, in denen je 10 mL Szintillationsflüssigkeit vorgelegt war. Sie konnten dann im Flüssigkeitsszintillationszähler Tri-Carb 2300 gezählt werden.

### **3.3.11 Messung der Radioaktivität in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen**

Da es aufgrund der anatomischen Lage der akzessorischen Geschlechtsdrüsen leicht zu einer Verwechslung mit benachbarten Geweben kommen kann, wurden diese aus der noch vorhandenen rechten Körperhälfte nach kurzem Antauen entnommen, gewogen und nach Verbrennung mittels Direktbestimmung gemessen und diese Ergebnisse mit denen der Autoradiographie verglichen.

### **3.3.12 Bestimmung der in vitro Bindungskapazität mittels Autoradiographie**

Um das Anhaften der geschnittenen Organe auf den Objektträgern zu verbessern, wurden diese mit Chromalaungelatine beschichtet. Hierzu wurde 5 g Gelatine in 1 L Aqua dest. bei 40 °C unter Rühren gelöst (die Lösung muss klar sein). Nach dem Erkalten wurden 0,5 g  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$  zugegeben. Die Objektträger wurden ca. 5 Minuten bei Zimmertemperatur in diese Lösung eingetaucht und dann luftgetrocknet.

Eine unbehandelte Wistar-Ratte wurde durch Inhalation von Isofluran betäubt und nach Laparotomie über die Aorta abdominalis entblutet. Der Ösophagus wurde entnommen und auf Objektische im Leica Kryostat-System CM 3050 mit Tapetenkleister bei -20 °C aufgefroren. Nach dem vollständigen Durchfrieren wurden mehrere 10 µm dünne Querschnitte mittels eines Streckblättchen am Kryotommesser gestreckt und auf warme Objektträger abgenommen, wodurch sie augenblicklich auf deren Chromalaungelatineschicht anhafteten. Die Objektträger wurden bei Zimmertemperatur eine Woche getrocknet.

Zusätzlich wurde ein bereits vorhandener, ebenso hergestellter Objektträger mit darauf aufgebrauchten Schnitten des Auges einer Long-Evans Ratte (pigmentiert) verwendet.

In einer Tauchlösung aus isotonischer Kochsalzlösung und  $^{14}\text{C}$ -Myosmin (0,29 mg/L; 4 MBq/L) wurden die Schnitte für eine Stunde inkubiert, anschließend für ca. 30 Min. in 200 mL isotonischer Kochsalzlösung eingestellt und dann mit Aqua dest. gespült und schließlich bei Zimmertemperatur getrocknet.

Exposition, Scannen und Auswertung erfolgten nach der unter Ganzkörper-Autoradiographie (Kapitel 3.3.6) beschriebenen Methode.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Qualitative Auswertung

#### 4.1.1 Vorbemerkungen

Wie bereits beschrieben, müssen bei der Verwendung von tritiummarkierten Substanzen die Schnitte aufgrund der geringen Eindringtiefe der  $\beta$ -Strahlung von Tritium direkt, d.h. ohne eine Schutzschicht, auf die Imageplatten gelegt werden. Durch nicht abwaschbare, anhaftende oder in die oberste Schicht der Platte eingedrungene Gewebereste kam es zu dauerhaften Kontaminationen, die eine Auswertung weiterer Schnitte erschwerten. Aus diesem Grund wird im Folgenden nur die Auswertung des  $^3\text{H}$ -Versuchs der sechs Minuten nach Applikation untersuchten Ratte dargestellt. Im  $^{14}\text{C}$ -Versuch konnten alle erhaltenen Autoradiogramme ausgewertet werden.

Die Abbildungen 4-1 bis 4-3 zeigen zunächst Photographien von drei Schnitten der Ratte R6, aus den Ebenen 1, 4 und 7, welche direkt mit den ihnen entsprechenden Autoradiogrammen (Abbildungen 4-7 bis 4-9) verglichen werden können.

In den darauf folgenden Abbildungen 4-4 bis 4-25 sind als Beispiel für die je Zeitpunkt erhaltenen Ganzkörper-Autoradiogramme jeweils die Ebenen 1, 4 und 7 abgebildet, sowie je ein Autoradiogramm eines extrahierten Schnittes, welcher der zugehörigen Ebene 7 entspricht. Dies soll dem Leser dieser Arbeit einen repräsentativen Überblick über die Verteilung des Myosmins gewähren. Wie bereits erwähnt wurden jedoch pro Tier jeweils acht Ebenen geschnitten und ausgewertet. Diverse Ausschnittvergrößerungen einzelner Organe sind im Teil 4.2 wiedergegeben.

Die abgedruckten Autoradiogramme des Versuchs mit  $^3\text{H}$ -Myosmin (Abb. 4-4 bis 4-6) zeigen deren deutlich schlechtere Qualität im Vergleich zu den Autoradiogrammen der  $^{14}\text{C}$ -Versuche. Wegen der geringeren Intensität werden die Autoradiogramme des Tritiumversuch mit einer Kontrastbreite von 115-900 abgebildet. Der Leser sollte deshalb diese Autoradiogramme nicht „farblich“ mit denen des  $^{14}\text{C}$ -Versuchs vergleichen, sondern nur die relativen Intensitäten in den verschiedenen Geweben beachten.

**Photographien der Ratte R6**



*Abb. 4-1: Ratte R6, Ebene 1*



*Abb. 4-2: Ratte R6, Ebene 4*



Abb. 4-3: Ratte R6, Ebene 7

**0,1 Stunden nach Applikation von  $^3\text{H}$ -Myosmin (1,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 8,5 MBq/kg)**

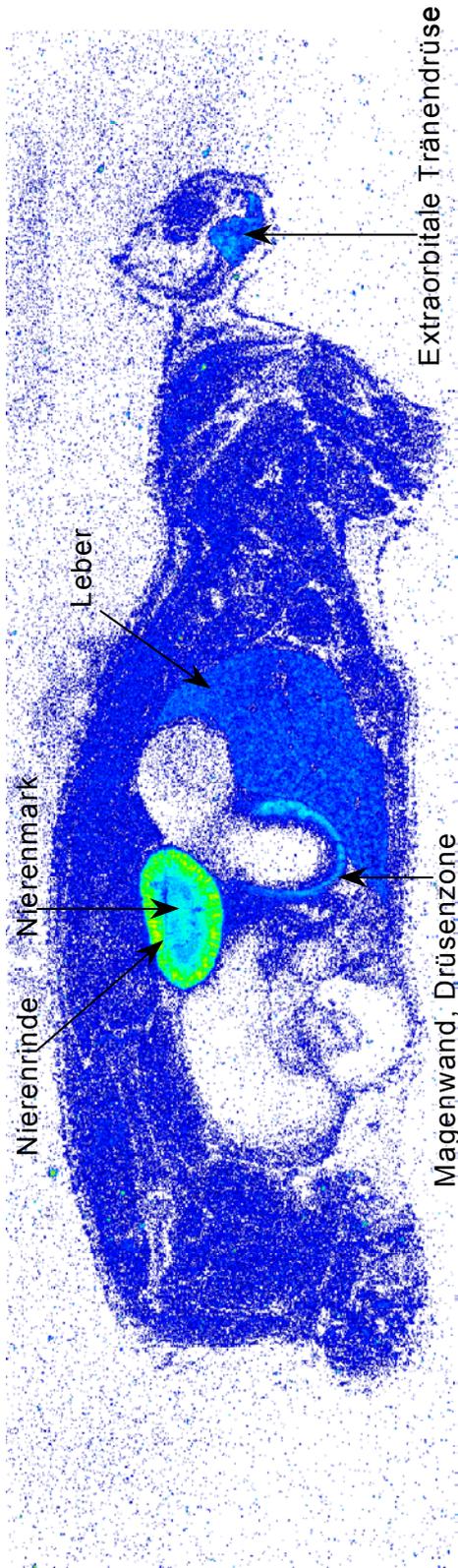


Abb. 4-4: Ratte R1, Ebene 1

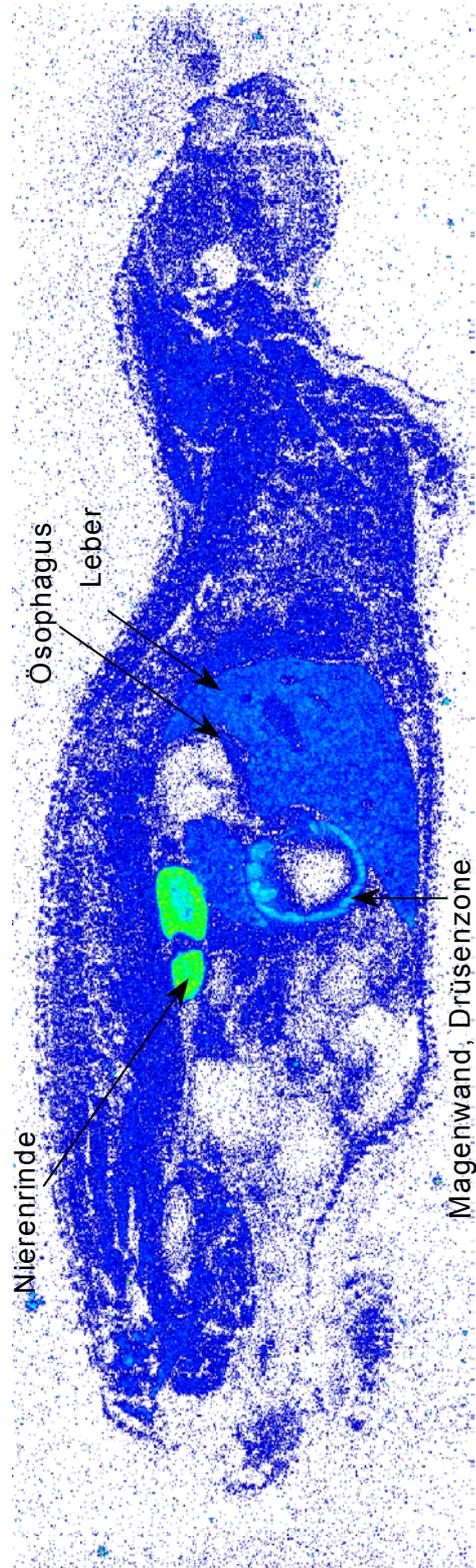


Abb. 4-5: Ratte R1, Ebene 4

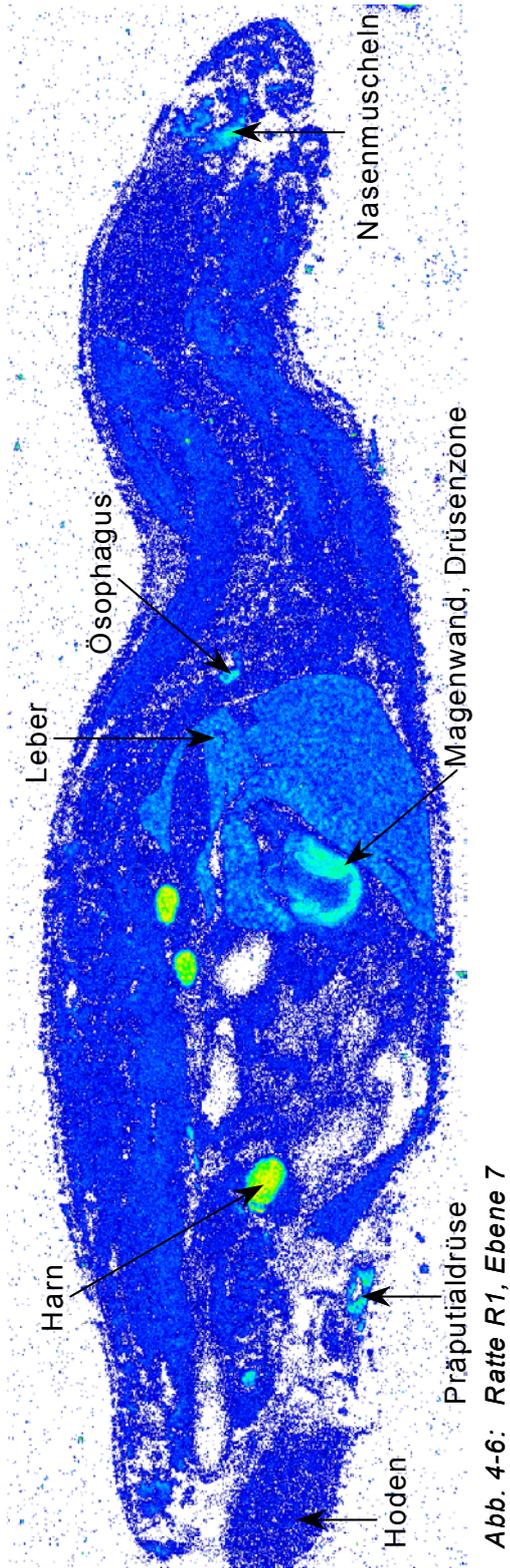
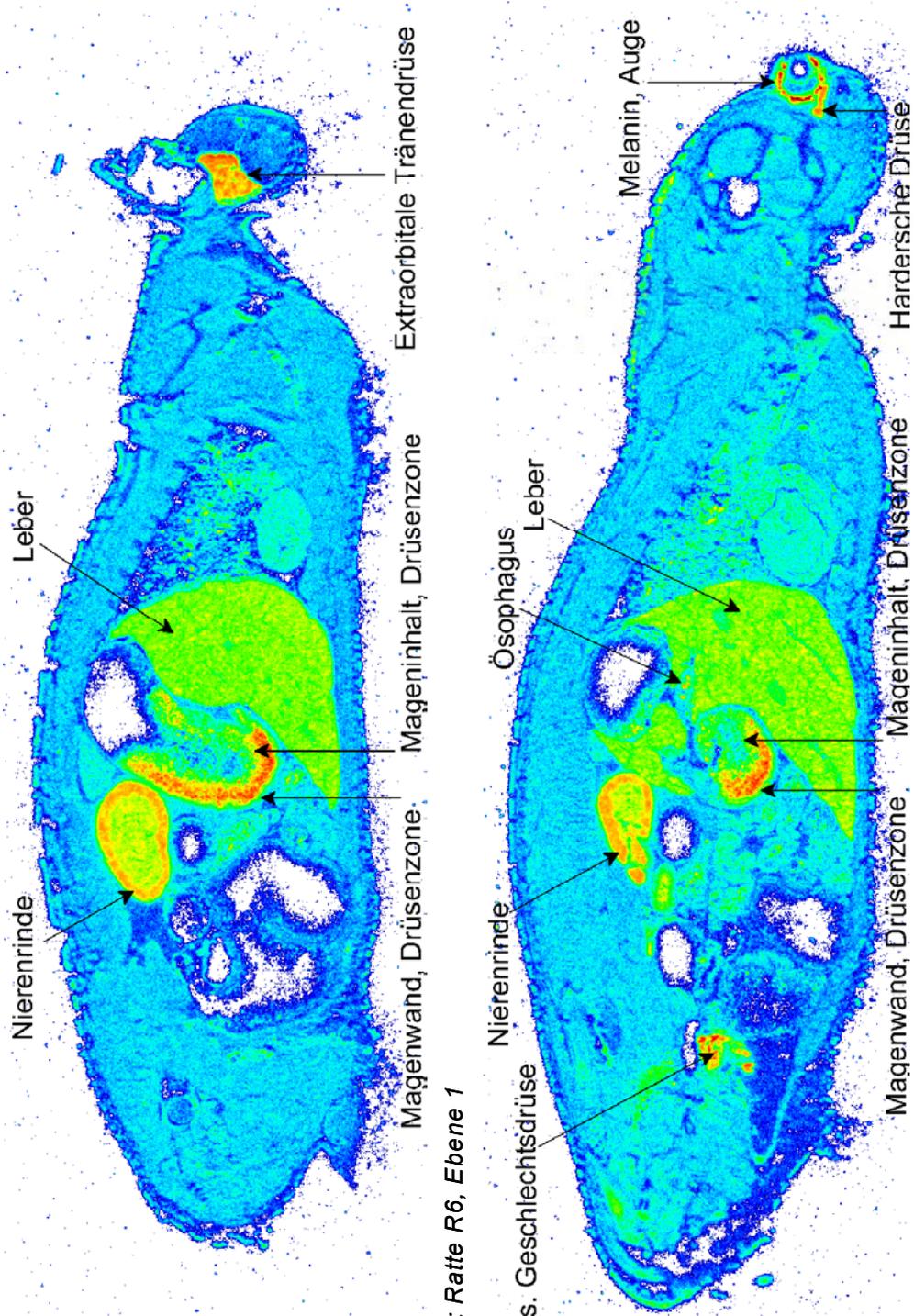


Abb. 4-6: Ratte R1, Ebene 7

ohne Abbildung: Ratte R1, Ebene 7, extrahiert, da nahezu ohne Markierung

**0,1 Stunden nach Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg)**



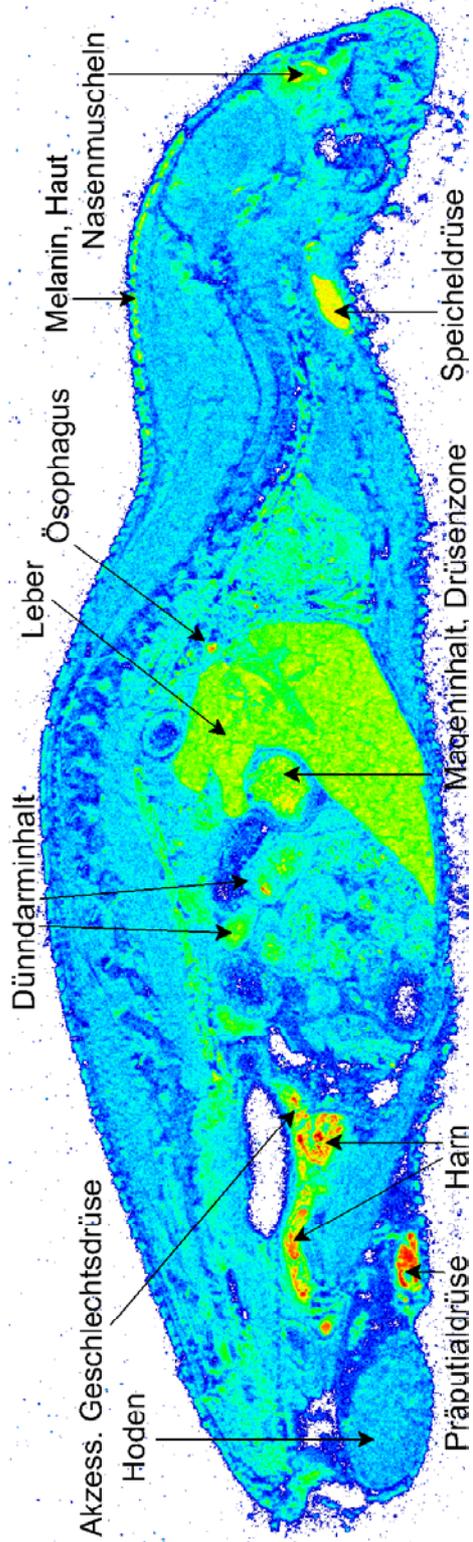


Abb. 4-9: Ratte R6, Ebene 7

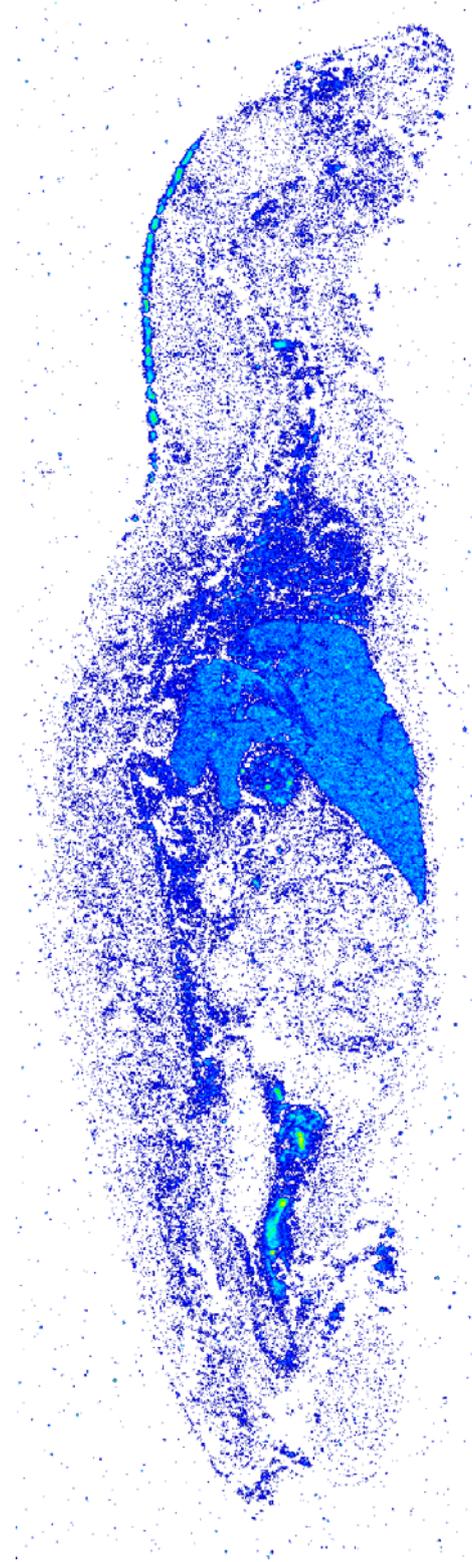


Abb. 4-10: Ratte R6, Ebene 7, extrahiert

**0,25 Stunden nach Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg)**

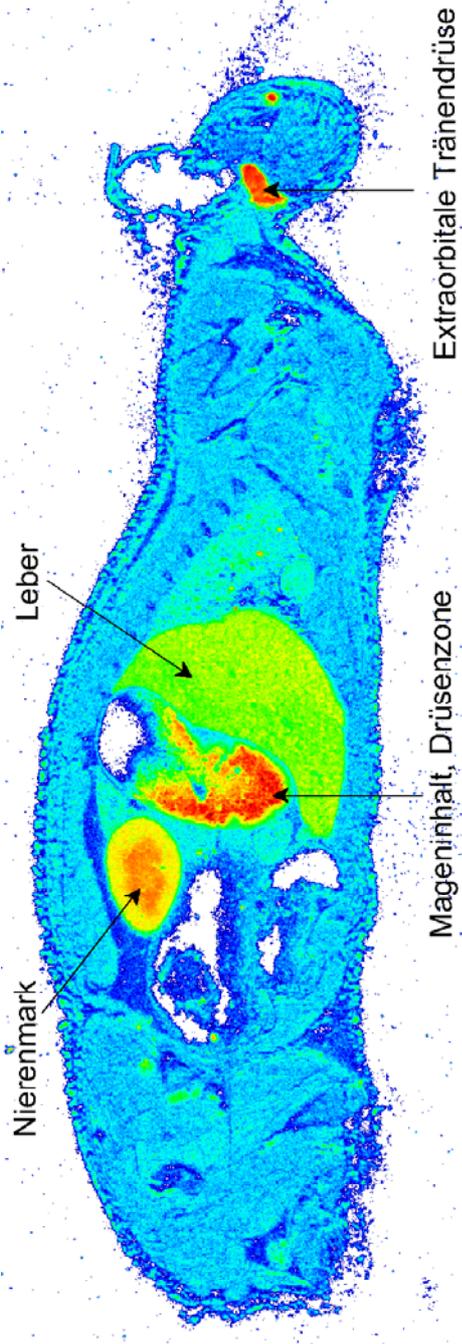


Abb. 4-11: Ratte R7, Ebene 1

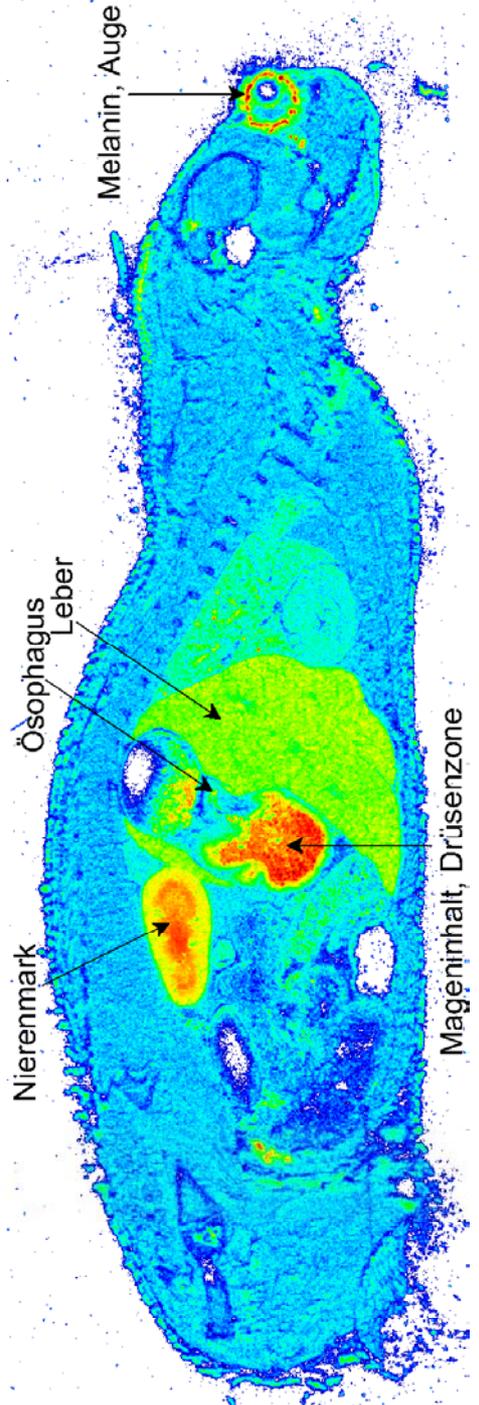


Abb. 4-12: Ratte R7, Ebene 4

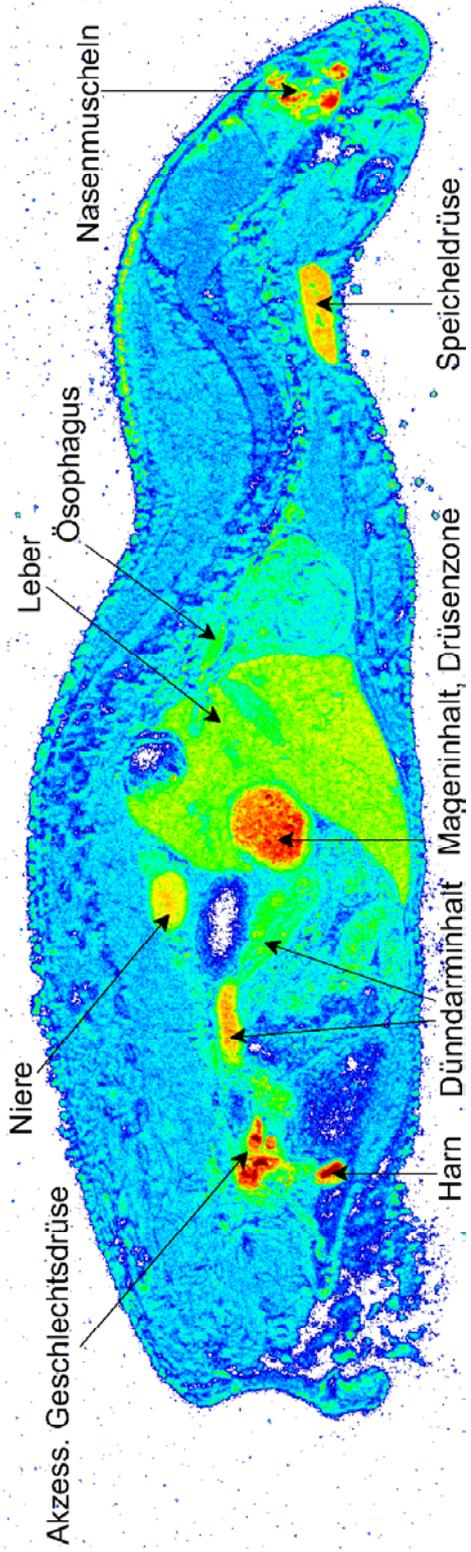


Abb. 4-13: Ratte R7, Ebene 7

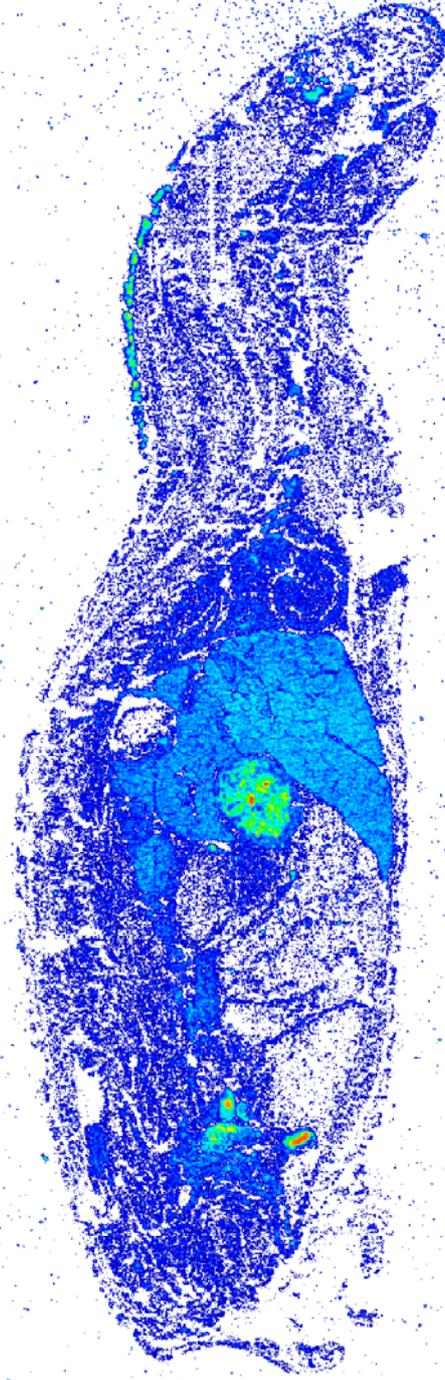


Abb. 4-14: Ratte R7, Ebene 7, extrahiert

**1 Stunde nach Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg)**

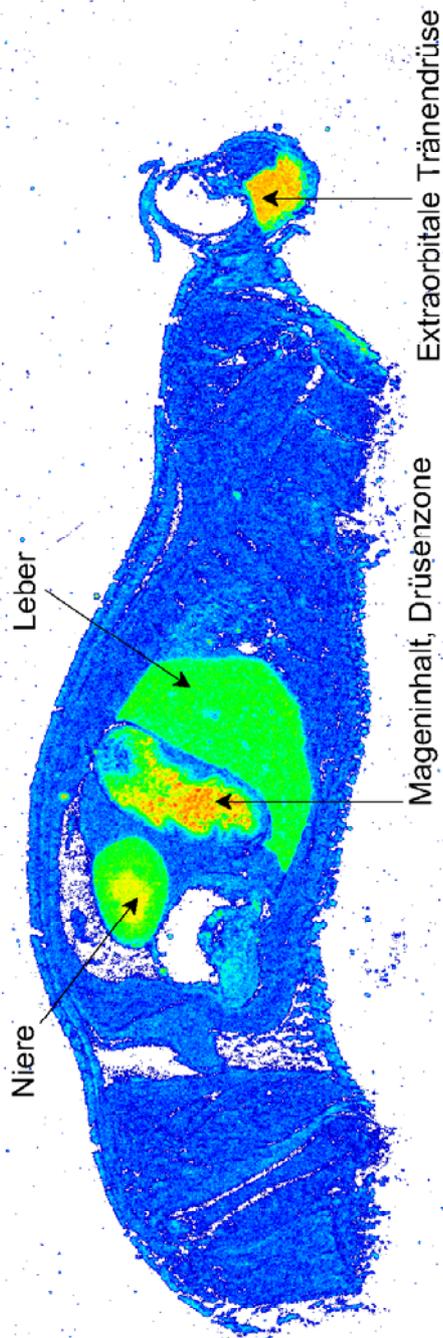


Abb. 4-15: Ratte R8, Ebene 1

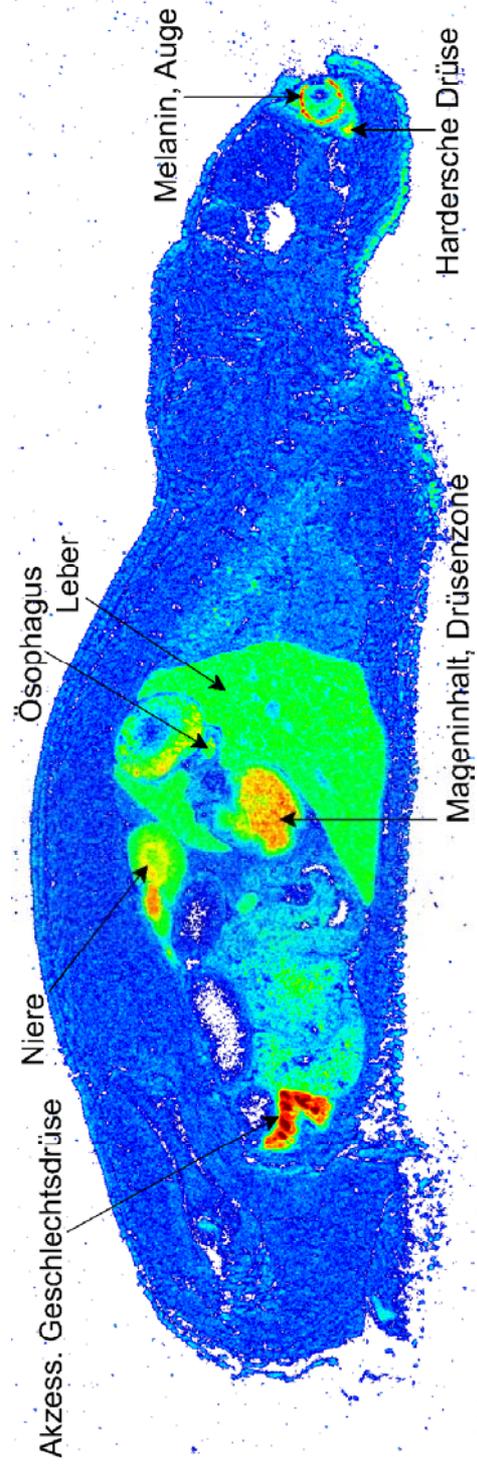


Abb. 4-16: Ratte R8, Ebene 4

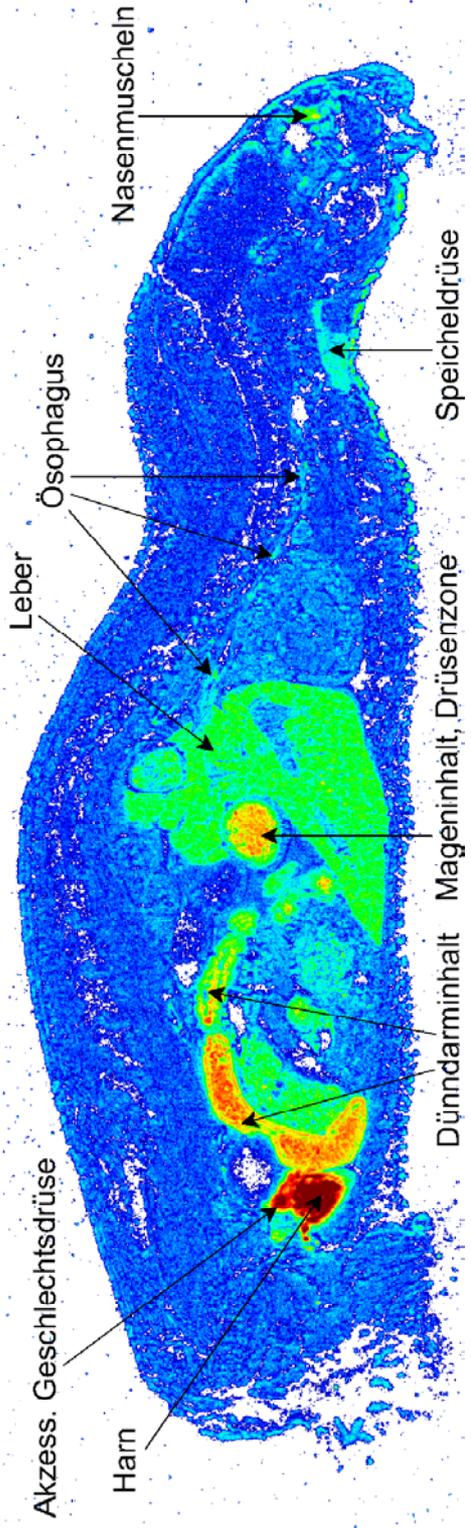


Abb. 4-17: Ratte R8, Ebene 7

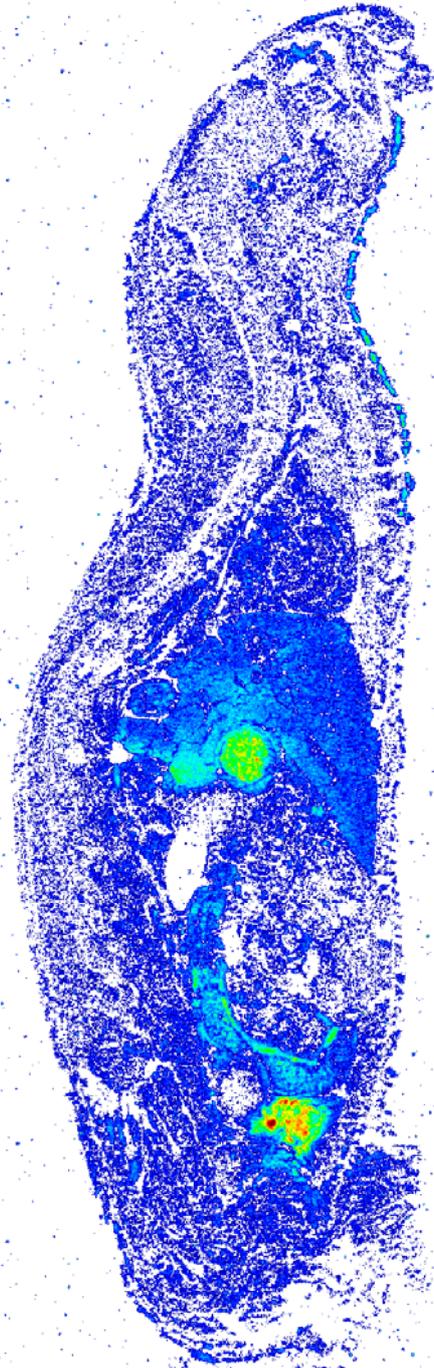


Abb. 4-18: Ratte R8, Ebene 7, extrahiert

**4 Stunden nach Applikation von <sup>14</sup>C-Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg)**

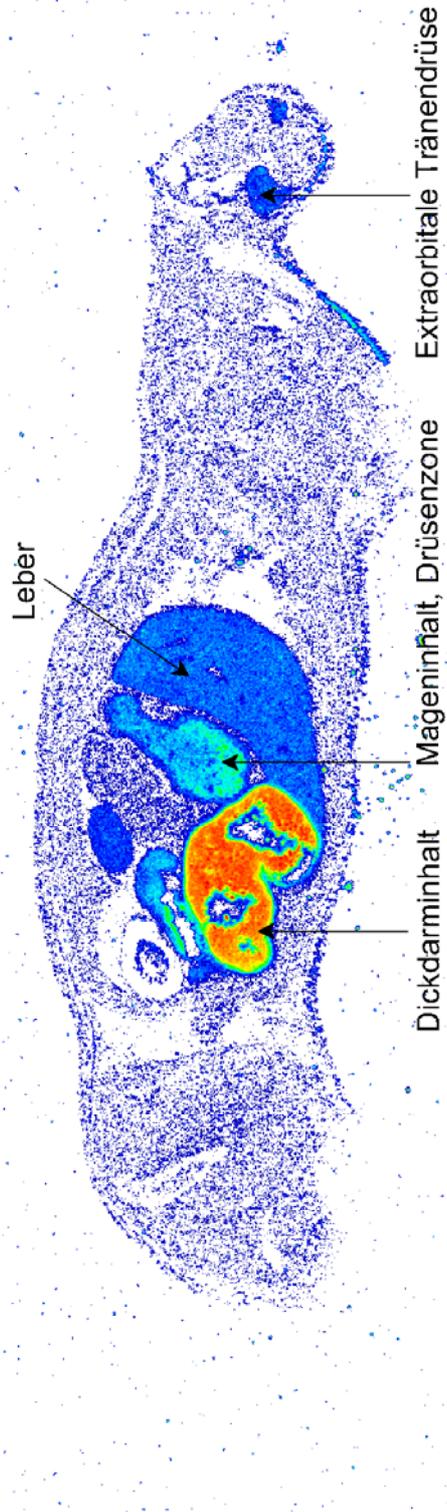


Abb. 4-19: Ratte R9, Ebene 1

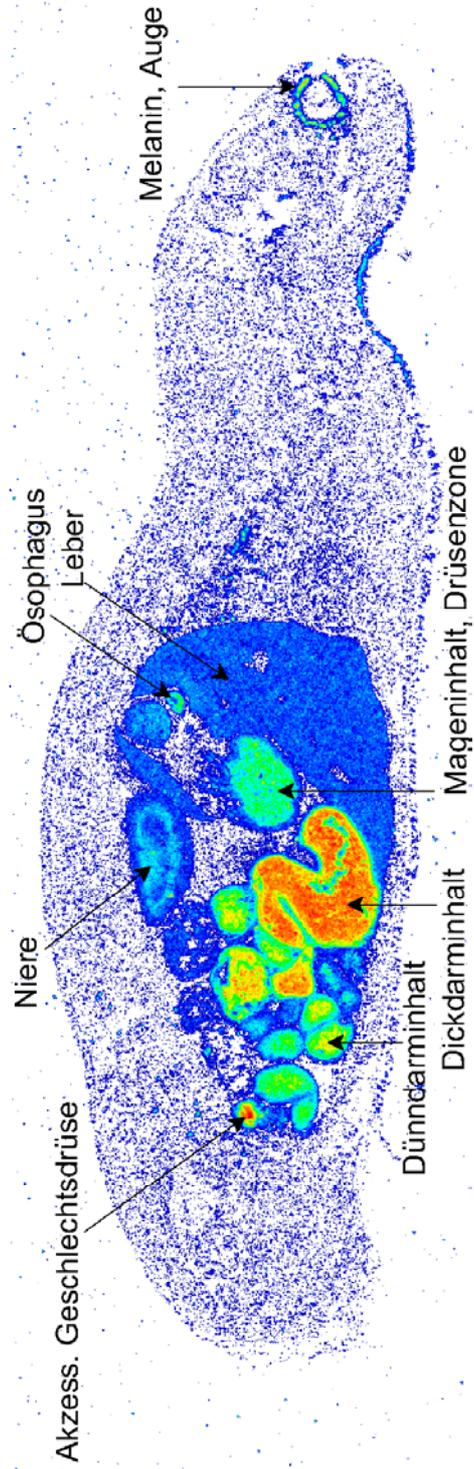


Abb. 4-20: Ratte R9, Ebene 4

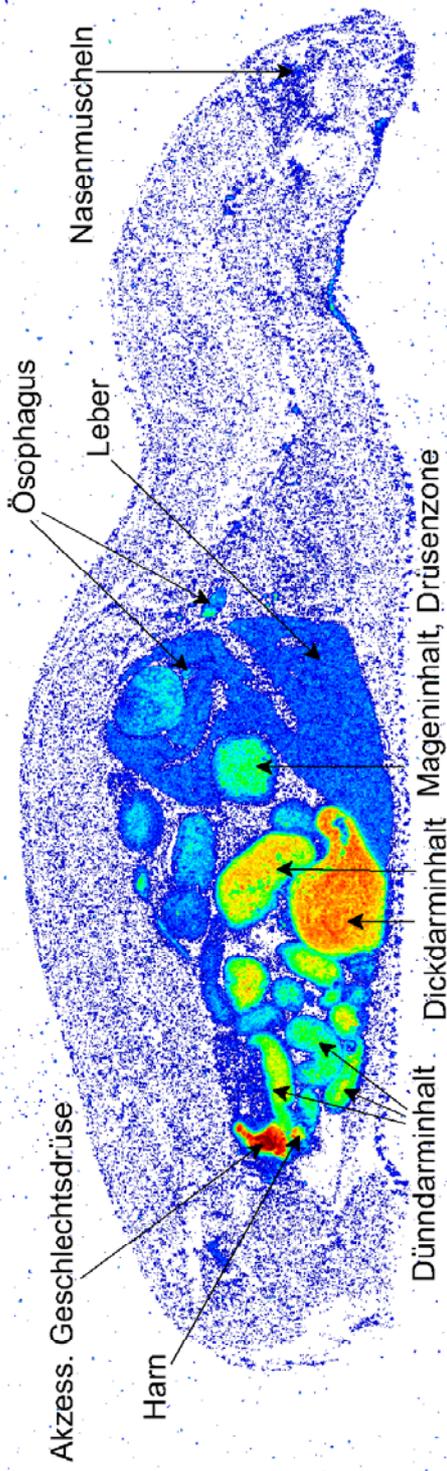


Abb. 4-21: Ratte R9, Ebene 7

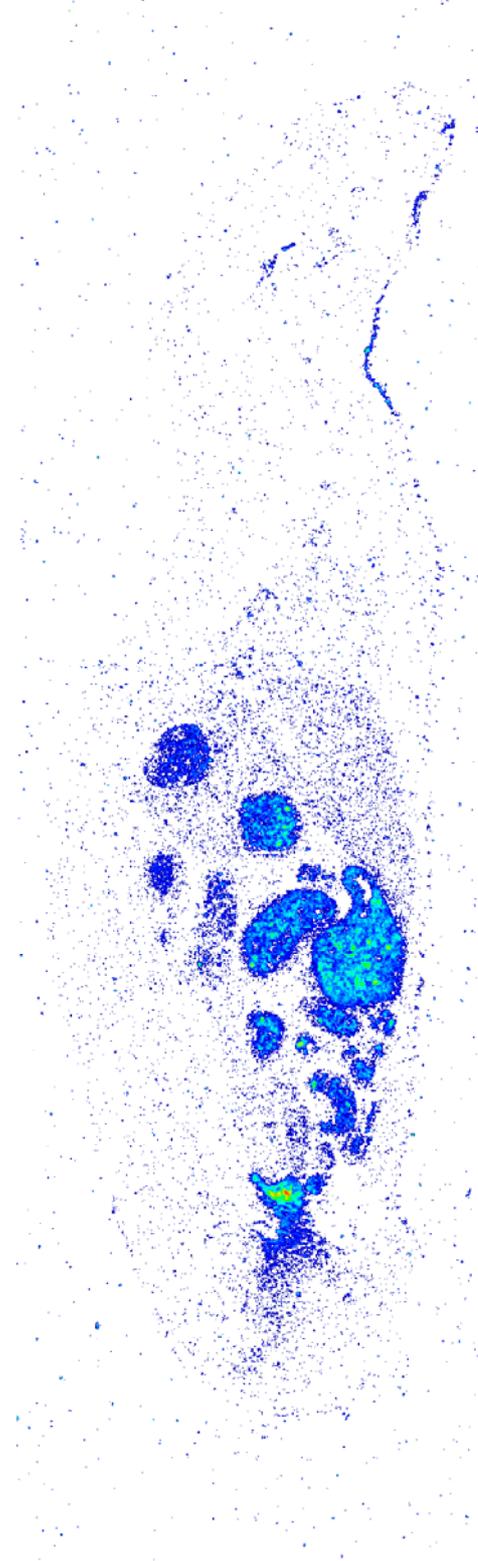


Abb. 4-22: Ratte R9, Ebene 7, extrahiert

**24 Stunden nach Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg)**

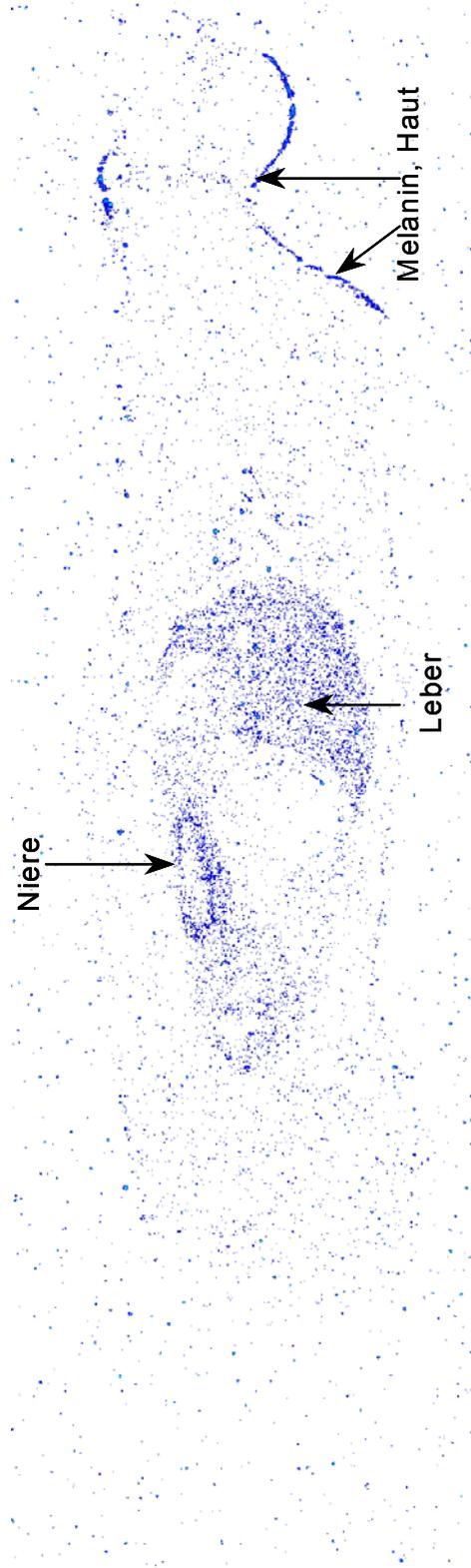


Abb. 4-23: Ratte R10, Ebene 1

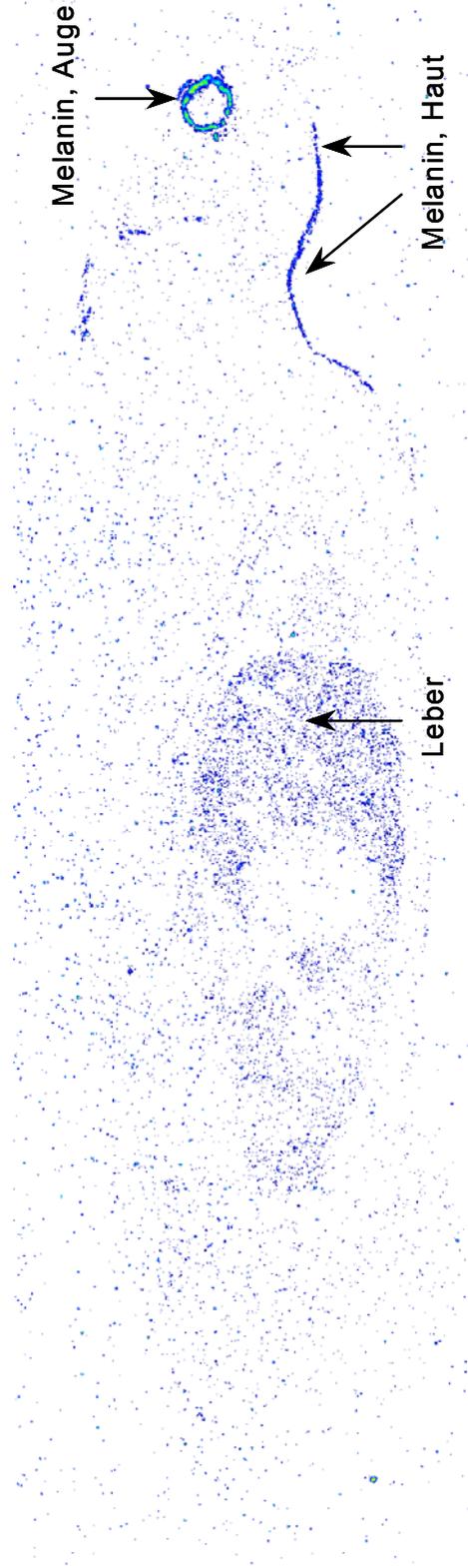


Abb. 4-24: Ratte R10, Ebene 4

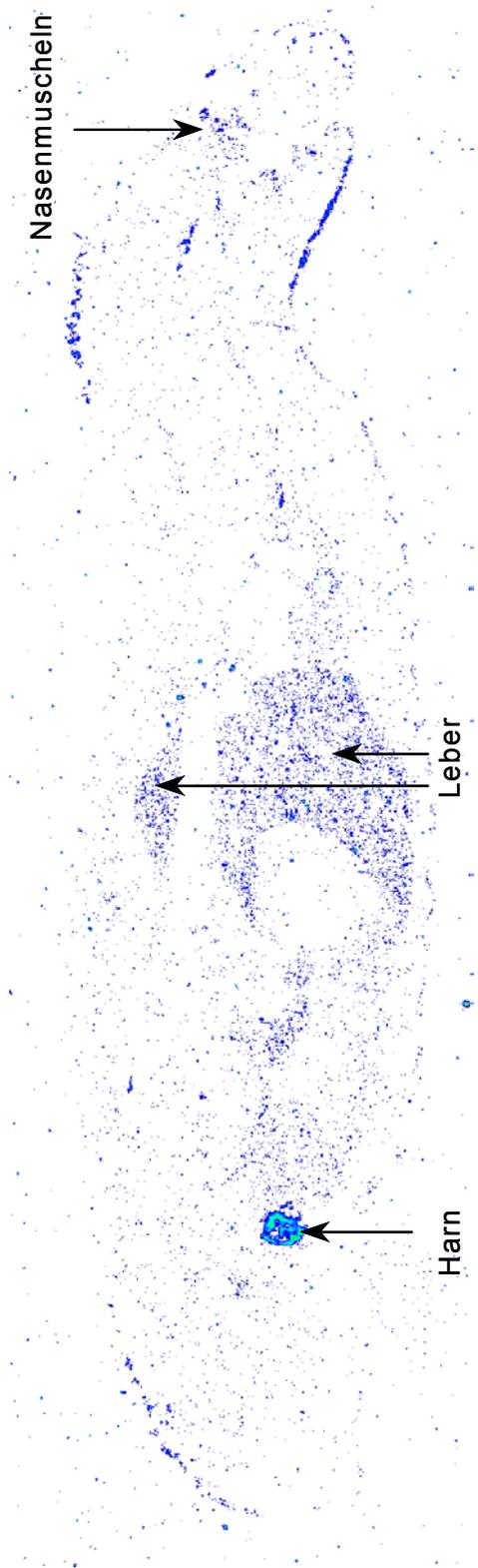


Abb. 4-25: Ratte R10, Ebene 7

ohne Abbildung: Ratte R10, Ebene 7, extrahiert, da nahezu ohne Markierung

### 4.1.2 Beschreibung der Ergebnisse der qualitativen Auswertung

Die Ganzkörperautoradiogramme der **sechs Minuten** nach Applikation des  $^{14}\text{C}$ -Myosmins untersuchten Ratte zeigten eine zunächst relativ homogen über den ganzen Körper verteilte Radioaktivität. Die melaninhaltigen Bereiche des Auges und der Haut, Nasenmuscheln, Leber, Nierenrinde und Harnblaseninhalte sowie die Drüsenmagenwand stellten sich bereits deutlich gegenüber anderen Organen bzw. der Muskulatur dar, ebenso Tränen-, Speichel-, Präputial- und akzessorische Geschlechtsdrüsen sowie die Hardersche Drüse. Eine geringfügig erhöhte Markierung zeigten auch Nierenmark, Lunge und Speiseröhre. Keine Anreicherung konnte in der drüsenfreien Zone des Magens festgestellt werden (Abb. 4-7 bis 4-9).

Ein annähernd gleich erscheinendes Verteilungsmuster war auf den Autoradiogrammen der zum Zeitpunkt **15 Minuten** nach Applikation ausgewerteten Ratte zu erkennen. Zusätzliche Markierung zeigten hier jedoch Drüsenmagen- und Dünndarminhalte. Eine höhere Akkumulation an Radioaktivität war nun auch im Ösophagus gegeben. Das Nierenmark war deutlicher markiert (Abb. 4-11 bis 4-13).

Sehr ähnlich war die Verteilung in allen oben erwähnten Geweben **eine Stunde** nach Applikation, jedoch traten die akzessorischen Geschlechtsdrüsen noch deutlicher in Erscheinung und eine Anreicherung wurde nun auch im Dickdarm erkennbar. Geringer stellte sich dagegen die Muskulatur dar (Abb. 4-15 bis 4-17).

**Vier Stunden** nach der Applikation war ein Absinken der Aktivität in fast allen oben genannten Organen und Geweben festzustellen, in den Speicheldrüsen war kaum noch eine Anreicherung nachzuweisen und auch die Markierung der Muskulatur trat in den Hintergrund. Auffällig war nun die Anreicherung in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen sowie im Inhalt des gesamten Verdauungstraktes und der Speiseröhre (Abb. 4-19 bis 4-21).

Die Autoradiogramme des Zeitpunktes **24 Stunden** zeigten eine immer noch deutliche Markierung der melaninhaltigen Bereiche des Auges und der Haut. Eine hohe Aktivität war in der Präputialdrüse gegeben. Außerdem stellten sich der Harnblasen- und Dickdarminhalt sichtbar dar, während Leber, Nieren, Nasenmuscheln sowie der Ösophagus gerade noch erkennbar waren. Alle anderen o.g. Organe traten in den Hintergrund (Abb. 4-23 bis 4-25).

Nach Extraktion zeigten die Autoradiogramme (Abb. 4-10, 4-14, 4-18, 4-22) der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte eine mehr oder weniger starke Abnahme der Aktivität. Deutlich weniger oder kaum noch Aktivität blieb in der Tränendrüse, der Harderschen Drüse, der Präputialdrüse sowie in den Speicheldrüsen zurück. Lunge, Leber und Nasenmuscheln waren auch nach Extraktion meist noch gut erkennbar. Aus dem Melanin des Auges und der Haut sowie aus Speiseröhre konnte nur sehr wenig Radioaktivität extrahiert werden.

Bei der qualitativen Auswertung der **sechs Minuten** nach Applikation von  $^3\text{H}$ -Myosmin untersuchten Ratte war ein Verteilungsmuster zu erkennen, welches dem der zum gleichen Zeitpunkt untersuchten und mit  $^{14}\text{C}$ -Myosmin behandelten Ratte entsprach. Da es sich hier jedoch um ein albinotisches Tier handelte, war keine auffällige Markierung des Auges oder der Haut erkennbar (Abb. 4-4 bis 4-6).

In der Tabelle A1 im Anhang findet sich eine Liste, mit deren Hilfe sich der Leser einen exakten Überblick über alle Ergebnisse der qualitativen Auswertung verschaffen kann.

## 4.2 Quantitative Auswertung

Die Abbildungen 4-26 bis 4-30 zeigen die Verteilung der Radioaktivität in ausgewählten Geweben zu den fünf untersuchten Zeitpunkten jeweils vor und nach Extraktion der Schnitte.

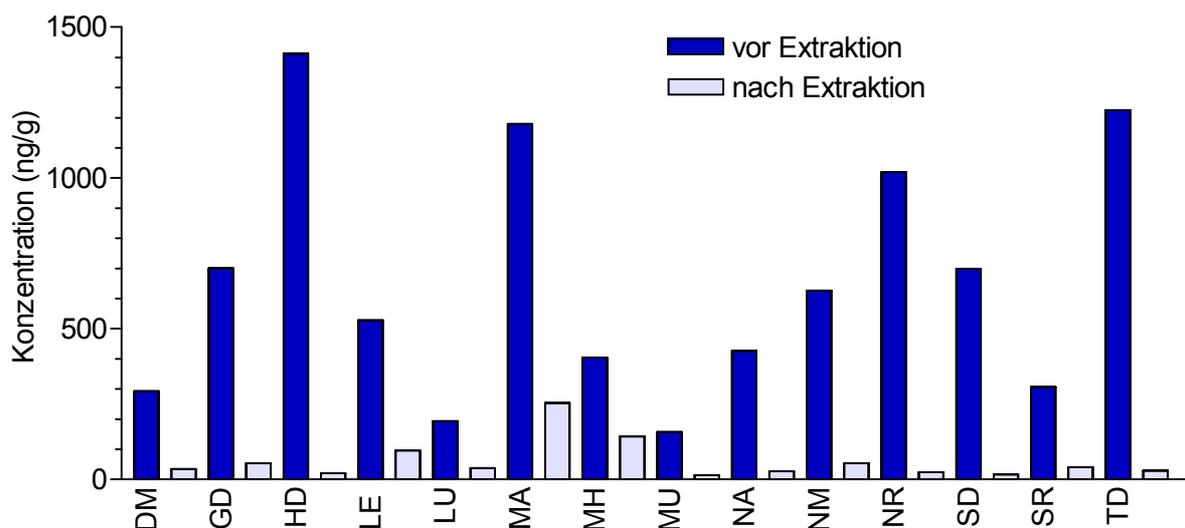


Abb. 4-26: Verteilung der Radioaktivität in ausgewählten Organen 0,1 Stunden nach Myosmin-Injektion, jeweils vor und nach Extraktion.

DM: Drüsenmagenwand, GD: akzessorische Geschlechtsdrüsen, HD: Hardersche Drüse, LE: Leber, LU: Lunge, MA: Melanin Auge, MH: Melanin Haut, MU: Muskel, NA: Nasenmuscheln, NM: Nierenmark, NR: Nierenrinde, SD: Speicheldrüse, SR: Speiseröhre, TD: Tränendrüse

Bereits **sechs Minuten** nach Injektion wurden besonders hohe Konzentrationen in der Harderschen Drüse, den Tränendrüsen, im Melanin des Auges sowie der Nierenrinde nachgewiesen. Hohe Anteile an nicht extrahierbarer Aktivität zeigte das Melanin in der Haut (35%) und im Auge (21%), sowie das Lungen- (19%) und Lebergewebe (18%).

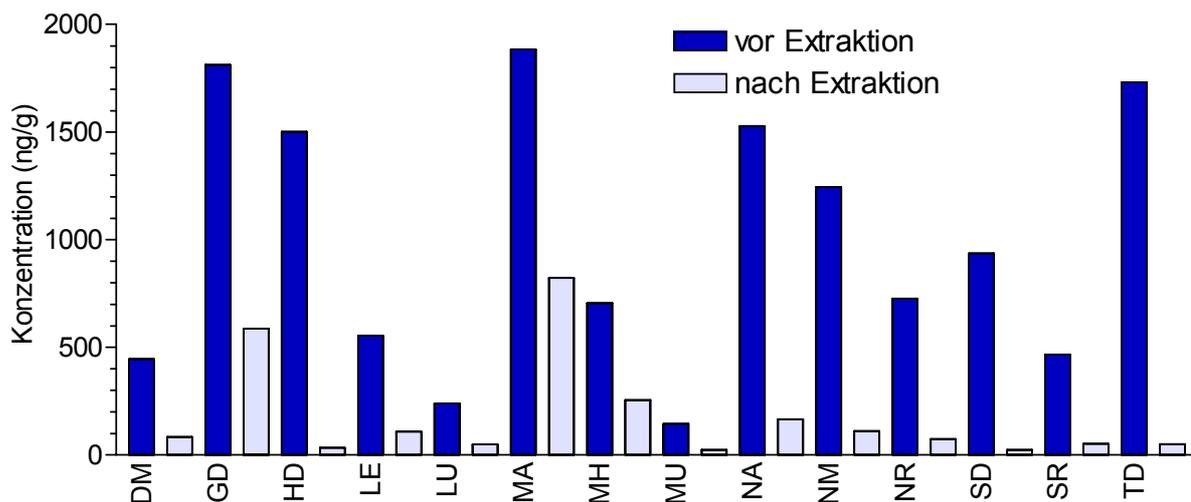


Abb. 4-27: Verteilung der Radioaktivität in ausgewählten Organen (Abkürzungen siehe Abb. 4-26) 0,25 Stunden nach Myosmin-Injektion, jeweils vor und nach Extraktion.

**15 Minuten** nach Injektion konnten auffällig hohe Konzentrationen im Melanin des Auges, in den akzessorischen Geschlechts- und Tränendrüsen und in den Nasenmuscheln nachgewiesen werden. Hohe Anteile an nicht extrahierbarer Aktivität zeigten erneut das Melanin im Auge (44%) und der Haut (36%), aber auch die Geschlechtsdrüsen (32%) sowie die Lunge (20%).

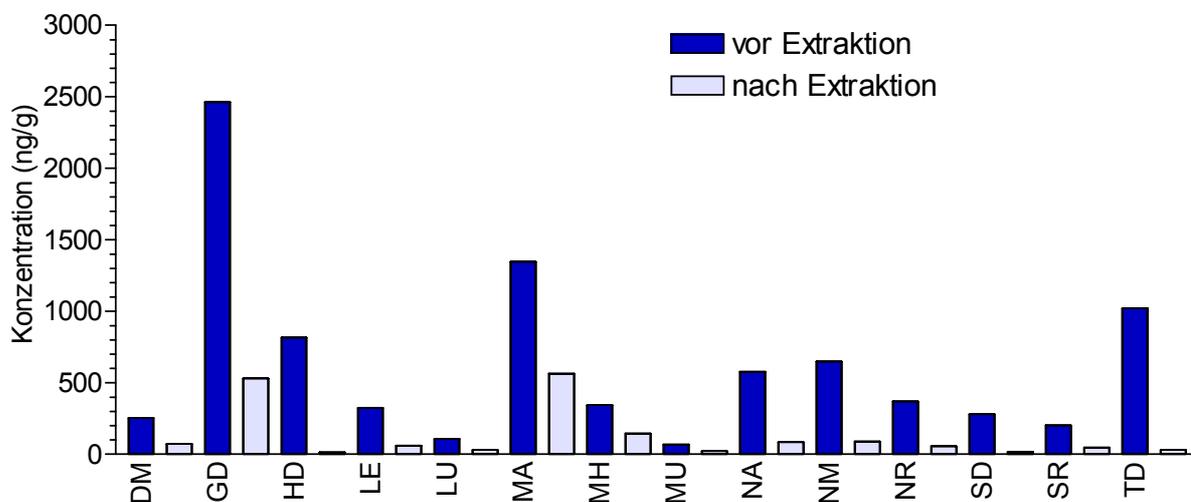


Abb. 4-28: Verteilung der Radioaktivität in ausgewählten Organen (Abkürzungen siehe Abb. 4-26) 1 Stunde nach Myosmin-Injektion, jeweils vor und nach Extraktion.

Die Konzentrationen waren **eine Stunde** nach Injektion besonders hoch in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, im Melanin des Auges, in den Tränendrüsen sowie im Bereich des Nierenmarks. Hohe Mengen an nicht extrahierbarer Aktivität wurden im Melanin des Auges (42%) und der Haut (41%), sowie in den Nasenmuscheln (32%) und der Lunge (29%) festgestellt.

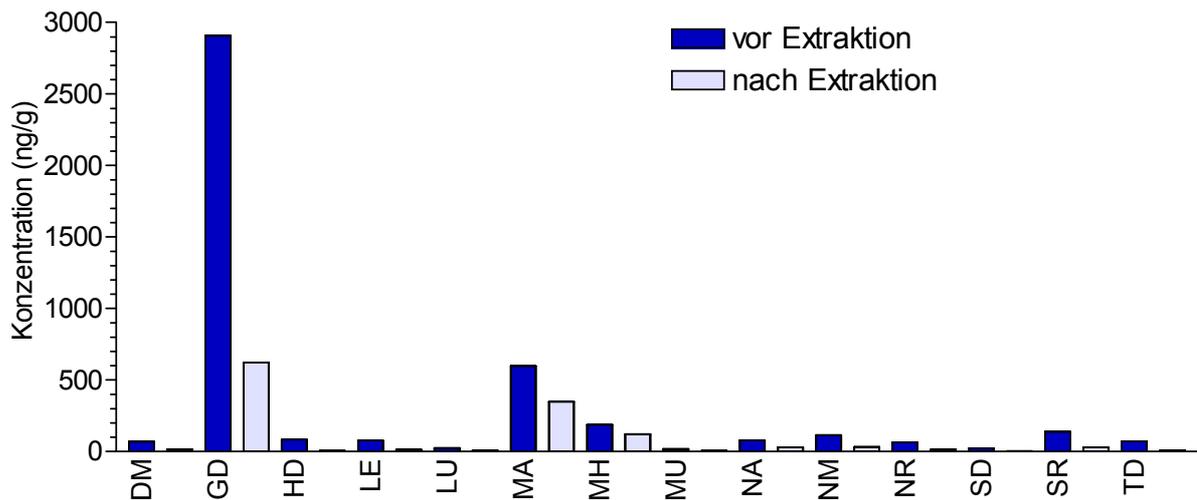


Abb. 4-29: Verteilung der Radioaktivität in ausgewählten Organen (Abkürzungen siehe Abb. 4-26) 4 Stunden nach Myosmin-Injektion, jeweils vor und nach Extraktion.

**Vier Stunden** nach Applikation unterschieden sich die akzessorischen Geschlechtsdrüsen, das Melanin des Auges und der Haut sowie die Speiseröhre durch besonders hohe Konzentrationen von den anderen Geweben. Besonders wenig Aktivität konnte erneut aus dem Melanin der Haut (65%) und des Auges (58%) extrahiert werden, sowie aus dem Lungen- (19%) und Lebergewebe (18%).

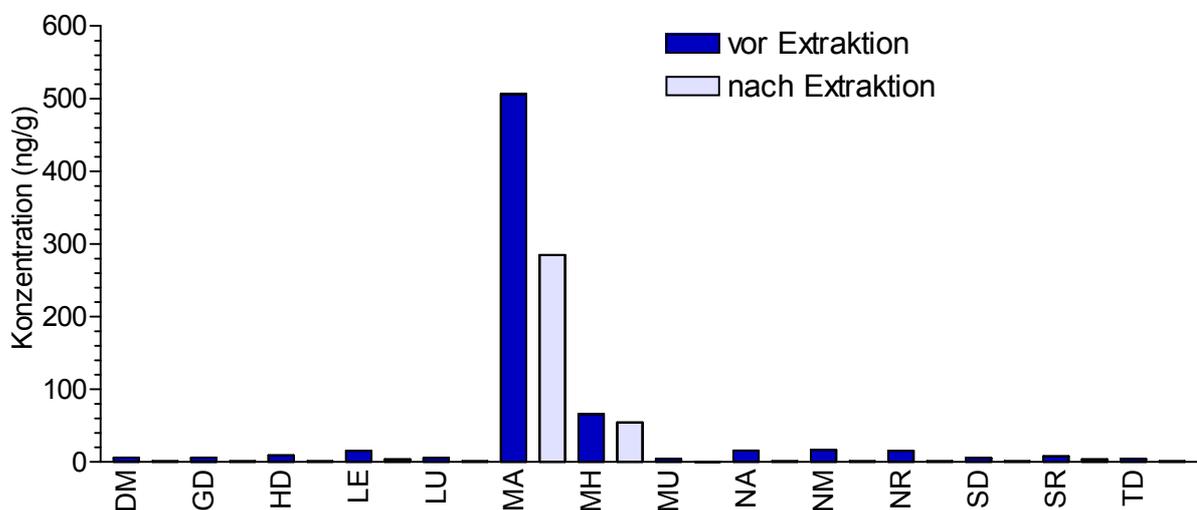


Abb. 4-30: Verteilung der Radioaktivität in ausgewählten Organen (Abkürzungen siehe Abb. 4-26) 24 Stunden nach Myosmin-Injektion, jeweils vor und nach Extraktion.

Nach **24 Stunden** wurden hohe Konzentrationen nur noch im Melanin des Auges und der Haut ermittelt, mit großen Anteilen nicht extrahierbarer Aktivität, 82% in der Haut und 56% im Auge. Eine erhöhte Bindung konnte auch noch in der Speiseröhre (45%) und in der Leber (24%) gefunden werden.

In den folgenden Kapiteln wird auf die Anreicherung, Abnahme und Bindung der Radioaktivität in einzelnen Organen bzw. Geweben näher eingegangen. Alle Ergebnisse sind in Tabellenform im Anhang zusammengefasst (Tab. A6 bis A11).

## 4.2.1 Melanin

### 4.2.1.1 Konzentrationsverlauf

Wie aus Abb. 4-31 zu entnehmen ist, konnte bei der unpigmentierten Ratte sechs Minuten nach i.v.-Applikation von  $^3\text{H}$ -Myosmin (1,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 8,5 MBq/kg) keine Anreicherung von Radioaktivität in den verschiedenen Strukturen des Auges festgestellt werden. Erkennbar in unmittelbarer Nähe des Auges ist hier lediglich die Anreicherung in der Harderschen Drüse sowie in der intraorbitalen Tränendrüse.

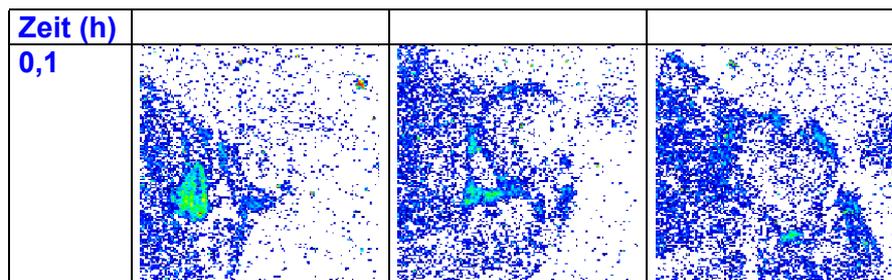


Abb. 4-31: Ausschnittvergrößerungen von Autoradiogrammen aus drei verschiedenen Schnittebenen im Bereich der Augen. Die unpigmentierte Ratte wurde sechs Minuten nach i.v.-Applikation von  $^3\text{H}$ -Myosmin (1,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 8,5 MBq/kg) getötet.

Im Unterschied hierzu war bei allen pigmentierten, im Zeitraum von 0,1 bis 24 Stunden nach i.v.-Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg) getöteten Tieren, eine Anreicherung der Radioaktivität in den melaninhaltigen Strukturen des Auges (Bereiche der Uvea sowie das Pigmentepithel der Retina) erkennbar. In den anderen Bereichen des Auges konnte keine Anreicherung nachgewiesen werden. Die in unmittelbarer Nähe des Auges befindliche Hardersche Drüse sowie die intraorbitale Tränendrüse zeigten bis zum Zeitpunkt 4 Stunden ebenfalls eine deutliche Markierung (siehe Abb. 4-32).

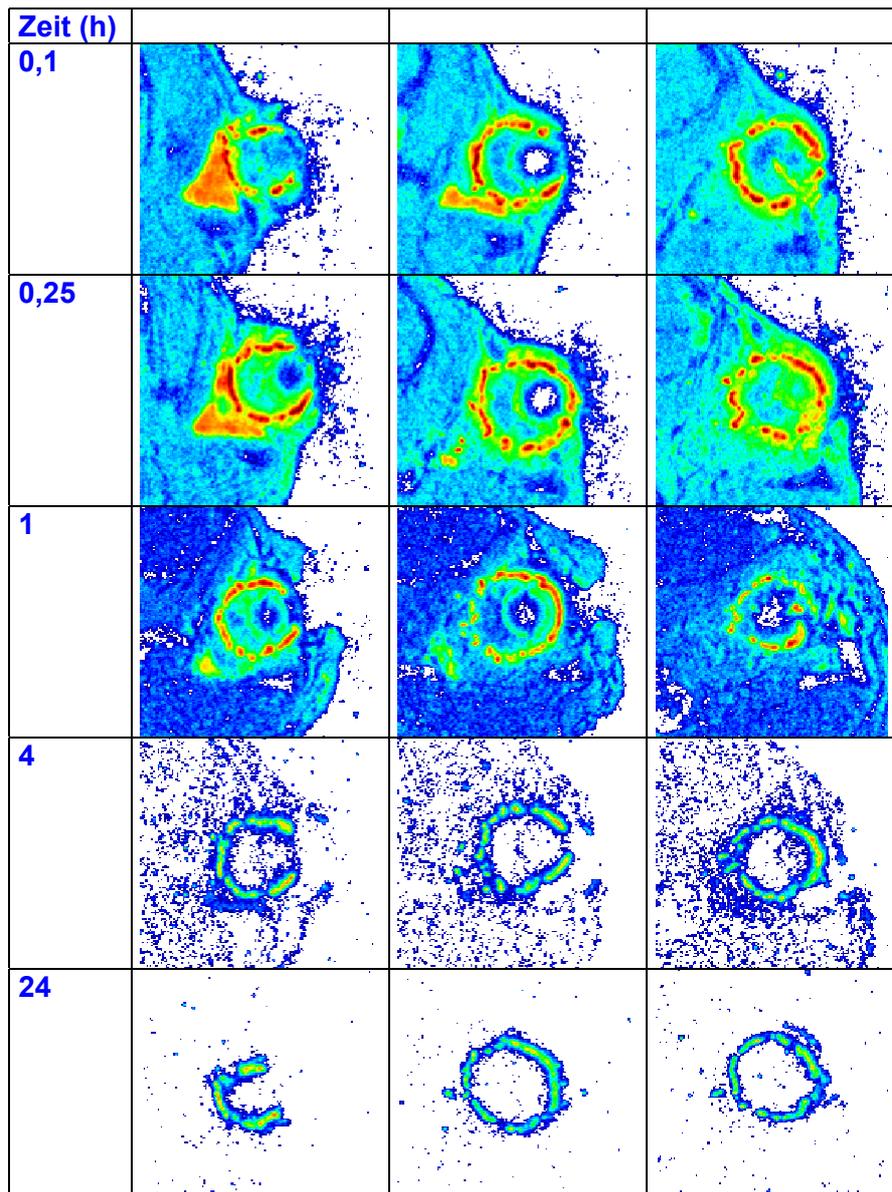


Abb. 4-32: Ausschnittvergrößerungen von Autoradiogrammen aus drei verschiedenen Schnittebenen im Bereich der Augen. Die pigmentierten Tiere wurden im Zeitraum 0,1 bis 24 Stunden nach i.v.-Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg) getötet.

Die Abbildung 4-33 zeigt die  $^{14}\text{C}$ -Aktivität (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg) im Melanin des Auges im Vergleich zur Skelettmuskulatur. Im Muskel ist die maximale Konzentration bereits sechs Minuten nach der Applikation erreicht, im Melanin erst nach 15 Minuten. Danach fällt bei beiden die Konzentration ab, im Melanin ist auch zum Zeitpunkt 24 Stunden eine noch deutlich messbare Radioaktivität vorhanden. Die Elimination der Radioaktivität lässt sich für den Muskel über den gesamten Versuchszeitraum, für die melaninhaltigen Bereiche des Auges erst nach dem zweiten Messpunkt (15 Min.) als Elimination erster Ordnung mit Halbwertszeiten von 0,88 und 1,01 Stunden anpassen. Für die Haut ergab sich eine vergleichbare Halbwertszeit von 1,17 Stunden.

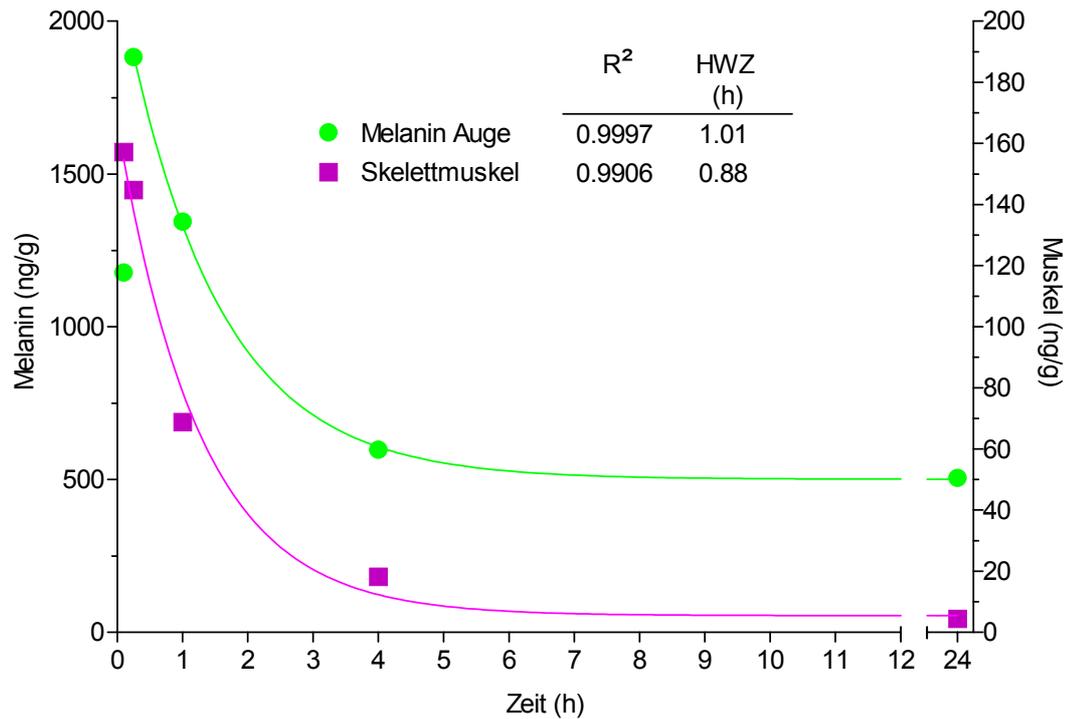


Abb. 4-33: Konzentration der Radioaktivität im Melanin des Auges im Vergleich zur Skelettmuskulatur nach i.v.-Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg); die Halbwertszeit wurde gewichtet nach  $1/Y$  berechnet.

#### 4.2.1.2 Bindung in vivo

Durch Behandlung der Schnitte mit einer Serie polarer und unpolarer Lösungsmittel wurde die extrahierbare Radioaktivität soweit als möglich ausgewaschen. Die Autoradiogramme in Abbildung 4-34 zeigen, dass die Radioaktivität in den melaninhaltigen Bereichen des Auges durch die Extraktion kaum entfernt werden konnte.

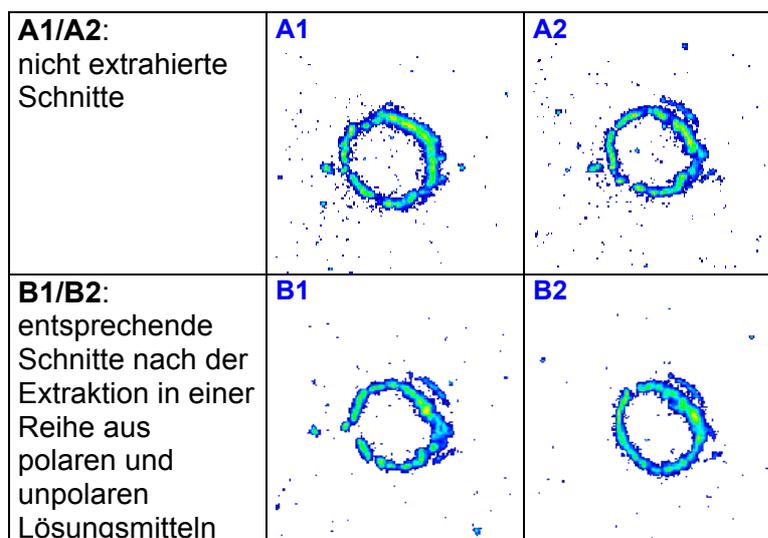


Abb. 4-34: Ausschnittvergrößerungen aus Autoradiogrammen vom Auge einer pigmentierten Ratte 24 Stunden nach i.v.-Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg). Die Radioaktivität konnte kaum extrahiert werden.

Der Anteil nicht extrahierbarer Radioaktivität steigt mit zunehmender Zeit nach Injektion von Myosmin an und erreicht im pigmentierten Auge fast 60% der Konzentration vor Extraktion, in der Haut sogar über 80% (Abb. 4-35).

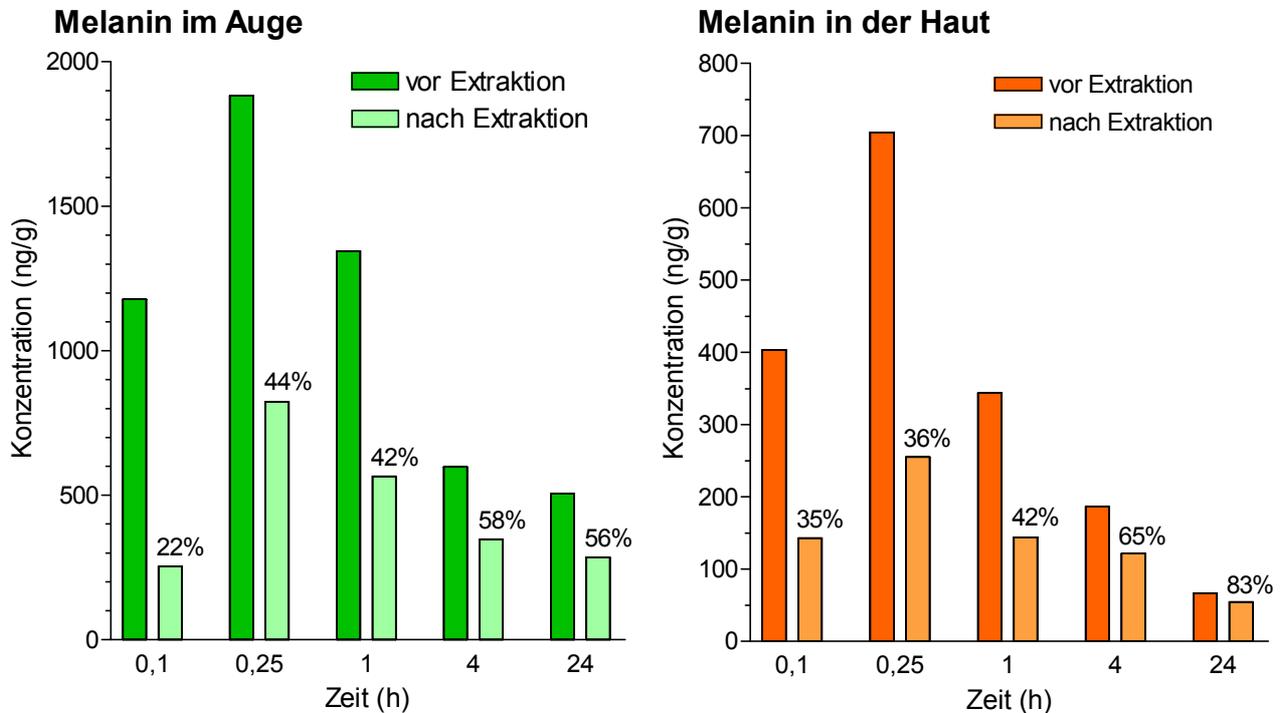


Abb. 4-35: Zunahme der nicht extrahierbaren Radioaktivität in melaninhaltigen Bereichen des Auges und der Haut.

#### 4.2.1.3 Inkubation von Augenschnitten in vitro

Myosmin wird auch in vitro nach Inkubation von Augenschnitten einer unbehandelten, pigmentierten Ratte im Melanin angereichert (Abb. 4-36). Wegen fehlender Vergleichsstandards wurde auf eine quantitative Auswertung dieser Versuche verzichtet.

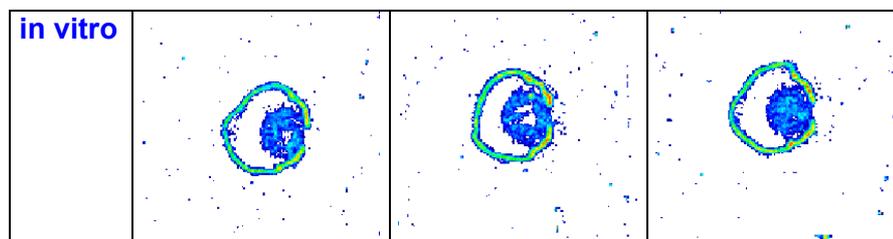


Abb. 4-36: Autoradiogramme von drei Schnittebenen des Auges einer pigmentierten Ratte nach in vitro Inkubation mit  $^{14}\text{C}$ -Myosmin.

## 4.2.2 Ösophagus

### 4.2.2.1 Konzentrationsverlauf

In Abbildung 4-37 sind exemplarisch Ausschnitte aus Ganzkörperautoradiogrammen jeder Ratte zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Myosminapplikation dargestellt. Die Übersicht enthält Schnitte aus jeweils drei Ebenen. Für die Darstellung der Autoradiogramme der Ratte R10 (Zeitpunkt 24 Stunden) wurde die Kontrastbreite aufgrund der niedrigen Radioaktivitätsmenge von 300-900 auf 0-600 erweitert um die Nachweisempfindlichkeit zu erhöhen. Deshalb sei darauf hingewiesen, dass diese Autoradiogramme bezüglich der Farbsättigung, und damit in ihrer quantitativen Aussage, vom Leser nicht mit den dargestellten ersten vier Zeitpunkten verglichen werden können. Die Pfeile markieren die Lage des Ösophagus. Erkennbar ist eine Anreicherung von Radioaktivität im abdominalen und thorakalen Teil der Speiseröhre zu allen Zeitpunkten. Bei Betrachtung unter verschiedenen Kontrastbreiten und Vergrößerung am Computerbildschirm konnte eine besonders intensive Markierung der Tunica mucosa festgestellt werden.

Ähnlich wie bei der Einlagerung in Melanin erreicht die Konzentration der Radioaktivität erst später als sechs Minuten nach Injektion ihr Maximum im Ösophagus (Abb. 4-38). Die Anpassung der Werte von 0,25-24 Stunden an eine Eliminationskurve 1. Ordnung erlaubt nur eine grobe Abschätzung der Halbwertszeit von ca. 2 Stunden.

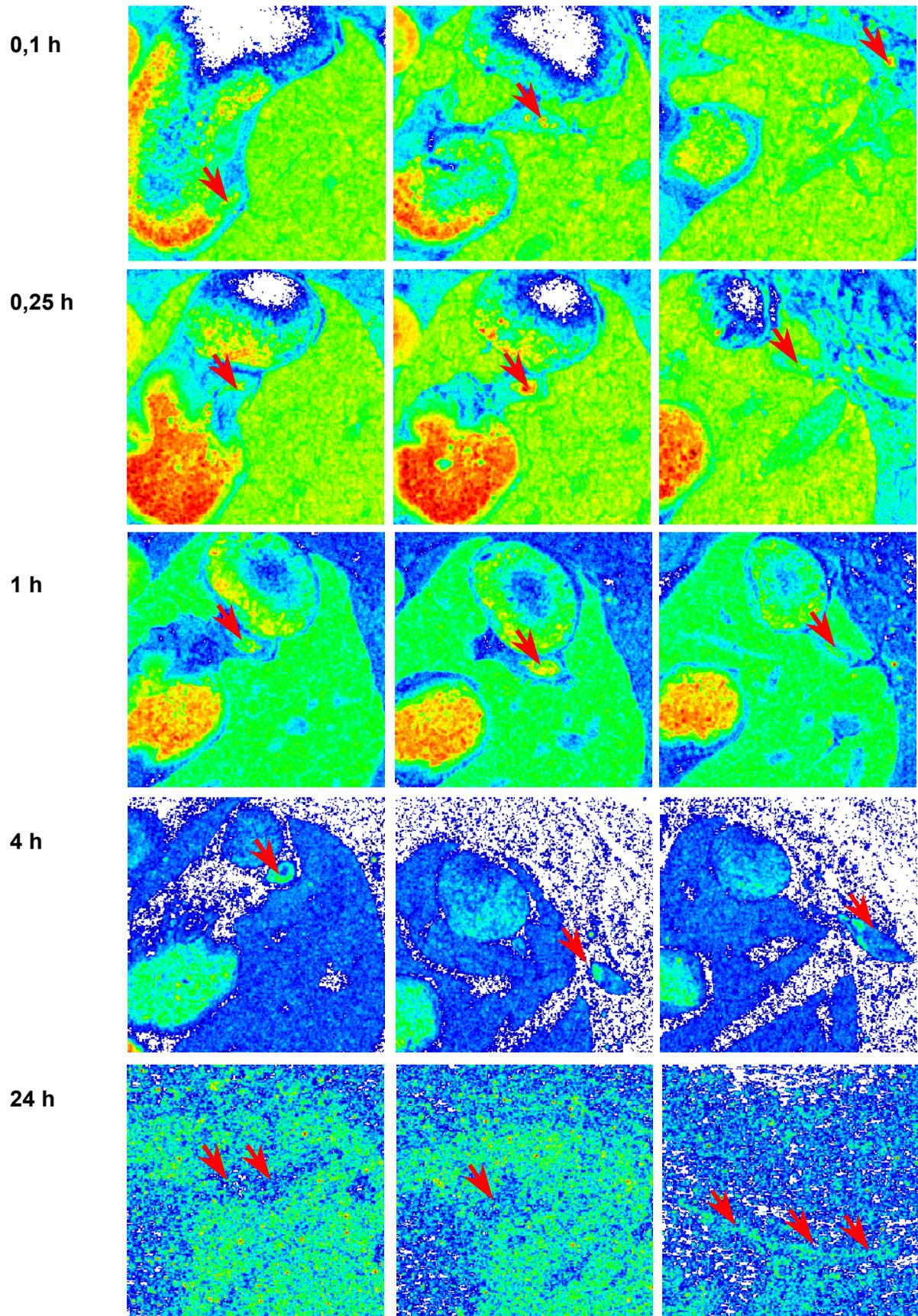


Abb. 4-37: Detailvergrößerungen aus den Autoradiogrammen zu 5 verschiedenen Zeitpunkten und jeweils 3 Ebenen pro Tier; die Pfeile zeigen die Lage des Ösophagus an.

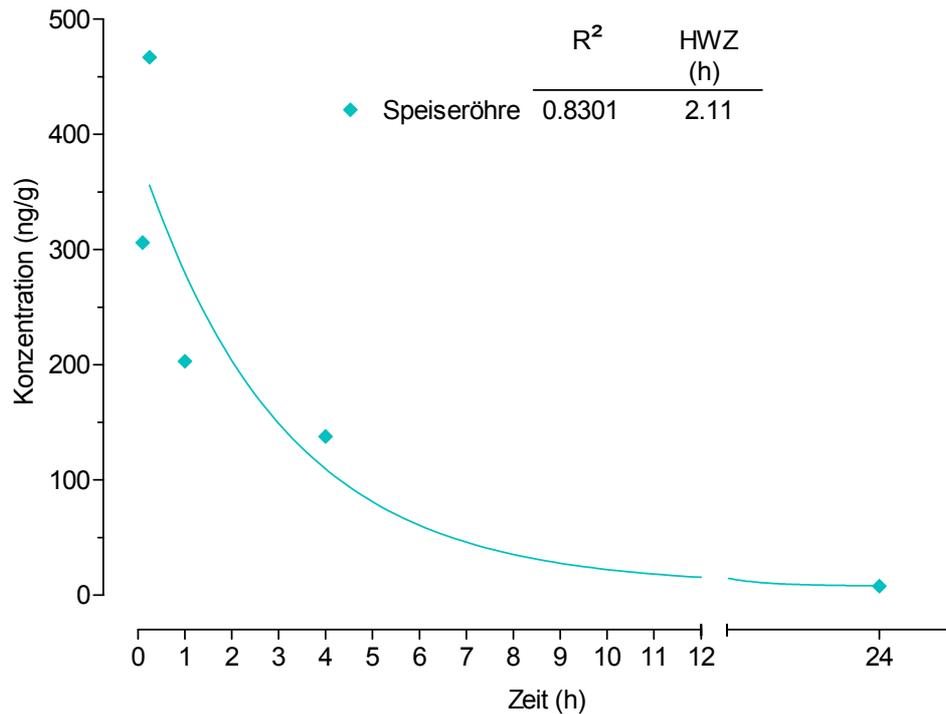


Abb.4-38: Konzentrationsverlauf der Radioaktivität im Ösophagus nach i.v.-Applikation von <sup>14</sup>C-Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg); die Halbwertszeit wurde gewichtet nach 1/Y berechnet.

#### 4.2.2.2 Bindung in vivo

Aus den Schnitten waren zwischen 11% (0,25 h) und 45% (24 h) der ursprünglichen Aktivität aus dem Ösophagus nicht extrahierbar. Die Abbildung 4-39 zeigt die jeweiligen Konzentrationen des Myosmins in der Speiseröhre vor und nach Extraktion im Zeitraum von 0,1 bis 24 Stunden nach der Applikation.

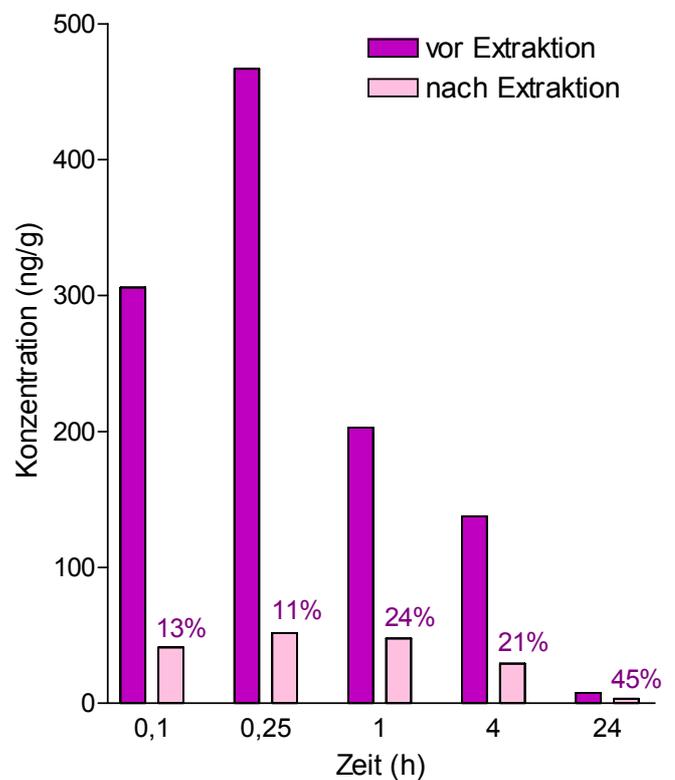


Abb. 4-39: Zunahme der nicht extrahierbaren Radioaktivität in der Speiseröhre nach Extraktion der Schnitte.

### 4.2.2.3 Inkubation von Ösophagusschnitten in vitro

Bei der qualitativen Auswertung der in vitro inkubierten Ösophagusschnitte zeigte sich eine deutliche Markierung der Speiseröhre, die in der Tunica mucosa besonders ausgeprägt war (Abb. 4-40). Eine quantitative Auswertung war aufgrund fehlender Vergleichsstandards nicht möglich.

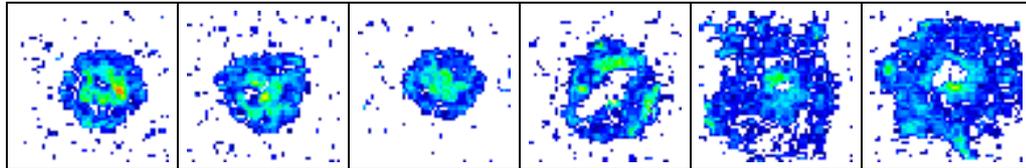


Abb. 4-40: Detailvergrößerungen aus in vitro inkubierten Ösophagusquerschnitten: je zwei Abbildungen der Querschnitte aus pars cervicalis, pars abdominalis und pars thoracalis zeigen die starke Anreicherung in der Tunica mucosa der Speiseröhre (Range 300-700).

## 4.2.3 Exkretion

### 4.2.3.1 Ausscheidung mit Urin und Faezes im Stoffwechselkäfig

Bei den vier und 24 Stunden nach Myosmin-Injektion untersuchten Ratten wurden Urin, nach 24 Stunden auch Faezes, getrennt in Stoffwechselkäfigen gesammelt und die Gesamtradioaktivität bestimmt.

Bereits vier Stunden nach der Applikation erscheint etwa ein Drittel der Radioaktivität im Urin. Innerhalb 24 Stunden wurden mit dem Urin insgesamt 72% ausgeschieden, die Ausscheidung mit den Faezes ist vergleichsweise gering und beträgt nur 15% der Dosis. Nach 24 Stunden hatte die Ratte fast 90% der ursprünglich verabreichten Dosis mit Urin und Faezes eliminiert. Die Ergebnisse sind im Detail der Tabelle A12 im Anhang zu entnehmen.

### 4.2.3.2 Niere und Harnblase

Die rasche Ausscheidung der Radioaktivität über die Niere lässt sich auf den Autoradiogrammen gut nachvollziehen. Der Harnbildungsprozess im Nephron kann in drei Phasen gegliedert werden, glomeruläre Filtration, tubuläre Rückresorption und tubuläre Sekretion. Sechs Minuten nach der Applikation war eine deutliche Anreicherung an Radioaktivität vor allem in der Nierenrinde, in der sich die Glomeruli befinden, nachzuweisen. Deutlich weniger Aktivität war zu diesem Zeitpunkt im Mark der Niere zu erkennen, in dem Tubuli und Sammelrohre vorherrschen. Dieses Verteilungsmuster ändert sich bereits nach 15 Minuten, man erkennt deutlich eine Verlagerung der Aktivität in das Nierenmark (Abb. 4-41).

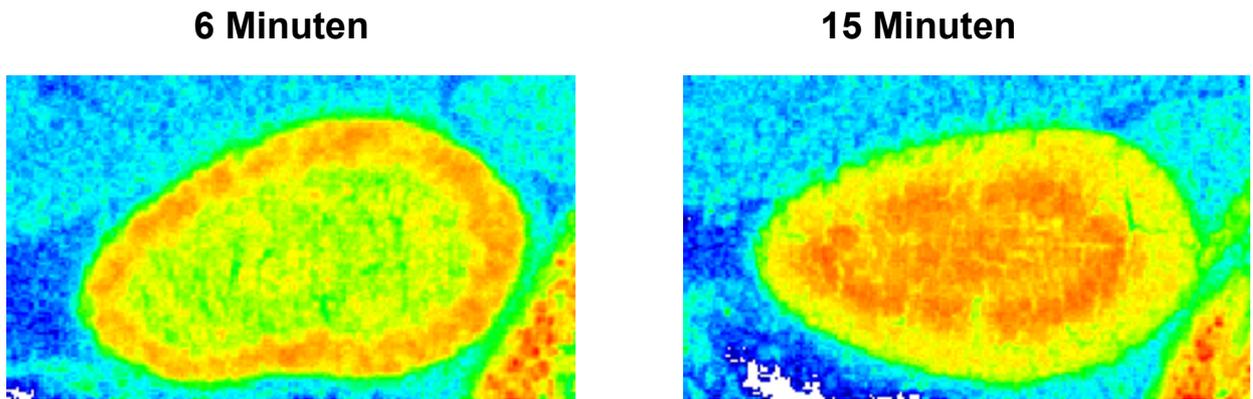


Abb.4-41: Ausschnittvergrößerung der längs geschnittenen Nieren, sechs und fünfzehn Minuten nach Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin.

Die Radioaktivitätskonzentrationen in Nierenrinde, Nierenmark und Harnblase sind der Abbildung 3-42 zu entnehmen. Während in der Nierenrinde die höchste Konzentration bereits sechs Minuten nach Myosmin-Injektion erreicht war, wurden im Nierenmark und in der Harnblase erst nach 0,25 bzw. einer Stunde die Spitzenwerte gemessen. Der Abfall der Konzentration in Nierenrinde und Nierenmark erfolgt mit Halbwertszeiten von 0,55 und 0,79 Stunden. Für den Harnblaseninhalt war die Anpassung an eine Elimination 1. Ordnung nicht möglich. In weiteren, hier nicht gezeigten Autoradiogrammen, war auch eine deutliche Markierung im Nierenbecken erkennbar.

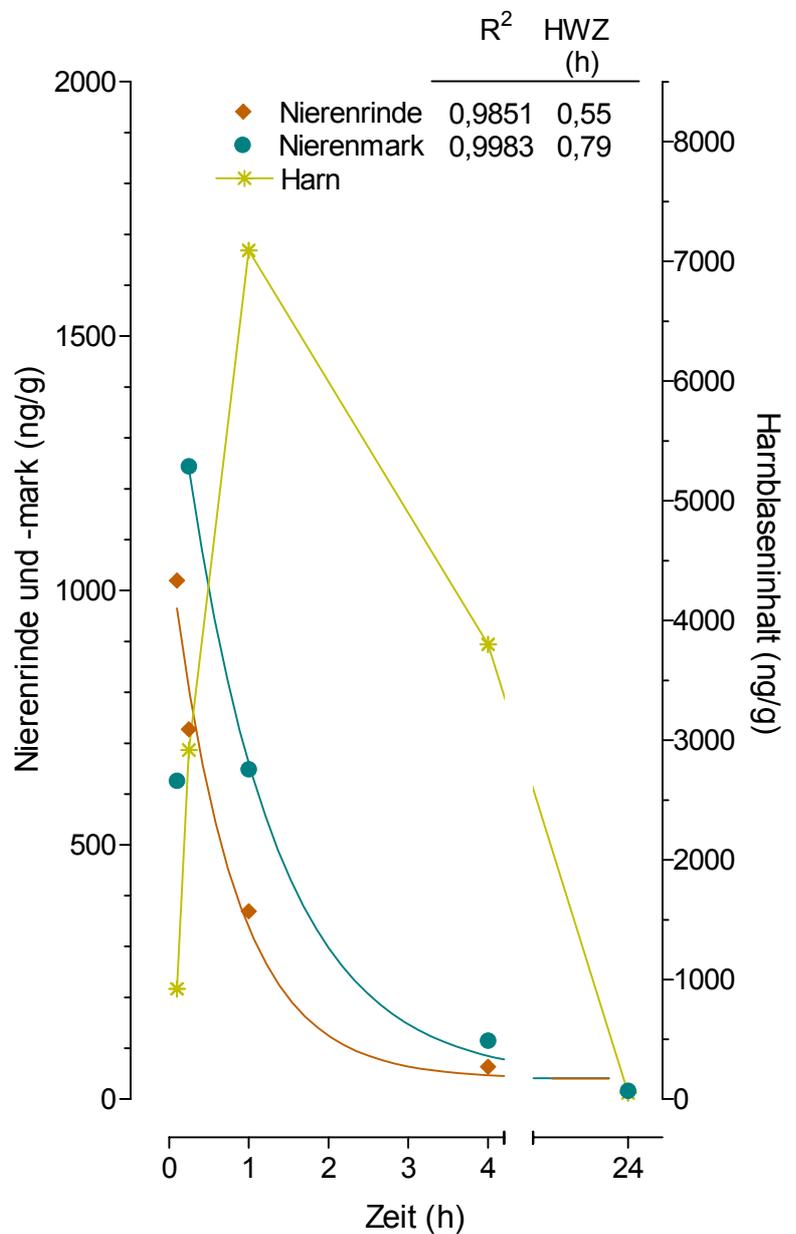


Abb. 4-42: Ausscheidung der Radioaktivität über den Harntrakt

### 4.2.3.3 Magen und Darm

Wie aus den Autoradiogrammen der Abbildungen 4-5 bis 4-8 sowie 4-3 (oben) ersichtlich ist, erfolgte in der Drüsenmagenwand eine rasche Anreicherung von Radioaktivität nach intravenöser Myosmin-Applikation. Abbildung 4-43 zeigt die im Inhalt des Gastrointestinaltrakts gemessenen Konzentrationen im Verlauf von 24 Stunden. Bereits sechs Minuten nach intravenöser Myosmingabe konnte Myosmin im Drüsenmageninhalt nachgewiesen werden. Durch die Peristaltik wurde es innerhalb einer Stunde in Vormagen und Dünndarm weitertransportiert. Im Dickdarminhalt wurde ein deutlicher Anstieg der Aktivität erst nach vier Stunden verzeichnet.

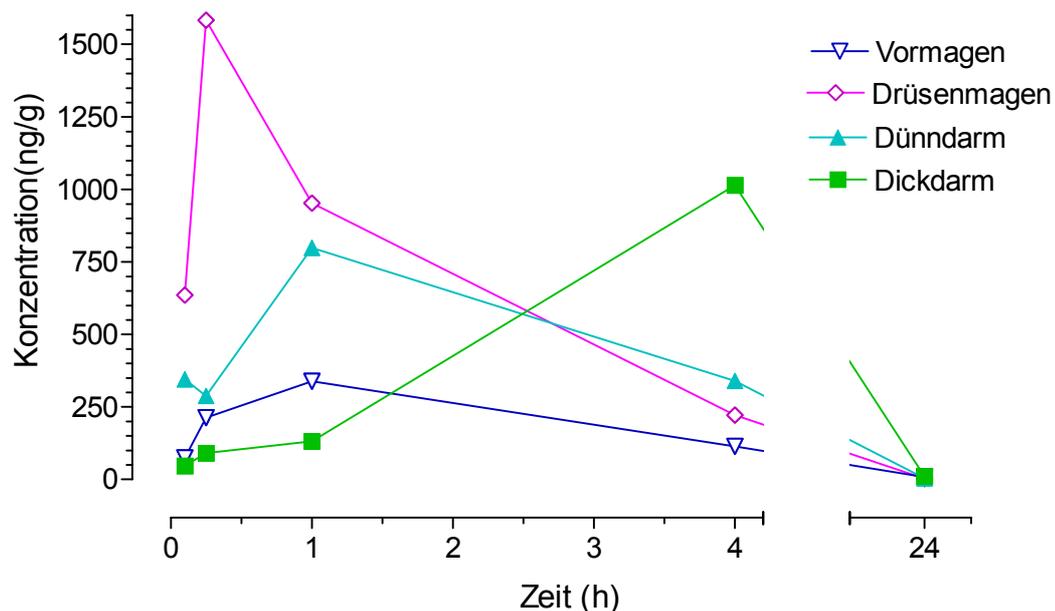


Abb.4-43: Zeitabhängige Verteilung des Myosmins im Inhalt des Gastrointestinaltrakts nach intravenöser Verabreichung

### 4.2.3.4 Speichel

#### 4.2.3.4.1 Konzentrationsverlauf

Die Abbildung 4-44 zeigt den Verlauf der Radioaktivitätskonzentration in den Speicheldrüsen im Vergleich zum Ösophagus. Zu den frühen Zeitpunkten zwischen 6 und 60 Minuten ist eine hohe Konzentration in den Speicheldrüsen nachweisbar, welche jedoch zu den späteren Zeitpunkten rasch mit einer Halbwertszeit von 0,42 Stunden absinkt. Vier Stunden nach der Applikation des Myosmins ist die Konzentration im Ösophagus höher als im Speichel.

#### 4.2.3.4.2 Bindung

Der überwiegende Teil der Radioaktivität ließ sich sehr leicht aus den Speicheldrüsen extrahieren. Nur 2,2% (Zeitpunkt 0,1 h), 2,5% (Zeitpunkt 0,25 h) und 6,4% (Zeitpunkt 1 h) waren nicht extrahierbar. Der höhere Anteil von 17,3% nach 4 Stunden ist vermutlich darauf

zurückzuführen, dass sich zu diesem Zeitpunkt die Konzentration (3,73 ng/g) bereits an der unteren Nachweisgrenze befand.

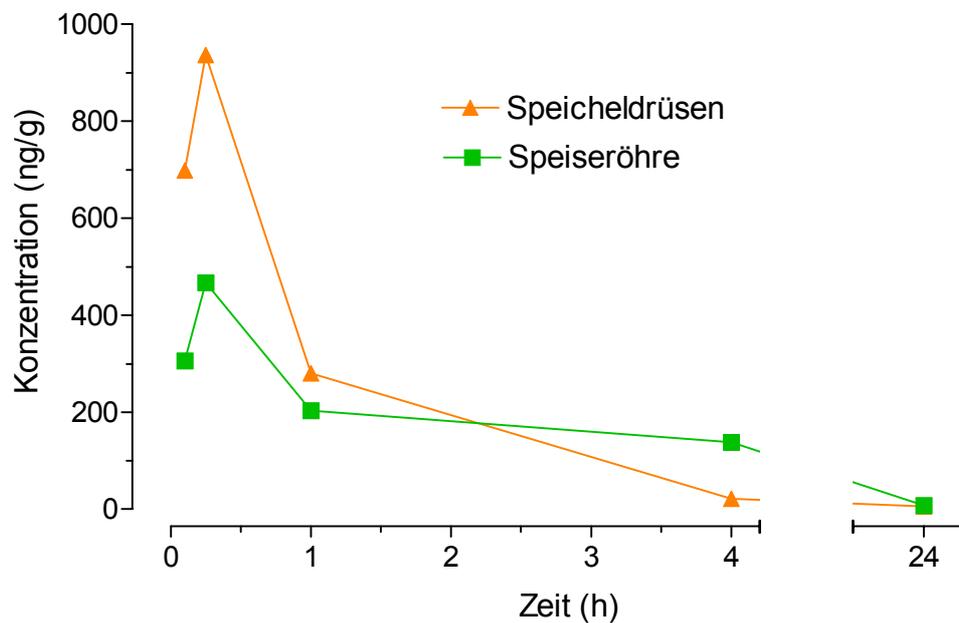


Abb. 4-44: Vergleichende Darstellung der Konzentrationen im Verlauf von 24 Stunden nach Applikation in den Speicheldrüsen und im Ösophagus.

#### 4.2.4 Nasenmuscheln

In der ersten Stunde nach Myosmin-Injektion wurde eine hohe Konzentration im Bereich der Nasenmuscheln gefunden, die bereits nach vier Stunden deutlich abgefallen war (Abb. 4-45). Der Anteil nicht extrahierbarer Radioaktivität hat sich jedoch zu diesem Zeitpunkt mehr als verdoppelt.

Für die Elimination der Radioaktivität lässt sich im Zeitraum zwischen 15 Minuten und 24 Stunden eine Halbwertszeit von 0,57 Stunden anpassen (Abb. 4-46).

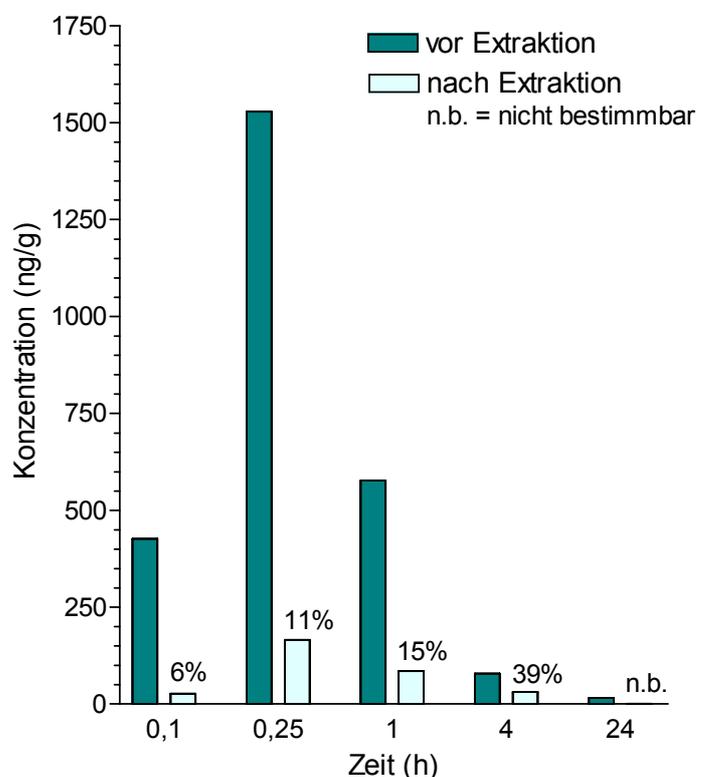


Abb. 4-45: Zunahme der nicht extrahierbaren Radioaktivität im Bereich der Nasenmuscheln nach Extraktion der Schnitte.

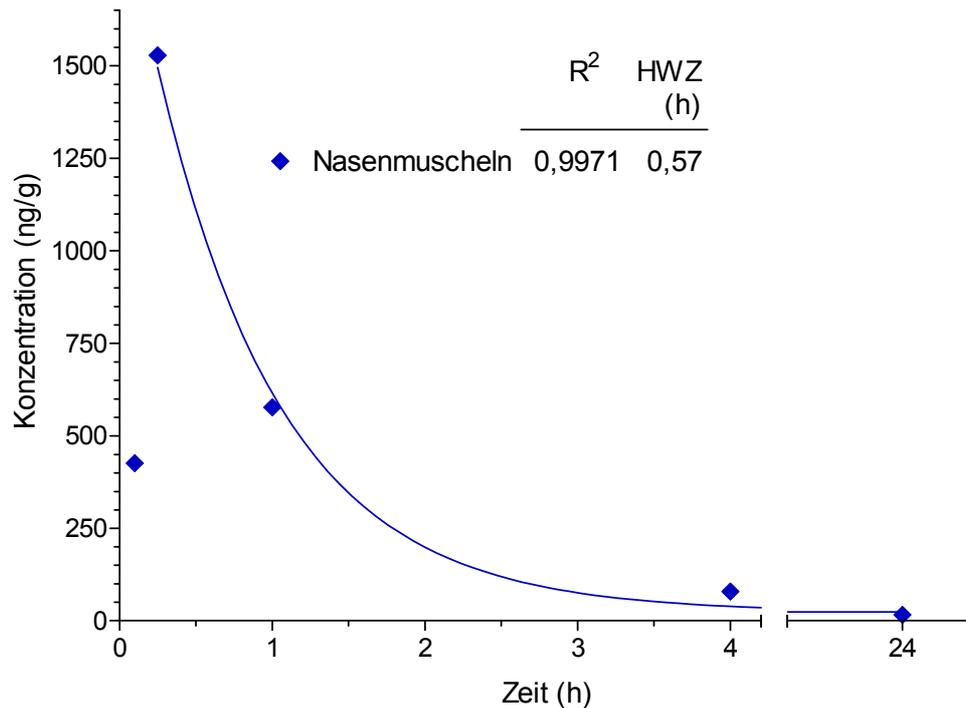


Abb. 4-46: Konzentrationsverlauf der Radioaktivität im Bereich der Nase nach i.v.-Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Myosmin (0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg); die Halbwertszeit wurde gewichtet nach  $1/Y$  berechnet.

#### 4.2.5 Akzessorische Geschlechtsdrüsen

In den ersten vier Stunden nach Myosmin-Injektion stiegen die Radioaktivitätsgehalte in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen kontinuierlich an (Abb. 4-47) und erreichten nach einer und nach vier Stunden das Doppelte bzw. Fünffache der Konzentration im Melanin des Auges (Abb. 4-28 und 4-29). Nach 24 Stunden war der Gehalt stark abgesunken und nur noch geringfügig über der Nachweisgrenze. Ein Vergleich der Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Autoradiogramme mit den Messergebnissen der Direktbestimmung der Radioaktivität in den entnommenen Organen zeigt eine gute Übereinstimmung (Abb. 4-47; Tabelle A13 im Anhang). Eine Halbwertszeit lässt sich nicht berechnen, weil für den Verlauf der Kurve zwischen vier und 24 Stunden keine weiteren Messwerte vorliegen.

In den Extraktionsversuchen konnte ein Anteil zwischen 7,7% nach sechs Minuten und 32% nach 15 Minuten nicht ausgewaschen werden.

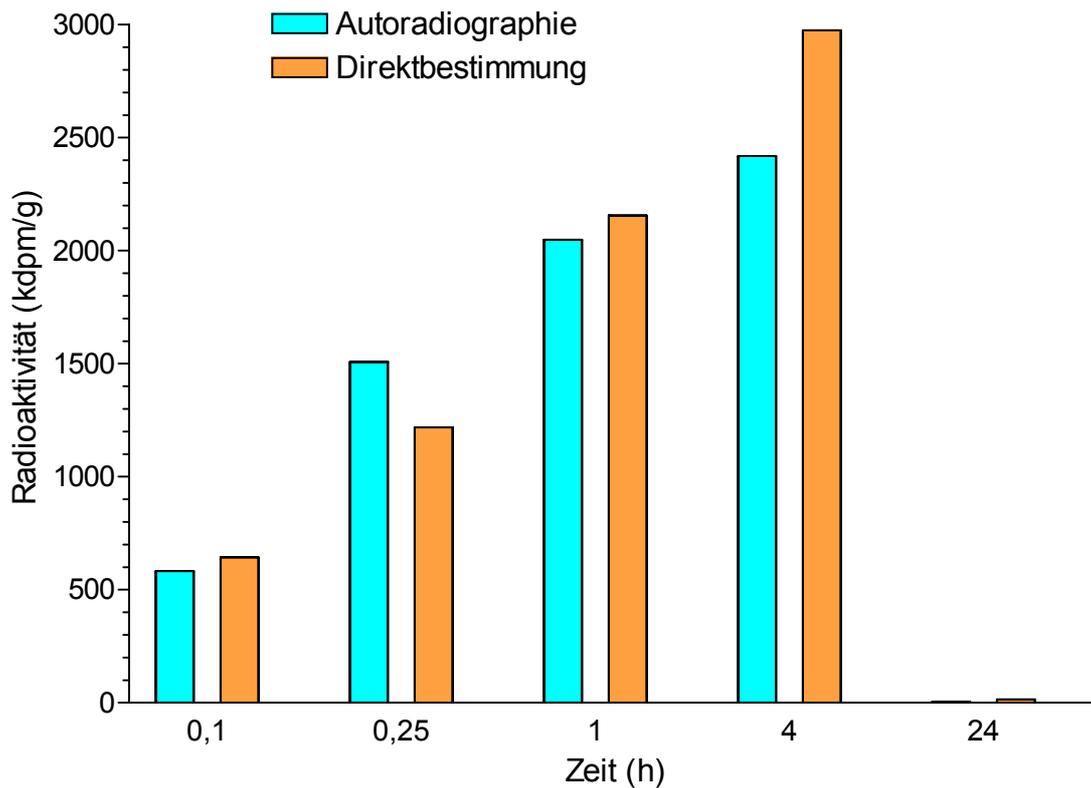


Abb. 4-47: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der quantitativen Radioaktivitätsbestimmung in der Autoradiographie mit der direkten Messung durch Flüssigkeitsszintillation.

#### 4.2.6 Messung Restradioaktivität im Schwanz

Um eine paravenöse Applikation auszuschließen wurde der Anteil der in den Rattenschwänzen nach intravenöser Applikation zurückbleibenden Radioaktivität bestimmt. Die Messungen ergaben Werte unter 5%, mit Ausnahme des Wertes nach sechs Minuten (11%; siehe Tabelle A14). Der Wert für das kürzeste Zeitintervall nach der Myosmin-Injektion ist jedoch noch gut tolerierbar. Somit konnten alle Tiere ohne Korrektur der Dosis zur Auswertung verwendet werden.

## 5 Diskussion

Unser Interesse an Myosmin basiert auf der Entdeckung von *Zwickenpflug*, dass dieses Tabakalkaloid auch in Nüssen vorhanden ist (Zwickenpflug et al., 1998). In weiteren Untersuchungen fand sich Myosmin in zahlreichen pflanzlichen Lebensmitteln, darunter Grundnahrungsmittel wie Kartoffeln, Reis, Mais und Weizen (Tyroller et al., 2002a). Somit lässt sich Myosmin nicht mehr als tabakspezifisches Alkaloid bezeichnen. Das Vorkommen von Myosmin in Kuhmilch und Muttermilch zeigt seine weite Verbreitung in der Nahrungskette über Pflanzen zu lebensmittelliefernden Tieren bis hin zum Menschen.

Aufgrund seiner Iminstruktur lässt sich Myosmin im sauren Milieu leicht nitrosieren. Dabei entsteht z.T. das tabakspezifische Nitrosamin NNN, aber hauptsächlich eine hoch reaktive Verbindung, die mit Wasser unter Bildung von 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) reagiert und in vitro auch an DNA bindet (Wilp et al., 2002b; Zwickenpflug, 2000). Durch Metabolisierung von NNN entstehen ebenfalls DNA-Addukte, die nach Hydrolyse HPB freisetzen. Diese Addukte werden für die krebserzeugende Wirkung von NNN in Ösophagus, Nasenhöhlen und Lunge verantwortlich gemacht (Hecht, 1998).

Zum Stoffwechsel von Myosmin gab es bis vor kurzem außer einer qualitativen Untersuchung der Metaboliten im Urin von Ratten keinerlei Studien (Hecht et al., 1981). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Verteilung, Bindung und Ausscheidung von Myosmin bei pigmentierten Ratten und Albinoratten mit Hilfe der Autoradiographie untersucht. Vergleichbare Untersuchungen finden sich in der Literatur für Nicotin, seine Metaboliten, Cotinin und Nicotin-1'-N-oxid, und seine Nitrosierungsprodukte, die tabakspezifischen Nitrosamine NNN und NNK (Appelgren et al., 1963; Brittebo und Tjälve, 1980 und 1981; Castonguay et al., 1983b, 1984b und 1985; Domelöf et al., 1987; Hansson und Schmitterlöw, 1962; Tjälve et al., 1968; Tjälve und Castonguay, 1984; Waddell und Marlowe, 1976 und 1980).

### 5.1 Verteilung von Myosmin

Nach intravenöser Applikation wurde Myosmin über das Blut rasch zu den meisten Organen des Körpers transportiert und hat somit wie Nicotin die Fähigkeit zelluläre Membranen schnell zu durchdringen und sich sowohl in der Intra- als auch Extrazellulärflüssigkeit zu verteilen (Hansson und Schmitterlöw, 1962). Myosmin zeigt wie Nicotin und andere basische Substanzen eine Affinität zu Melanin und eine Anreicherung im Magenfundus, in den Speichel- und Tränendrüsen und in der Nase, deren Epithelien ein saures Sekret produzieren. Die in den ersten Minuten nach Applikation gesehene hohe Anreicherung von Nicotin

in Gehirn, Hypophyse, Nebennierenmark, Milz, Pankreas, Knochenmark und autonomen Ganglien (Appelgren et al., 1963; Hansson und Schmitterlöw, 1962; Tjälve et al., 1986; Waddell und Marlowe, 1976) wird bei Myosmin nicht beobachtet. Hohe Gehalte an Radioaktivität, wie sie nach Myosmingabe im Präputium gefunden wurden, sind nicht für Nicotin, jedoch für NNN und NNK berichtet worden (Brittebo und Tjälve, 1981; Castonguay et al., 1983b). Die hohe Akkumulation von Radioaktivität in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, welche bis zu vier Stunden nach Myosmingabe gesehen wurde, ist ein neuer für Nicotin und seine Metaboliten sowie für tabakspezifischen Nitrosamine nicht beschriebener Befund. Die ungewöhnlich hohe Anreicherung wurde durch direkte Bestimmung der Radioaktivität in diesen Drüsen nach Entnahme aus den Rattenhälften, die nicht für die Autoradiographie verwendet wurden, eindeutig bestätigt (Abb. 4-47). Im leicht sauren Prostatasekret wäre eine Anreicherung wie im Speichelsekret denkbar, während in der leicht alkalischen Samenblasenflüssigkeit eine Assoziation mit Makromolekülen wie Mukopolysacchariden möglich wäre. Dies kann nur durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden. Ob dieser Befund tatsächlich spezifisch für Myosmin ist oder ob in den Untersuchungen mit Nicotin und TSNA diese Anreicherung übersehen wurde, weil sich auf den Autoradiogrammen in diesem Bereich auch der Darminhalt und die Harnblase darstellen, sollte ebenfalls experimentell überprüft werden.

## 5.2 Ausscheidung von Myosmin

Myosmin wurde von der Ratte rasch und überwiegend im Urin ausgeschieden (Tab. A12). Dies bestätigt die Ergebnisse von Stoffwechselfersuchen von *Wilp* (2002), die auch gezeigt hat, dass Myosmin überwiegend in Form von Metaboliten ausgeschieden wird. Eine rasche Metabolisierung und Ausscheidung ist auch für Nicotin und die TSNA beschrieben worden (Hecht, 1998; Gorrod und Jacob, 1999; Meiser, 1995; Richter und Tricker, 1994).

Die Ausscheidung über die Nieren spiegelt sich in den Autoradiogrammen durch hohe Anfärbung der Nieren und der harnleitenden Wege wieder. Weitere Ausscheidungswege sind der Magen (Kap. 5.2.1) und die Speichel- und Tränendrüsen. Auch die erhöhten Radioaktivitätsgehalte in der Nasenmuschel, den Lungen und der Präputialdrüse sind wahrscheinlich auf exkretorische Prozesse zurückzuführen. In dieser Hinsicht gleichen sich die Bilder mit jenen, die für Nicotin, NNN und NNK erhalten wurden (Appelgren et al., 1963; Brittebo und Tjälve, 1980 und 1981; Castonguay et al., 1983b, 1984b und 1985; Domelöf et al., 1987; Hansson und Schmitterlöw, 1962; Tjälve et al., 1968; Tjälve und Castonguay, 1983; Waddell und Marlowe, 1976 und 1980).

### 5.2.1 Toxikologische Bewertung der Myosminausscheidung in den Magen

Der Magen der Ratte ist gegliedert in eine drüsenfreie (Vormagen, pars cardiaca, saccus caecus) sowie in eine drüsenhaltige Zone (Drüsenmagen, pars fundica et pars pylorica). Diese beiden Zonen gehen am Margo plicatus ineinander über, in welchem sogenannte Cardiadrüsen zu finden sind. Der Vormagen ist mit kutaner Mucosa (mehrschichtiges Plattenepithel) ausgekleidet. Zelltypen der glandulären Mucosa des Magens sind Haupt-, Parietal-, Mucosa- und enteroendokrine Zellen sowie einfache Zylinderepithelzellen, welche die sogenannten foveolae gastricae oder „gastric pits“ auskleiden (Komarek et al., 2000).

Bereits sechs Minuten nach intravenöser Applikation von Myosmin konnte eine Akkumulation von Radioaktivität im Lumen des Drüsenmagens beobachtet werden. Neben der Ionisierung der beiden Ringstickstoffe wie beim Nicotin und des Pyridinstickstoffs wie bei den TSNA spielt beim Myosmin die pH-abhängige Ringtautomerie (Kap. 2.8) eine besondere Rolle. Durch Ringöffnung im sauren pH-Bereich entsteht eine wesentlich hydrophilere Aminoketon-Form. Durch die leichte Nitrosierung wird das Myosmin zusätzlich dem bereits zugunsten des Mageninhalts verschobenen Gleichgewicht entzogen. Abhängig vom pH-Wert wird Myosmin unter Bildung von NNN und HPB nitrosiert (Zwickenpflug, 2000). Optimale Reaktionsbedingungen für eine in vitro Nitrosierung liegen im Bereich von pH 2 bis pH 4. Bei der hier bevorzugten Bildung von HPB entstehen auch signifikante Mengen an DNA-Addukten (Wilp et al., 2002b). Diese Addukte werden ursächlich mit der tumorigenen Aktivität von NNN und NNK in Verbindung gebracht (Hecht, 1998). Für die Nitrosierung von Myosmin sind jedoch hohe Nitritkonzentrationen erforderlich (Wilp et al., 2002a), die zwar häufig im Speichel, aber nicht im Magensaft gesunder Menschen gefunden werden. Dies liegt hauptsächlich an der raschen Reaktion von Ascorbinsäure mit Nitrit (Iijima et al., 2002; Moriya, et al., 2002). Ascorbinsäure wird aktiv in den Magen sezerniert. Eine quantitativ bedeutsame Nitrosierung wird deshalb nur unmittelbar am Mageneingang oder bei der Refluxkrankheit im distalen Ösophagus postuliert. Myosmin könnte an diesen Prädilektionsstelle für die Entstehung von Adenokarzinomen sowohl nach Aufnahme mit der Nahrung, als auch nach Ausscheidung in den Magen und in den Speichel gelangen. Diese Überlegungen stützen die Hypothese, dass es durch Myosminnitrosierung zur Bildung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten in der Schleimhaut von Ösophagus und Cardia kommt und diese Initiation zur Entstehung von Tumoren beiträgt (siehe Kap. 5.3.1). Unter pathologischen Bedingungen, wie bakteriellen Bewuchs des Magens, ist auch eine Myosminnitrosierung im Bereich des Fundus denkbar.

## 5.3 Gewebefindung

Durch Behandlung der abgenommenen Schnitte mit einer Serie von Lösungsmitteln wurde die extrahierbare Radioaktivität soweit als möglich ausgewaschen. Die nach der Extraktion in den verschiedenen Organen noch zurückbleibende Radioaktivität kann einen Hinweis auf die an Makromoleküle, wie Proteine oder DNA, kovalent oder anderweitig irreversibel gebundene Menge an Myosmin oder seiner Metaboliten geben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein Teil der nach Extraktion noch vorhandenen Aktivität auf eine unvollständige Extraktion zurückzuführen ist, insbesondere in Bereichen wie dem Drüsenmagen, in denen vor Extraktion sehr hohe Radioaktivitätskonzentrationen vorlagen. Weitere Gründe für eine unvollständige Extraktion können eine zu große Schnittdicke oder zu kurzes Tauchen in den Extraktionslösungen sein. Die Höhe der prozentual extrahierbaren Radioaktivitätsmenge je Gewebe zeigte innerhalb der Schnitte jedoch deutliche Unterschiede. Daraus kann auf eine irreversible, nicht extrahierbare Bindung in einer Reihe von Organen und Geweben geschlossen werden. Dabei muss es sich nicht zwingend um eine kovalente Bindung im chemischen Sinn handeln, wie das Beispiel der Melaninbindung zeigt (siehe Kap. 5.3.2). Vorläufige Befunde aus unserer Arbeitsgruppe sprechen auch gegen eine kovalente Bindung in der Lunge (siehe Kap. 5.3.1). Hier könnte es sich um eine Rezeptorbindung an bestimmten Lungenzellen handeln wie sie für Nicotin und NNK berichtet wurde (Jull et al., 2001, Schuller et al., 2000).

Grundsätzlich kann die Ganzkörper-Autoradiographie nur Hinweise auf mögliche Bindungsorte des untersuchten Stoffes geben. Die Aufklärung der Natur der Bindung gelingt in der Regel erst nach Entnahme und weiterer Untersuchung der Organe. Alternativ kann mit Histoautoradiographie die gebundene Radioaktivität genauer lokalisiert und durch spezifische Färbemethoden die Co-Lokalisation mit entsprechenden subzellulären Strukturen dargestellt werden. Dies war im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht möglich.

### 5.3.1 Toxikologische Bewertung der Myosminbindung im Ösophagus

Die Wand des Ösophagus konnte zu allen Zeitpunkten auf den Autoradiogrammen lokalisiert werden (Abb. 4-37). Während zu frühen Zeitpunkten ein Beitrag von abgeschlucktem Speichel nicht völlig auszuschließen ist, kann die Markierung des Ösophagus nach 4 und 24 Stunden nicht mehr davon herrühren. Ein deutlich erhöhter Anteil nicht extrahierter Radioaktivität kann erst nach 24 Stunden nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass sich die längerfristig gebundene Aktivität nur auf einen kleinen Anteil der Ösophaguswand beschränkt und zu früheren Zeitpunkten von unspezifisch gebundener bzw. nicht vollständig

extrahierbarer Radioaktivität überlagert wird. Eine genaue Bestimmung der Lokalisation ist jedoch mit den vorliegenden Ergebnissen nicht möglich und bleibt weiteren mikroautoradiographischen Untersuchungen vorbehalten. Eine deutliche Akkumulation von Radioaktivität im Ösophagus von Mäusen und Ratten wurde auch 4 bis 24 Stunden nach NNN-Gabe beschrieben (Brittebo und Tjälve, 1980 und 1981). Nach *in vitro* Inkubation mit  $^{14}\text{C}$ -NNN lagerte der Rattenösophagus die Radioaktivität in Muskulatur und Mucosa ein, aber nur in letzterer war diese Aktivität nicht extrahierbar. Die Autoren interpretierten dieses Ergebnis als Hinweis auf eine metabolische Aktivierung *in situ*, die für die Organotropie von NNN von entscheidender Bedeutung ist (Brittebo und Tjälve, 1981). Vorläufige Ergebnisse eines Fütterungsversuchs aus unserem Arbeitskreis lassen vermuten, dass der erhöhte Anteil nicht extrahierbarer Radioaktivität im Ösophagus von Myosmin behandelten Ratten hauptsächlich auf eine DNA-Bindung zurückgeführt werden kann. 24 Stunden nach Absetzen des Myosminhaltigen Futters wurden in der DNA der Ösophagusschleimhaut mit einer hochempfindlichen massenspektroskopischen Analyse HPB-freisetzende Addukte gefunden, während in der Lunge keine Addukte nachzuweisen waren (Richter et al., 2002). Diese DNA-Addukte wurden inzwischen auch in der Schleimhaut des Ösophagus und der Cardia des Menschen nachgewiesen. Sie waren unabhängig vom Rauchstatus und korrelierten nicht mit dem gleichen Addukt in der Lunge (Hölzle, pers. Mitt.).

In Rattenversuchen mit NNN wurde das HPB-Addukt mit der Entstehung von Ösophaguskarzinomen in Zusammenhang gebracht (Hecht, 1998). Daher liegt die Vermutung nahe, dass HPB-Addukte nach Myosminbelastung auch ein initiierender Faktor beim Ösophagusadenokarzinom des Menschen sein könnten. Die Inzidenzrate für diesen Tumortyp ist in den vergangenen 30 Jahren in den USA und in Westeuropa stark angestiegen und erfährt mit einem jährlichen Zuwachs von 15-30% die höchste Steigerung aller Tumoren (Abb. 2-4; Bollschweiler et al., 2001). Seit einigen Jahren wird beobachtet, dass die Inzidenzrate für Plattenepithelkarzinome stagniert bzw. in einigen Ländern sogar sinkt. Das Plattenepithelkarzinom korreliert stark mit dem Rauch- und Trinkverhalten. Das Auftreten von Adenokarzinomen steht dagegen in direkter Beziehung zu Übergewicht und Fettleibigkeit. Dieser Einfluss kann teilweise mit dem häufigeren Vorkommen der Refluxösophagitis bei übergewichtigen Menschen begründet werden. Der gesteigerte Rückfluss von Magensaft in den unteren Ösophagus tritt bei 10% der deutschen Bevölkerung auf und scheint in Ländern mit westlicher Diät zuzunehmen. Aus einer Refluxösophagitis kann sich ein Barrett-Syndrom entwickeln. Dabei entsteht am Übergang zwischen dem Plattenepithel des Ösophagus und dem Zylinderepithel der Cardia ein spezialisiertes Epithel, das eine Präkanzerose für das Barrett-Adenokarzinom darstellt (DeMeester et al., 1999; Chen und Yang, 2001; Lagergren et al., 1999 und 2000, Stein et al., 2000).

Das entzündliche Gewebe eines Barrett-Ösophagus bietet optimale Verhältnisse für eine Nitrosierung. Zum einen liegt ein niedriger pH-Wert durch den aufsteigenden Magensaft vor, zum anderen kann die Nitrosierung durch die Gegebenheiten einer chronischen Entzündung, wie z.B. der hohen NO-Konzentration, gefördert werden (Bentz et al., 2000).

### 5.3.2 Melaninbindung von Myosmin

Melanin zählt zu den anhäemoglobinogenen Pigmenten und wird von speziellen Abkömmlingen des Neuralleistengewebes, den Melanozyten, gebildet. Es findet sich vor allem in Haut, Haaren und Auge sowie bei einigen Lebewesen auch in der Pia mater cerebri und dem Innenohr. Daneben synthetisieren Nerven- und Neurogliazellen des zerebralen nigralen Systems das Neuromelanin. Melanin entsteht durch mehrstufigen enzymatischen Umbau aus Phenylalanin über Hydroxyphenylalanin (= Tyrosin), Dihydrophenylalanin (= DOPA), Dopachinon, Dioxyindol- bzw. Indolcholinpolymerisation mit Hilfe der Enzyme Tyrosinase, Tyrosinpermease und DOPA-Oxidase (Dahme und Schröder, 1971).

In präklinischen Studien der pharmazeutischen Industrie wie auch in den meisten toxikologischen Untersuchungen werden Albinoratten und Albinomäuse verwendet, die kein Melanin besitzen. Bei pigmentierten Nagern findet sich Melanin nicht nur in der Haut und den Haaren, sondern auch in Bereichen der Uvea (Chorioidea, Corpus ciliare, Iris) sowie im Pigmentepithel der Retina (stratum pigmentosum retinae) (Leblanc et al, 1998; Liebich, 1999).

Eine Bindung an Melanin konnte bisher für viele strukturell und pharmakologisch nicht in Beziehung stehende Stoffe gefunden werden, beispielsweise für Arzneimittel wie Beta-Blocker, Beta-Agonisten, sympathomimetische Amine, Benzodiazepine, Malariamittel und Antibiotika (Leblanc, 1998, Steiner und Bühring, 1990). Um eine eventuelle Melaninbindung nachweisen zu können, wird deshalb für präklinische Studien neben der Untersuchung von albinotischen Tieren auch eine Verwendung von pigmentierten Tieren empfohlen. Methode der Wahl ist hierfür die Autoradiographie (Solon und Kraus, 2001; Steiner und Bühring, 1990; Steinke et al., 2000).

Auch für eine Reihe von Chemikalien wie organische Amine, Metalle und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sowie für verschiedene Drogen, wie Cocain und Codein, wurde eine starke Assoziation zu Melanin nachgewiesen (Larsson, 1993, Claffey et al., 2001). Für Myosmin war eine Melaninbindung ebenfalls zu erwarten, weil davon bereits für Nikotin, NNN und NNK berichtet worden war (Brittebo und Tjälve, 1980; Castonguay et al., 1984b und 1985; Domelöff et al., 1987; Tjälve und Castonguay, 1983; Waddell und Marlowe, 1976 und 1980).

Für die Bindung an Melanin werden zwei mögliche Mechanismen in Betracht gezogen, die reversible Bindung mittels elektrostatischer Interaktionen oder die irreversible, kovalente Bindung über freie Radikale (Ings, 1984). Der wohl entscheidende Faktor für eine Melaninbindung ist der Säure-Basen-Status und die Lipophilie der Moleküle (Leblanc, 1998). Melanin hat den Charakter eines Polyanions und zieht elektrostatisch basische Komponenten an (Larsson und Tjälve, 1979). In vivo Studien mit pigmentierten Mäusen zeigten ebenso wie in vitro Versuche mit synthetisiertem Melanin, dass Nicotin wesentlich stärker als Cocain und Flunitrazepam gebunden wird. Es konnten nur noch 10-50% des radioaktiven Nicotins aus dem Melanin extrahiert werden (Claffey et al., 2001; Stout und Ruth, 1999). Ein vergleichbar hoher Anteil nicht extrahierbarer Radioaktivität wurde in unseren Schnitten nach vier und 24 Stunden für das Melanin in Haut und Auge festgestellt. Es ist deshalb zu erwarten, dass sich die Haare für ein Biomonitoring der Myosminbelastung des Menschen eignen.

Zum Nachweis von Fremdstoffen und in der Forensik ist die Haaranalyse seit langem ein gern genutztes Instrument (Baumgartner et al., 1989). Dieser Test bietet zahlreiche Vorteile gegenüber der Untersuchung von Urin oder Serum, wie beispielsweise geringere Kosten bei Lagerung und Versand, sowie eine einfachere Probennahme, die auch einen geringeren psychischen Stress für die Testperson bedeutet. Außerdem kann ein eventueller Drogenkonsum über einen länger zurückliegenden Zeitraum verfolgt werden und die Proben können nur schwer gefälscht werden. In den Vereinigten Staaten werden 600 Millionen Dollar pro Jahr für Drogentests am Arbeitsplatz ausgegeben, 33 Millionen Vollzeitangestellte werden getestet. Drogentests am Arbeitsplatz schrecken Arbeiter effektiv vom Drogenmissbrauch ab (Hoffman et al., 1997). Zahlreiche Studien belegen eine Akkumulation und starke Bindung von Nicotin und Cotinin im Haar (Kintz 1992; Mizuno et al., 1993; Balabanova et al., 1990; Claffey et al., 2001). Eine Assoziation mit Melanin im sich neu bildenden Haar konnte innerhalb von Minuten nach systemischer Administration von Nicotin mittels Histoautoradiographie nachgewiesen werden (Stout und Ruth, 1999). Da die Assoziation von Nicotin zum Melanin von der Haarfarbe abhängig ist und dunkelhaarige Individuen mit mehr Eumelanin vermutlich mehr Nicotin im Haar akkumulieren, sollte bei der Interpretation von Haartests die Haarfarbe berücksichtigt werden, um eine Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden (Stout und Ruth, 1999). Auch die externe Ablagerung von Nicotin im Haar aus der Raumluft mittels ETS ist zu berücksichtigen. Bei sorgfältigem Waschen der Haare mit geeigneten Lösungsmitteln lassen sich externe Anlagerungen von der Einlagerung über die Melanosomen von der Blutseite (endogene Dosis) differenzieren (Gerstenberg et al., 1995). Dies wird auch wichtig sein, wenn man die Myosminbelastung des Menschen über die Konzentration in den Haaren bestimmen will, denn Myosmin wurde ebenso wie Nicotin im ETS nachgewiesen (Jenkins et al., 1996).

Trotz der starken Bindung an Melanin fiel die Konzentration der Radioaktivität in den melaninhaltigen Gebieten des Auges und der Haut innerhalb von 24 Stunden nach Myosmininjektion relativ rasch ab. Die Halbwertszeiten waren mit 1,01 und 1,17 Stunden nicht wesentlich länger als die für den Skelettmuskel (0,9 Stunden; Abb. 4-33). Es ist aber davon auszugehen, dass der gebundene Anteil im weiteren Verlauf nach der Myosmingabe wesentlich langsamer eliminiert wird, da der prozentuale Anteil an nicht extrahierbarer Radioaktivität im Beobachtungszeitraum angestiegen ist (Abb. 4-35). Der Abfall der Konzentration würde dann gemäß einer Kinetik 2. Ordnung mit einer längeren terminalen Halbwertszeit erfolgen. Für den  $\beta_1$ -selektiven Adrenozeptorantagonisten Bisoprolol wurde von *Steiner und Bühring* (1990) für die Elimination aus dem Auge pigmentierter Mäuse im Zeitraum zwei bis 28 Tage nach Applikation eine Halbwertszeit von sieben Tagen angegeben. Eine ähnlich lange terminale Halbwertszeit für die Ausscheidung mit dem Urin wurde bei Rhesusaffen nach NNK-Injektion beobachtet. Dies könnte auf einer Depotbildung in der pigmentierten Haut mit langsamer Abgabe des NNK beruhen (Meger et al., 1999).

Für die meisten Pharmaka ist keine direkte Konsequenz aus der Melaninbindung nachzuweisen (Leblanc et al., 1998). Auch wenn diese über Jahre therapeutisch genutzt werden, wie beispielsweise Benzodiazepine, führen sie zu keinen pathologischen Veränderungen. In seltenen Fällen jedoch könnte eine Bindung an Melanin von toxikologischer Relevanz sein. Für Chloroquin und Phenothiazine wurden Retinopathien beschrieben. Chloroquin, Chinin und Streptomycin besitzen ototoxisches Potenzial. Hautveränderungen, welche sich hauptsächlich als Hyperpigmentierung manifestieren, konnten nach Behandlung mit Chloroquin, Phenothiazinen und Chlorpromazin beobachtet werden. Auch eine Induktion maligner Melanome durch melaninaffine Stoffe wird diskutiert. Extrapiramidal-motorische Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, sind möglicherweise durch eine Störung in den neuromelaninhaltigen Nervenzellen im extrapyramidalen System verursacht. Da Melanin beim Fötus besonders intensiv synthetisiert wird, rät man von der Verabreichung von Pharmaka mit Affinität zu Melanin in der Schwangerschaft ab. Schwerhörigkeit und Retinopathien konnten bei Kindern diagnostiziert werden, deren Mütter während der Schwangerschaft mit Chinin oder Chloroquin behandelt wurden (Ings, 1984; Larsson, 1993). Im Falle der tabakspezifischen Nitrosamine hat die Melaninbindung vermutlich keine toxikologische Relevanz. Auch für die Akkumulation von Nicotin und Cotinin im Auge gibt es aus der Literatur keine Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Retinopathie des Rauchers. Die Einlagerung von Myosmin sollte ebenfalls toxikologisch unbedenklich sein, obwohl nicht völlig auszuschließen ist, dass bei entzündlichen Prozessen eine Nitrosierung mit nachfolgender DNA-Bindung auch im Auge erfolgen kann.

## 6 Zusammenfassung

Obwohl Myosmin neben Nicotin und Nornicotin zu den ersten strukturell aufgeklärten Tabakalkaloiden zählt, wurde es bisher nur wenig erforscht. Das Vorkommen von Myosmin beschränkt sich nicht allein auf den Tabak. In unserem Arbeitskreis gelang vor kurzem der Nachweis von Myosmin in einer Vielzahl von Lebensmitteln, beispielsweise in Reis, Weizen, Kartoffeln, Milchprodukten, Nüssen und Kakao.

Myosmin wird im sauren Milieu innerhalb weniger Stunden vollständig nitrosiert. Dabei entsteht z.T. das tabakspezifische Nitrosamin *N'*-Nitrosornnicotin (NNN), aber hauptsächlich eine hoch reaktive Verbindung, die an DNA bindet und mit Wasser unter Bildung von 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) abreagiert. HPB-Addukte entstehen auch nach metabolischer Aktivierung von NNN und werden für dessen krebserzeugende Wirkung in Ösophagus, Mundhöhle und Nasenraum der Ratte verantwortlich gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Pharmakokinetik von Myosmin bei Ratten untersucht. Hierfür wurde jeweils eine pigmentierte und eine nicht pigmentierte Ratte jeweils ein und 15 Minuten, sowie eine, vier und 24 Stunden nach intravenöser Injektion radioaktiv markierten Myosmins ( $5\text{-}^3\text{H}$ : 1,4 µg/kg; 8,49 MBq/kg oder  $2\text{-}^{14}\text{C}$ : 0,27 mg/kg; 3,74 MBq/kg) durch  $\text{CO}_2$ -Asphyxiation getötet und umgehend tiefgefroren. Es wurden Gefrierschnitte von 40 µm Dicke in der Sagittallinie angefertigt und mit Hilfe autoradiographischer Untersuchungen qualitativ und quantitativ ausgewertet. Zur Bestimmung der Gewebefixierung wurde ein Teil der Schnitte seriell mit Lösungsmitteln und Wasser extrahiert. Schnitte von Ösophagus und Auge unbehandelter Ratten wurden zusätzlich nach Inkubation mit radioaktivem Myosmin *in vitro* untersucht. Bei den vier und 24 Stunden nach Myosmininjektion untersuchten Ratten wurde außerdem im Stoffwechsellkäfig Urin und Faezes gesammelt.

Hohe Konzentrationen an Radioaktivität konnten **sechs Minuten** nach Applikation in der Harderschen Drüse, den Tränen-, Speichel-, und akzessorischen Geschlechtsdrüsen, den Nasenmuscheln, der Leber, den melaninhaltigen Bereichen des Auges und der Haut, aber auch in der Nierenrinde und der Drüsenmagenwand nachgewiesen werden. Die Inhalte von Magen und Blase zeigten ebenfalls eine Anreicherung von Radioaktivität. Sehr ähnlich war dieses Verteilungsmuster **15 Minuten** und **eine Stunde** nach der Applikation. Ösophagus, Nierenmark und akzessorischen Geschlechtsdrüsen stellten sich deutlicher dar und es erfolgte eine zunehmende Verteilung der Radioaktivität über den Inhalt des Gastrointestinaltrakts. **Vier Stunden** nach Myosmingabe konnte eine generelle Abnahme an Radioaktivität in den meisten der vorgenannten Organe beobachtet werden, mit Ausnahme der akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Die Markierung der Speiseröhre trat zu diesem Zeitpunkt deutlicher in den Vordergrund. Nach **24 Stunden** war der überwiegende Anteil der Radioaktivität

aus dem Körper eliminiert, lediglich im Melanin und in der Präputialdrüse wurde immer noch eine deutliche Anreicherung registriert.

Die hohe Akkumulation von Radioaktivität in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, welche bis zu vier Stunden nach Myosmingabe gesehen wurde, ist ein Befund der bei Nicotin, Cotinin und tabakspezifische Nitrosaminen nicht beschrieben wurde. Er wurde durch direkte Bestimmung der Radioaktivität in diesen Drüsen nach Entnahme aus den Rattenhälften, die nicht für die Autoradiographie verwendet wurden, bestätigt.

Durch Extraktion der Schnitte konnte die Radioaktivität aus den meisten Organen und Geweben weitgehend entfernt werden. Gewebe mit erhöhten Anteilen an nicht extrahierbarer Aktivität waren Melanin, Nasenmuscheln, Ösophagus, Lunge und Leber. Eine Markierung der Mucosa des Ösophagus sowie der pigmentierten Bereiche des Auges konnte auch nach *in vitro* Inkubation von Schnitten unbehandelter Ratten deutlich gemacht werden.

Die Abnahme der Radioaktivität folgte in den meisten Geweben zwischen 15 Minuten und 24 Stunden einer Kinetik erster Ordnung mit Halbwertszeiten zwischen 0,4 Stunden in den Speicheldrüsen und 1,2 Stunden im Melanin der Haut. Die Exkretion von Myosmin bzw. seiner Metaboliten über Urin und Faezes betrug innerhalb von 24 Stunden 72% und 15% der Dosis.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Speichel als auch Haare für das Biomonitoring einer Myosminbelastung des Menschen geeignet sein könnten. Der erhöhte Anteil an nicht extrahierbarer Radioaktivität in der Speiseröhre unterstützt unsere Hypothese, dass Myosmin als Initiator einen Beitrag zur Entwicklung des Ösophagus-Adenokarzinoms beim Menschen liefern kann.

## 7 Summary

### **Autoradiographic studies on myosmine toxicokinetics in rats**

Myosmine, a minor tobacco alkaloid was recently detected in a wide variety of nutritional plants including cereals, nuts, cocoa and dairy products. Under acidic conditions myosmine is easily nitrosated leading to pyridyloxobutylation either directly or through the formation of *N*-nitrosonornicotine (NNN). In NNN-treated rats DNA adducts releasing 4-hydroxy-(3-pyridyl)-1-butanone (HPB) are made responsible for tumours in oesophagus, oral and nasal cavities. Whereas the pharmacokinetics and metabolism of NNN have been studied in detail no such data have been available for myosmine. In the present study time-dependent distribution, binding and excretion of radiolabelled myosmine was investigated in pigmented and albino rats by quantitative whole-body autoradiography. One rat each was sacrificed by CO<sub>2</sub> asphyxiation six and 15 minutes as well as 1, 4 and 24 hours after intravenous injection

of myosmine ( $5\text{-}^3\text{H}$ : 1.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 8.49 MBq/kg or  $2\text{'-}^{14}\text{C}$ : 0.27 mg/kg; 3.74 MBq/kg). Sagittal sections of 40  $\mu\text{m}$  thickness obtained after deep freezing of the rats, were exposed to image plates either before or after serial extraction with solvents and water. Additionally, sections of eyes and oesophagus of untreated rats were incubated in vitro with  $2\text{'-}^{14}\text{C}$  myosmine. The rats killed four and 24 hours after myosmine injection were separately housed in metabolism cages for collection of urine and faeces.

High concentrations of radioactivity were present **six minutes** after myosmine application in Harder's gland, lacrimal, salivary and accessory genital glands, nasal cavity, liver, kidney cortex, wall of the stomach fundus as well as the melanin rich parts of the eye and skin. An accumulation of radioactivity was also seen in the contents of the stomach and bladder. A similar distribution pattern was evident after **15 minutes** and **one hour** with stronger accumulation in oesophagus, medulla of kidneys and accessory genital glands. An increasing labelling was observed throughout the contents of the gastrointestinal tract. **Four hours** after myosmine application the labelling intensity of most organs and tissues decreased considerably with exception of the accessory genital glands showing an extraordinary high concentration of radioactivity. Additionally, the oesophagus showed more marked labelling at this time. After **24 hours** nearly all of the applied labelled myosmine has eliminated from the body. However, a significant labelling was still present in melanin rich tissues and in the preputial gland.

The high accumulation of radioactivity in the accessory genital glands within the first four hours after myosmine injection is a new finding which has not been reported for similar compounds such as nicotine, cotinine and tobacco-specific nitrosamines. Direct determination of radioactivity in the excised glands confirmed the result obtained by quantitative autoradiography.

After extraction of the slices most of the radioactivity was removed from the tissues. An increased proportion of radioactivity remained in melanin rich tissues, nasal cavity, oesophagus, lung and liver. A distinct labelling of oesophageal mucosa as well as pigmented parts of the eyes could also be observed after in vitro incubation of slices from untreated rats.

In most of the tissues, the drop of radioactivity followed a first order elimination kinetic with half lives between 0.4 hours for salivary glands and 1.2 hours for skin melanin. Within 24 hours 72 and 15 percent of the dose have been excreted in urine and faeces, respectively.

The results demonstrate the suitability of saliva and hair for biomonitoring human myosmine uptake. The increased proportion of non-extractable radioactivity in the oesophagus supports our hypothesis of the possible implication of myosmine as an initiator of human oesophageal adenocarcinoma.

## 8 Literaturverzeichnis

- Amtliche Todesursachenstatistik (2001) Statistisches Bundesamt, Wiesbaden; <http://www.destatis.de>
- Anon (1998) Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen). Deutsche Forschungsgemeinschaft, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Appelgren LE Hansson E Schmitterlöw CG (1963) Localization of radioactivity in the superior cervical ganglion of cats following injection of C<sup>14</sup>-labelled nicotine. *Acta Physiol Scand* 59:330-336
- AG Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002) Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken
- Balabanova S Schneider E Bühler G (1990) Nachweis von Nicotin in Haaren. *Dtsch Apoth Ztg* 130:2200-2201
- Baumgartner WA Hill VA Hlahd WH (1989) Hair analysis for drug abuse. *J Forensic Sci* 34: 1433-1453
- Belitz H-D Grosch W (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Benowitz NL (1996) Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 18:188-204
- Bentz BG Simmons RL Haines GK Radosevich JA (2000) The yin and yang of nitric oxide: reflections on the physiology and pathophysiology of NO. *Head & Neck* 22:71-83
- Beratungskommission der DGPT (1995) Gesundheitsgefährdung durch Passivrauchen. *DGPT Mitt* 17:44-50
- Boffetta P Agudo A Ahrens W Benhamou E Benhamou S Darby SC Ferro G Fortes C Gonzalez CA Jöckel K-H Krauss M Kreienbrock L Kreuzer M Mendes A Merletti F Nyberg F Pershagen G Pohlman H Riboli E Schmid G Simonato L Trédaniel J Whitley E Wichmann H-E Winck C Zambon P Saracci R (1998) Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe. *J Natl Cancer Inst* 90:1440-1450
- Bollschweiler E Wolfgarten E Gutschow C Hölscher AH (2001) Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer* 92:549-555
- Brandänge S Lindblom L (1976) N-Vinyl as NH protecting group: a convenient synthesis of myosmine. *Acta Chem Scand* 30:39
- Brandänge S Rodriguez B (1983) Ring-chain tautomerism of myosmine. *Acta Chem Scand* 37:643-644
- Brandt I Brittebo EB (1989) The use of autoradiography as a tool to study xenobiotic metabolism. In: *Intermediary Xenobiotic Metabolism in Animals. Methodology, Mechanisms and Significance*; eds.: Hutson DH Caldwell J Paulson GD; Taylor & Francis, London New York Philadelphia, pp 295-314
- Brittebo EB Tjälve H (1980) Autoradiographic Observations on the Distribution and Metabolism of N'-[<sup>14</sup>C]nitrosornicotine in mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 98:233-242
- Brittebo EB Tjälve H (1981) Formation of tissue-bound N'-nitrosornicotine metabolites by target tissues of Sprague-Dawley and Fischer rats. *Carcinogenesis* 2:959-963

- Bush LP Fannin FF Chelvarajan RL Burton HR (1993) Biosynthesis and metabolism of nicotine and related alkaloids. In: Nicotine and related alkaloids: Absorption, distribution, metabolism and excretion; eds.: Gorrod JW Wahren J; Chapman & Hall, London
- 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* 686:213-228
- Caldwell WS Greene JM Plowchalk DR deBethizy JD (1991) The nitrosation of nicotine: a kinetic study. *Chem Res Toxicol* 4:513-516
- Castonguay A Lin D Stoner GD Radok P Furuya K Hecht SS Schut HAJ Klaunig JE (1983a) 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
- Castonguay A Rivenson A Trushin N Reinhardt J Spathopoulos S Weiss CH Reiss B Hecht SS (1984a). Effects of chronic ethanol consumption on the metabolism and carcinogenicity of N'-nitrosornicotine in F344 rats. *Cancer Res* 44:2285-2290
- Castonguay A Tjälve H Hecht SS (1983b) Tissue distribution of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and its metabolites in F344 rats. *Cancer Res* 43:630-638
- Castonguay A Tjälve H Trushin N d'Argy R Sperber G (1985) Metabolism and tissue distribution of tobacco-specific N-nitrosamines in marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Carcinogenesis* 6:1543-1550
- Castonguay A Tjälve H Trushin N Hecht SS (1984b) Perinatal metabolism of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in C57BL mice. *J Natl Cancer Inst* 77:1117-1126
- Chatenoud L LaVecchia C Franceschi S Tavani A Jacobs DR Parpinel MT Soler M Negri E (1999) Refined-cereal intake and risk of selected cancers in Italy. *Am J Clin Nutr* 70:1107-1110
- Chen XX Yang CS (2001) Esophageal adenocarcinoma: a review and perspectives on the mechanism of carcinogenesis and chemoprevention. *Carcinogenesis* 22:1119-1129
- Claffey DJ Stout PR Ruth JA (2001) <sup>3</sup>H-Nicotine, <sup>3</sup>H-Flunitrazepam, and <sup>3</sup>H-Cocaine incorporation into melanin: a model for the examination of drug-melanin-interactions. *J Anal Toxicol* 25:607-611
- Cottier H (1980) Autonomes Wachstum: Gutartige Tumoren und maligne Prozesse. In: Pathogenese: Ein Handbuch für ärztliche Fortbildung. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 177-270
- Dahme E Schröder B (1971) Pigment – Störungen im Pigmentstoffwechsel. In: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin; eds.: Kitt T Cohrs P; Enke-Verlag, Stuttgart, pp 179 -189
- DeMeester TR Peters JH Bremner CG Chandrasoma P (1999) Biology of gastroesophageal reflux disease: pathophysiology relating to medical and surgical treatment. *Annu Rev Med* 50:469-506
- Derendorf H Garrett ER (1987) Resorption. In: Pharmakokinetik: Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie; eds.: Derendorf H Garrett ER; Wiss Verl-Ges, Stuttgart, pp 73-87
- Deutsch-Wenzel RP Brune H Grimmer G Misfeld J (1985) Local application to mouse skin as a carcinogen specific test system for non-volatile nitroso compounds. *Cancer Lett* 29:85-92
- Doll R Peto R (1981) The courses of cancer. Quantitative estimates of available risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66:1191-1308

- Domellöf L Andersson M Tjälve H Veals S Trushin N Hecht SS (1987) Distribution and metabolism of N'-Nitrosornicotine in the miniature pig. *Carcinogenesis* 8:1741-1747
- Eisenbrand G Spiegelhalder B Preussmann R (1980) Nitrate and nitrite in saliva. *Oncology* 37:227-231
- Fiddler W Pensabene JW Piotrowski EG Doerr RC Wasserman AE (1973) Use of sodium ascorbate or erythorbate to inhibit formation of N-Nitrosodimethylamine in Frankfurters. *J Food Sci* 38:1084.
- Franke W (1992) *Nutzpflanzenkunde*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Fujifilm, Produktinformation; <http://home.fujifilm.com>
- Gerstenberg B Schepers G Voncken P Völkl H (1995) Nicotine and cotinine accumulation in pigmented and unpigmented rat hair. *Drug Metab Dispos* 23:143-148
- Giovino GA Schooley MW Zhu BP Chrismon JH Tomar SL Peddicord JP Merritt RK Husten CG Eriksen MP (1994) Surveillance for selected tobacco-use behaviors - United States, 1900-1994. *Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ* 43:1-43
- Gorrod JW Jacob P (1999) *Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands
- Griciute L Castegnaro M Béréziat JC Cabral JRP (1986). Influence of ethylalcohol on the carcinogenic activity of N-nitrosornicotine. *Cancer Lett* 31:267-275
- Hansson E Schmitterlöw CG (1962) Physiological disposition and fate of <sup>14</sup>C-labelled nicotine in mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther* 137:91-102
- Hansson E Schmitterlöw CG (1964) Metabolism of nicotine in mouse tissue slices. *Acta Physiol Scand* 61:380-392
- Hecht SS (1998) Biochemistry, biology and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 11:559-603
- Hecht SS Abbaspour A Hoffmann D (1988) A study of tobacco carcinogenesis XLII. Bioassay in A/J mice of some structural analogues of tobacco-specific nitrosamines. *Cancer Lett* 42:141-145
- Hecht SS Chen CB Dong M Ornaf RM Hoffmann D Tso TC (1977) Chemical studies on tobacco smoke LI: studies on non-volatile nitrosamines in tobacco. *Beiträge zur Tabakforschung* 9:1-6
- Hecht SS Chen CB Hirota N Ornaf RM Tso TC Hoffmann D (1978) Tobacco-specific nitrosamines: formation from nicotine in vitro and during tobacco curing and carcinogenicity in strain A mice. *J Natl Cancer Inst* 60:819-824
- 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
- Hecht SS Lin D Chen CB (1981) Comprehensive analysis of urinary metabolites of N'-nitrosornicotine. *Carcinogenesis* 2:833-838
- Hecht SS Young R Maeura Y (1983) Comparative carcinogenicity in F344 rats and Syrian golden hamsters of N'-nitrosornicotine and N'-nitrosornicotine-1-N-oxide. *Cancer Lett* 20:333-340
- Hecht SS Young R Rivenson A Hoffmann D (1982) On the metabolic activation of N-nitrosomorpholine and N'-nitrosornicotine: effects of deuterium substitution. In: *N-Nitroso Compounds: Analysis, Formation and Occurrence*; eds.: Bartsch H O'Neill IK Castegnaro M Okada M; IARC, Lyon, France, pp. 499-507

- 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
- Hoffman JP Larison C Sanderson A (1997) An analysis of worker drug use and workplace policies and programs. Substance Abuse and Mental Health Services Administration Office of Applied Studies, Analytic Series A-2
- Hoffmann D Brunnemann KD Prokopczyk B Djordjevic MV (1994) Tobacco-specific N-nitrosamines in Areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Environ Health* 41:1-52
- Hoffmann D Hecht SS (1990) Advances in tobacco carcinogenesis. In: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*; vol 3; eds.: Cooper CS Grover PL; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 63-102
- Hoffmann D Hoffmann I (1997) The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health* 50:307-364
- Hoffmann D Raineri R Hecht SS Maronpot R Wynder EL (1975) A study of tobacco carcinogenesis. XIV. Effects of N'-nitrosornicotine and N'-nitrosoanabasine in rats. *J Natl Cancer Inst* 55:977-981
- 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
- Hoffmann D Wynder EL (1994) Aktives und passives Rauchen. In: *Lehrbuch der Toxikologie*; eds.: Marquardt H Schäfer SG; B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim Leipzig Wien Zürich, pp 589-605
- Hölzle D (2002) Persönliche Mitteilung, Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München
- Hu MW Bondinell WE Hoffmann D (1979) Chemical studies on tobacco smoke: synthesis of carbon-14 labelled myosmine, nornicotine and N-nitrosornicotine. *J Labelled Compd* 10:79-88
- IARC (1986) Tobacco Smoking. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 38, IARC, Lyon
- 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
- Ings RMJ (1984) The melanin binding of drugs and its implications. *Drug Metabol Rev* 15:1183-1212
- Jenkins RA Palausky A Counts RW Bayne CK Dindal AM Guerin MR (1996) Exposure to environmental tobacco smoke in sixteen cities in the United States as determined by personal breathing zone air sampling. *J Expos Anal Environ Epidemiol* 6:473-502
- Jull BA Plummer HK Schuller HM (2001) Nicotinic receptor-mediated activation by the tobacco-specific nitrosamine NNK of a Raf-1/MAP kinase pathway, resulting in phosphorylation of c-myc in human small cell lung carcinoma cells and pulmonary neuroendocrine cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 127:707-717
- Kanekal S Sahai A Jones RE Brown D (1995) Storage-phosphor autoradiography: a rapid and highly sensitive method for spatial imaging and quantitation of radioisotopes. *J Pharmacol Toxicol Meth* 33:171-178
- Kintz P (1992) Gas chromatographic analysis of nicotine and cotinine in hair. *J Chromatogr* 580:347-353
- Kisaki T Tamaki E (1966) Transformation of tobacco alkaloids. *Phytochem* 5:293-300

- Klein O Binder R Steinke W (2000) Quantification of tissue self-absorption of weak  $\beta$ -radiation in lyophilized whole-body sections of rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 31:27-31
- Kleinsasser NH Wallner BC Harreus UA Kastenbauer ER Richter E Zwicklenpflug W (2002) Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 43:1038
- Klus H Kuhn H (1982) Verteilung verschiedener Tabakrauchbestandteile auf Haupt- und Nebenstromrauch (Eine Übersicht). *Beitr Tabakforsch Int* 11:229-265
- Koehl W Eisenbrand G (1999) N-nitroso compounds. In: *Toxicology*; eds.: Marquardt H Schäfer SG Mc Clellan RO Welsch F; Academic Press, San Diego London Boston New York Sydney Tokyo Toronto, pp 743-754
- Komarek V Gembardt C Krinke A Mahrous TA Schaetti Philippe (2000) Synopsis of the Organ Anatomy. In: *The Laboratory Rat*. ed.: Krinke GJ; Academic Press, San Diego San Francisco New York, pp 283-322
- 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
- Koppang N Rivenson A Reith A Dahle HK Evensen O Hoffmann D (1992) A study of tobacco carcinogenesis XLVIII. Carcinogenicity of N-nitrosornicotine in mink (*Mustela vison*). *Carcinogenesis* 13:1957-1960
- Korte F Schulze-Steinen HJ (1962) Umlagerung von  $\alpha$ -Aroyl-pyrrolidonen in konzentrierter Salzsäure zu Pyrrolidinderivaten. *Chem Ber* 95:2444-2452
- Lagergren J Bergström R Lindgren A Nyrén O (2000) The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia. *Int J Cancer* 85:340-346
- Lagergren J Bergström R Nyrén O (1999) Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 130:883-890
- Larsson B (1993) Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Res* 6:127-133
- Larsson BS Tjälve H (1979) Studies on the mechanism of drug-binding to melanin. *Biochem Pharmacol* 28:1181-1187
- Leblanc B Jezequel S Davies T Hanton G Taradach C (1998) Binding of drugs to eye melanin is not predictive to ocular toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 28:124-132
- Lee PN (1975) Tobacco consumption in various countries. (4<sup>th</sup> edition), Tobacco Research Council, London
- Leete E (1984) The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum*. *Beitr Tabakforsch* 12:113-116
- Leete E Chedekel MR (1972) The aberrant formation of (-)-N-methylanabasin from N-methyl-piperideinium chloride in *Nicotiana tabacum* and *N. glauca*. *Phytochem* 11:2751-2756
- Levi F Lucchini F Negri E La Vecchia C (1999) Worldwide patterns of cancer mortality, 1990-1994. *Eur J Cancer Prev* 8:381-400
- Liebich H-G (1999) Sinnesorgane. In: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*; eds.: Liebich H-G Böck P Budras KD Maierl J Reese S; Schattauer, Stuttgart New York, pp 332-344
- Luanratana O Griffin WJ (1982) Alkaloids of *Duboisia Hopwoodii*. *Phytochem* 21:449-451
- Maas J Binder R Steinke W (2000) Quantitative whole-body autoradiography: recommendations for standardization of the method. *Regul Toxicol Pharmacol* 31:15-21

- Machholz R Lewerenz HJ (1989) Lebensmitteltoxikologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Marquardt H (1996) Leserbrief zu DGPT Mitt 17:44-50 „Gesundheitsgefährdung durch Passivrauchen“. DGPT Mitt 19:64-65
- Maier M (2002) Persönliche Mitteilung. Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München
- McCoy GD Hecht SS Katayama S Wynder EL (1981) Differential effect of chronic ethanol consumption on the carcinogenicity of N'-nitrosopyrrolidine and N'-nitrosornicotine in male Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 41:2849-2854
- Meger M Richter E Zwicklenpflug W Oehlmann C Hargaden MB A-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
- Meiser H (1995) Metabolismus und biliäre Ausscheidung von Nitrosornicotin bei der wachen Ratte. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der LMU
- 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
- Mirvish SS Wallcave L Eagen M Shubik P (1972) Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenetic N-nitroso compounds. *Science* 177: 65-67
- Miyahara J (1989) The Image Plate: A new radiation image sensor. *Chemistry Today* 223:29-36
- Mizuno A Uematsu T Oshima A Nakamura M Nakashima M (1993) Analysis of nicotine content of hair for assessing individual cigarette smoking behavior. *Ther Drug Monit* 15:99-104
- Mori K Hamaoka T (1994) IP Autoradiography System (BAS). *Prot Nucl Acid Enzyme* 39:1-13
- 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
- Nachiappan V Mufti SI Chakravarti A Eskelson CD RajasekharanR (1994) Lipid peroxidation and ethanol-related tumor promotion in Fischer-344 rats treated with tobacco-specific nitrosamines. *Alcohol Alcohol* 29:565-574
- National Academy of Sciences (1981) The health effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. National Press, Washington DC
- National Cancer Institute (1999) Health effects of exposure to environmental tobacco smoke: The report of the California Environmental Protection Agency. Smoking and tobacco control monograph No 10. Bethesda; <http://cancercontrol.cancer.gov>
- National Cancer Institute (2001) Risks associated with smoking cigarettes with low machine - yields of tar and nicotine. Smoking and tobacco control monograph No 13. Bethesda; <http://cancercontrol.cancer.gov>
- Ohshima H Bartsch H (1981) Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. *Cancer Res* 41:3658-3662
- Richter E (1996) Leserbrief zu DGPT Mitt 17:44-50 „Gesundheitsgefährdung durch Passivrauchen“. DGPT Mitt 19:65-66

- Richter E Schlöbe D Hölzle D Wilp J (2002) Comparative DNA and hemoglobin adduct formation by dietary myosmine and N'-nitrosonornicotine in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365:R545
- 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
- Ridd JH (1961) Nitrosation, diazotization and deamination. *Q Rev Chem Soc* 16:1-49
- Riebe M Westphal K (1983) Studies on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by various tobacco alkaloids. *Mutat Res* 124:281-286
- Riebe M Westphal K Fortnagel P (1982) Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. *Mutat Res* 101:39-43
- Römpf Chemie Lexikon (1995) CD Version 1.0, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Royal College of Physicians (1983) Health or smoking? Follow-up report of the Royal College of Physicians, Pitman, London
- Scherer G Adlkofer F (1999) Tabakrauch in der Raumluft - Erfassung der Schadstoffbelastung durch Passivrauchen zur Bewertung des gesundheitlichen Risikos. *Gefahrenstoffe - Reinhalt Luft* 59:435-443
- Schuller HM Porter B Riechert A (2000) Beta-adrenergic modulation of NNK-induced lung carcinogenesis in hamsters. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:624-630
- Selenka F Brand-Grimm D (1976) Nitrate and nitrite in human food. Calculation of daily intake and its range. *Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig B* 162:1-20
- Shigematsu A Aihara M Motoji N Hatori Y Hamai Y Asaumi M Iwai S Ogawa M Miura K (1999) Proposition for assessment of quantitative whole-body autoradiography. *Exp Mol Pathol* 67:75-90
- Singer GM Taylor HW (1976) Carcinogenicity of N'-nitrosonornicotine in Sprague-Dawley rats. *J Natl Cancer Inst* 57:1275-1276
- Sisler EC (1969) Determination of myosmine with o-aminobenzaldehyde. *Anal Biochem* 31:183-188
- Solon EG Kraus L (2001) Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry. Survey results on study design, methods, and regulatory compliance. *J Pharmacol Toxicol Meth* 46:73-81
- Solon EG Lee F (2001) Methods determining phosphor imaging limits of quantitation in whole-body autoradiography rodent tissue distribution studies affect predictions of <sup>14</sup>C human dosimetry. *J Pharmacol Toxicol Meth* 46:83-91
- Spiegelhalter B Eisenbrand G Preussmann R (1976) Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet Toxicol* 14:545-548
- Starke K Hoffmann F Fichtl B Eichelbaum M Schwab M Forth W Henschler D Rummel W (2001) Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; eds.: Forth W Henschler D Rummel W Förstermann U Starke K; Urban & Fischer, München Jena, pp 1-82
- Stein HJ Feith M Feussner H (2000) The relationship between gastroesophageal reflux, intestinal metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus. *Langenbecks Arch Surg* 385:309-316
- Steiner K Bühring KU (1990) The melanin binding of Bisoprolol and its toxicological relevance. *Lens Eye Tox Res* 7:319-333

- Steinke W Archimbaud Y Becka Binder R Busch U Dupont P Maas J (2000) Quantitative distribution studies in animals: cross-validation of radioluminography versus liquid-scintillation measurement. *Regul Toxicol Pharmacol* 31:33-43
- Stoner GD Adams C Kresty LA Amin SG Desai D Hecht SS Murphy SE Morse MA (1998) Inhibition of N'-nitrosornicotine-induced esophageal tumorigenesis by 3-phenylpropyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 19:2139-2143
- Stout PR Ruth A (1999) Deposition of cocaine, nicotine, and flunitrazepam in mouse hair melanosomes after systemic administration. *Drug Metab Dispos* 27:731-735
- Swain ML Eisner A Woodward CF Brice BA (1949) Ultraviolet absorption spectra of nicotine, nornicotine and some of their derivatives. *J Am Chem Soc* 71:1341-1345
- Tannenbaum SR Sinsky AJ Weisman M Bishop W (1974) Nitrite in human saliva: Its possible relationship to nitrosamine formation. *J Natl Cancer Inst* 53:79-84
- Tannenbaum SR Weisman M Fett D (1976) The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet Toxicol* 14:549-552
- Tjälve H (1991) The tissue distribution and the tissue specificity of bioactivation of some tobacco-specific and other N-Nitrosamines. *Crit Rev Toxicol* 21:265-294
- Tjälve H Castonguay A (1983) The in vivo tissue distribution and in vitro target-tissue metabolism of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* 4:1259-1265
- Tjälve H Hansson E Schmiterlöv CG (1968) Passage of  $^{14}\text{C}$ -nicotine and its metabolites into mice foetuses and placentae. *Acta Pharmacol Toxicol* 26:539-555
- Tjälve H Löfberg B Castonguay A Trushin Hecht SS (1986) Perinatal disposition and metabolism in mice and hamsters of some N-Nitrosamines present in tobacco and tobacco smoke. *Banbury Rep* 23:179-195
- Trautwein G (1971) Tumorwachstum. In: *Lehrbuch der allgemeinen Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*; eds.: Kitt T Cohrs P; Enke-Verlag, Stuttgart, pp 354-384
- Tso TC Jeffrey RN (1953) Paper chromatography of alkaloids and their transformation products in Maryland tobacco. *Arch Biochem Biophys* 43:269-285
- Tyroller S Zwickelpflug W Richter E (2002a) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables, and milk. *J Agric Food Chem* 50:4909-4915
- Tyroller S Zwickelpflug W Richter E (2002b) Synthesis of  $^{14}\text{C}$ -labelled myosmine, [2'- $^{14}\text{C}$ ]-3-(1-pyrrolin-2-yl)pyridine. *J Labelled Cpd Radiopharm*, in press
- Ullberg S (1954) Studies on the distribution and fate of  $^{35}\text{S}$ -labelled benzylpenicillin in the body. *Acta Radiol Suppl* 118:1-110
- Ullberg S (1958) Autoradiographic studies on the distribution of labelled drugs in the body. *Proc Second UN Int Conf Peaceful Uses of Atomic Energy*, Geneva, 24:248-254
- Ullberg S (1977) The technique of whole body autoradiography: cryosectioning of large specimens. *Science Tools, The LKB Instrument Journal Special Issue* 2-29
- US Department of Health and Human Services (1989) Reducing the health consequences of smoking, 25 years of progress. A report of the Surgeon General. *CDC publ* 89:8411
- US National Research Council (1986) Environmental tobacco smoke-measuring exposures and assessing health effects. National Academy Press, Washington DC
- Vermeer ITM (2000) Nitrate exposure and endogenous formation of carcinogenic nitrosamines in humans. Dissertation at the Department of Health Risk and Analytical Toxicology, Maastricht University, Netherlands

- Waddell WJ Marlowe C (1976) Localization of nicotine-<sup>14</sup>C, cotinine-<sup>14</sup>C, and nicotine-1'-N-oxide-<sup>14</sup>C in tissues of the mouse. *Drug Metab Dispos* 4:530-539
- Waddell WJ Marlowe C (1980) Localisation of [<sup>14</sup>C]nitrosonornicotine in tissue of the mouse. *Cancer Res* 40:3518-3523
- Walters CL Hill MJ Rudell WSJ (1978) Gastric juice nitrite. Its source and relationship to hydrogen ion concentration. Environmental aspects of N-nitroso compounds. *IARC Sci Publ* 19:279-288
- Wang L Lubin JH Zhang SR Metayer C Xia Y Brenner A Shang B Wang Z Kleinerman RA (2000) Lung cancer and environmental tobacco smoke in a predicted non-industrial area of China. *Int J Cancer* 88:139-145
- Werle E Schievelbein H (1961) Tabellen zur Toxikologie, Pharmakologie und Chemie von Inhaltsstoffen des Tabaks und des Tabakrauchs. *Arzneimittelforsch* 11:1011-1016
- Williams DLH (1988) Nitrosation. Cambridge University press, Cambridge, UK
- Wilp J (2002) Endogene und exogene Nitrosierung von Myosmin. Ein Beitrag zur toxikologischen Relevanz. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU
- Wilp J Richter E Zwickenpflug W (2002a) Modulation of myosmine nitrosation in human gastric fluid by pH, nitrite and addition of tea components. *Proc AACR* 43:312
- Wilp J Zwickenpflug W Richter E (2002b) Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem Tox* 40:1223-1228
- Witkop B (1954) Infrared diagnosis of the hydrochlorides of organic bases II. The structure of myosmine. *J Am Chem Soc* 76:5597-5599
- Witschi H Espiritu I Maronpot RR Pinkerton KE Jones AD (1997) The carcinogenic potential of the gas phase of environmental tobacco smoke. *Carcinogenesis* 18:2035-2042
- World Health Organization (1997) Smoking prevalence. In: World Health Organization - Tobacco or Health: a global status report. WHO, Geneva, pp 1-30
- Zoltewicz JA Bloom LB Kem WR (1989) Quantitative determination of the ring-chain hydrolysis equilibrium constant for anabaseine and related tobacco alkaloids. *J Org Chem* 54:4462-4468
- Zwickenpflug W (2000) N-Nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (N-nitrosonornicotine). *J Agric Food Chem* 48:392-394
- 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* 46:2703-2076

**Tabelle A1: Ergebnisse der qualitativen Auswertung**

+: nachweisbar; ±: kaum nachweisbar; -: nicht nachweisbar; /: nicht auswertbar;  
vE: vor Extraktion; nE: nach Extraktion;

GEWEBE/ORGANE	(h)	0,10	0,10	0,25	1,00	4,00	24,00
	Ratte	R1	R6	R7	R8	R9	R10
Akzessorische Geschlechtsdrüse	vE	±	+	+	+	+	-
	nE	-	+	+	+	+	-
Dickdarm, Inhalt	vE	-	-	-	±	+	±
	nE	-	-	-	-	+	-
Dünndarm, Inhalt	vE	-	±	+	+	+	-
	nE	-	-	-	+	+	-
Tränendrüse	vE	+	+	+	+	+	-
	nE	-	-	-	-	-	-
Hardersche Drüse	vE	+	+	+	+	+	±
	nE	-	-	-	-	-	-
Harn	vE	+	+	+	+	+	+
	nE	+	+	+	+	+	+
Leber	vE	+	+	+	+	+	+
	nE	-	+	+	+	±	+
Lunge	vE	±	±	±	-	-	-
	nE	-	±	-	-	-	-
Vormagen, Inhalt	vE	-	-	-	+	+	-
	nE	-	-	-	+	+	-
Drüsenmagen, Wand	vE	+	+	+	+	+	-
	nE	±	±	+	+	+	-
Drüsenmagen, Inhalt	vE	+	+	+	+	+	-
	nE	±	+	+	+	+	-
Melanin, Auge	vE	/	+	+	+	+	+
	nE	/	+	+	+	+	+
Melanin, Haut	vE	/	+	+	+	+	+
	nE	/	+	+	+	+	+
Nasenmuscheln	vE	+	+	+	+	+	+
	nE	-	+	+	+	+	-
Nierenmark	vE	±	±	+	+	+	+
	nE	-	+	+	+	+	-
Nierenrinde	vE	+	+	+	+	±	+
	nE	-	-	+	+	+	-
Präputialdrüse	vE	+	+	/	/	/	+
	nE	-	-	/	/	/	+
Speicheldrüse	vE	+	+	+	+	-	+
	nE	-	-	-	-	-	-
Speiseröhre	vE	+	±	+	+	+	+
	nE	-	+	+	+	+	+

## Tabelle A2: Definieren der Blutstandards

Meßprobenergebnisse und Umrechnung in die equivalente Menge Myosmin:

Standard Nummer	Einwaage (g)	dpm/Einwaage	dpm/g	Bq/g	Myosmin (ng/g) *
1	0,1999	322.336	1.612.486	26.875	1.938,14
2	0,2015	161.131	799.658	13.328	961,16
3	0,1915	75.139	392.371	6.540	471,61
4	0,1978	31.283	158.155	2.636	190,10
5	0,2010	16.282	81.005	1.350	97,36
6	0,2030	8.314	40.956	683	49,23
7	0,2053	3.373	16.430	274	19,75
8	0,2033	1.689	8.308	138	9,99
9	0,2012	763	3.792	63	4,56
10	0,2072	270	1.303	22	1,57

\* Die Umrechnung in ng/g (22 463 400 dpm entsprechend 27 000 ng Myosmin) ergibt sich aus den Ergebnissen der Messung der Radioaktivitätsgehalts und der chemischen Dosierung der Applikationslösung (vgl. Abschnitt 2.3.5.3.2)

### Vom Programm Aida vorgegebene Beschriftungen der Tabellen A3 und A4:

„Ebene“	Angabe der Schnittebenen die zusammen ausgewertet wurden
„No“	Nummer der Region, in der Reihenfolge ihrer Definition automatisch durchnummeriert
„Name“	Name der Region, vom Benutzer definiert
„Grp“	Gruppennummer zu vom Benutzer definierten Gruppen
„Type“	Std: Standard Bkg: Untergrund (Background) Sum: Summe aller Regionen einer Gruppe Spalte leer: normale Region
„Area [mm <sup>2</sup> ]“	Flächeninhalt in mm <sup>2</sup>
„Integral [PSL]“	Intensität summiert über die ganze Region in PSL (Photostimulated Luminence ist eine herstellerdefinierte Einheit) nicht durch Untergrundabzug oder Eichung beeinflusst
„Integral-Bkg [PSL]“	Untergrundkorrierte bzw. geeichte Intensität der Fläche
„Integral/Area-Bkg [PSL/mm <sup>2</sup> ]“	Untergrundkorrierte bzw. geeichte Intensität pro Flächeneinheit bzw. Quotient der Werte aus den Spalten „Integral-Bkg [PSL]“ und „Area [mm <sup>2</sup> ]“
Std. Conc. [ng/g]	Vom Benutzer vorgegebene equivalente Standardkonzentration in ng/g für diese Region
Recalc. Conc. [ng/g]	Vom Programm rekalierte Konzentration [ng/g] für diese Region, basierend auf der aktuellen Kalibrierungskurve (hier: nach log gewichteter Regression)

**Tabelle A3: Kalibrierungsfunktion: „Region Calibration“**

Beispiel einer Kalibrierung einer Eichkurve, welche sich aus der Exposition der zur Ratte R6, Ebene E1-E4 zugehörigen Blutstandards ergab.

Name	Area [mm <sup>2</sup> ]	Integral [PSL]	Integral-Bkg [PSL]	Integral/Area-Bkg [PSL/mm <sup>2</sup> ]	Std. Conc. [ng/g]	Recalc. Conc. [ng/g]	Difference [ng/g]	Rel. Error [%]
Std 1	66,60	29581,60	29525,40	443,32	1938,14	1922,19	16,0	0,8231
Std 1	66,60	28897,10	28840,90	433,05	1938,14	1878,17	60,0	3,0941
Std 2	66,60	14819,70	14763,50	221,67	961,16	969,47	16,5	1,7176
Std 2	66,60	14437,00	14380,90	215,93	961,16	944,65	8,3	0,8643
Std 3	66,60	7298,70	7242,50	108,75	471,61	479,83	2,7	0,5668
Std 3	66,60	7132,30	7076,10	106,25	471,61	468,94	8,2	1,7420
Std 4	66,60	2999,80	2943,60	44,20	190,10	197,21	7,1	3,7416
Std 4	66,60	2877,70	2821,50	42,36	190,10	189,13	1,0	0,5094
Std 5	66,60	1547,80	1491,60	22,40	97,36	100,78	3,4	3,5179
Std 5	66,60	1513,20	1457,00	21,88	97,36	98,47	1,1	1,1439
Std 6	66,60	793,80	737,60	11,08	49,23	50,28	1,0	2,1260
Std 6	66,60	764,90	708,80	10,64	49,23	48,33	0,9	1,8206
Std 7	66,60	342,70	286,60	4,30	19,75	19,76	0,1	0,5261
Std 7	66,60	341,00	284,80	4,28	19,75	19,65	0,0	0,0674
Std 8	66,60	197,10	140,90	2,12	9,99	9,81	0,1	1,3364
Std 8	66,60	197,90	141,70	2,13	9,99	9,86	0,2	1,8344
Std 9	66,60	124,00	67,80	1,02	4,56	4,76	0,2	4,4225
Std 9	66,60	117,90	61,70	0,93	4,56	4,34	0,2	4,8882
Bkg	589,00	518,40	21,50	0,04	--	0,18	--	--
Bkg	589,00	553,50	56,60	0,10	--	0,46	--	--
Bkg	589,00	472,20	-24,70	-0,04	--	--	--	--
Bkg	589,00	466,10	-30,80	-0,05	--	--	--	--
Bkg	589,00	482,00	-14,90	-0,03	--	--	--	--
Bkg	589,00	508,80	12,00	0,02	--	0,10	--	--
Bkg	589,00	488,80	-8,00	-0,01	--	--	--	--
Bkg	589,00	485,10	-11,80	-0,02	--	--	--	--

**Tabelle A4: Auswertung Regionen: „Region Report“**

Im Aida errechneter „Region Report“ mit allen für die Berechnung wichtigen Informationen am Beispiel der Ebenen 1-4 der Ratte R6.

(Geschlechtsdrüse = akzessorischen Geschlechtsdrüse)

Ebene	No	Name	Grp	Type	Area [mm <sup>2</sup> ]	Integral [PSL]	Integral- Bkg [PSL]	Integral/Area -Bkg [PSL/mm <sup>2</sup> ]	Recalc. Conc. [ng/g]
1-4	29	Muskel	1		136,30	5092,50	4977,50	36,51	163,29
1-4	30	Muskel	1		53,50	1963,10	1918,00	35,88	160,50
1-4	31	Muskel	1		95,90	3367,90	3286,90	34,26	153,35
1-4	32	Muskel	1		112,50	4233,00	4138,10	36,79	164,54
1-4		Sum	1	Sum	398,20	14656,40	14320,40	35,96	160,87
1-4	33	Tränendrüse	2		22,30	6263,20	6244,40	280,65	1223,79
1-4		Sum	2	Sum	22,30	6263,20	6244,40	280,65	1223,79
1-4	34	Hardersche Drüse	3		5,20	1970,10	1965,70	375,85	1632,98
1-4	35	Hardersche Drüse	3		6,70	1975,40	1969,70	295,31	1286,92
1-4	36	Hardersche Drüse	3		1,90	537,90	536,30	285,28	1243,75
1-4		Sum	3	Sum	13,80	4483,40	4471,80	324,51	1412,37
1-4	37	Melanin, Auge	4		1,60	445,80	444,40	281,29	1226,53
1-4	38	Melanin, Auge	4		1,00	365,40	364,50	353,93	1538,90
1-4	39	Melanin, Auge	4		1,20	551,30	550,20	443,73	1923,90
1-4	40	Melanin, Auge	4		3,70	1580,20	1577,10	428,55	1858,93
1-4	41	Melanin, Auge	4		1,20	467,60	466,60	382,43	1661,20
1-4	42	Melanin, Auge	4		0,90	346,50	345,80	397,43	1725,55
1-4		Sum	4	Sum	9,60	3756,70	3748,60	389,67	1692,04
1-4	43	Haut, Melanin	5		3,80	389,00	385,80	102,34	451,89
1-4	44	Haut, Melanin	5		1,50	135,30	134,00	87,58	387,49
1-4	45	Haut, Melanin	5		2,20	161,10	159,30	73,41	325,49
1-4		Sum	5	Sum	7,50	685,40	679,10	90,91	401,98
1-4	46	Lunge	6		127,30	4450,40	4343,10	34,13	152,77
1-4	47	Lunge	6		138,40	6949,10	6832,40	49,38	220,04

## Fortsetzung von Tabelle A4

1-4	48	Lunge		6		141,50	6815,80	6696,40	47,33	211,03
1-4		Sum		6	Sum	407,10	18215,30	17871,90	43,90	195,88
1-4	49	Speiseröhre		7		2,90	267,60	265,20	92,41	408,57
1-4	50	Speiseröhre		7		1,40	84,50	83,30	58,70	260,98
1-4	51	Speiseröhre		7		2,30	180,90	179,00	79,19	350,81
1-4	52	Speiseröhre		7		2,60	301,20	299,00	113,68	501,30
1-4		Sum		7	Sum	9,20	834,30	826,50	90,03	398,09
1-4	55	Leber		9		380,30	46102,40	45781,60	120,38	530,48
1-4	56	Leber		9		411,90	49418,60	49071,10	119,15	525,12
1-4	57	Leber		9		156,10	19931,90	19800,20	126,82	558,49
1-4	58	Leber		9		197,70	25439,90	25273,20	127,87	563,06
1-4	63	Leber		9		1,90	177,80	176,20	94,24	416,54
1-4		Sum		9	Sum	1147,80	141070,50	140102,20	122,06	537,79
1-4	59	Vormagen, Inhalt		10		91,80	877,50	800,00	8,71	39,67
1-4	60	Vormagen, Inhalt		10		96,70	1394,20	1312,60	13,57	61,45
1-4	61	Vormagen, Inhalt		10		93,10	1291,60	1213,00	13,03	59,03
1-4	62	Vormagen, Inhalt		10		103,10	2209,30	2122,40	20,59	92,76
1-4		Sum		10	Sum	384,70	5772,60	5448,10	14,16	64,05
1-4	64	Drüsenmagen, Wand		12		6,00	651,70	646,60	107,41	473,98
1-4	65	Drüsenmagen, Wand		12		5,70	555,80	551,00	97,36	430,16
1-4		Sum		12	Sum	11,70	1207,50	1197,60	102,54	452,74
1-4	66	Drüsenmagen, Inhalt		13		150,70	21863,30	21736,20	144,23	634,18
1-4	67	Drüsenmagen, Inhalt		13		108,20	17600,40	17509,10	161,78	710,29
1-4	68	Drüsenmagen, Inhalt		13		85,40	13487,50	13415,40	157,11	690,04
1-4	69	Drüsenmagen, Inhalt		13		70,50	10700,90	10641,50	150,96	663,39
1-4		Sum		13	Sum	414,80	63652,10	63302,20	152,61	670,50
1-4	70	Dünndarm, Inhalt		14		17,30	1040,40	1025,90	59,44	264,23

## Fortsetzung von Tabelle A4

1-4	71	Dünndarm, Inhalt	14		14,30	1376,30	1364,20	95,13	420,46
1-4	72	Dünndarm, Inhalt	14		4,20	254,40	250,80	59,29	263,60
1-4		Sum	14	Sum	35,80	2671,10	2640,90	73,71	326,68
1-4	73	Dickdarm, Inhalt	15		68,90	530,20	472,00	6,85	31,27
1-4	74	Dickdarm, Inhalt	15		34,40	421,50	392,50	11,43	51,85
1-4		Sum	15	Sum	103,30	951,70	864,50	8,37	38,12
1-4	75	Nierenrinde	16		31,70	7753,70	7726,90	243,52	1063,77
1-4	76	Nierenrinde	16		39,90	9179,40	9145,80	229,27	1002,29
1-4	77	Nierenrinde	16		29,00	6512,30	6487,80	223,64	977,97
1-4	78	Nierenrinde	16		8,90	1878,40	1870,90	211,41	925,11
1-4	79	Nierenrinde	16		15,90	3976,70	3963,30	249,11	1087,86
1-4	80	Nierenrinde	16		2,20	618,80	616,90	275,42	1201,27
1-4	81	Nierenrinde	16		6,50	1538,00	1532,50	234,32	1024,08
1-4		Sum	16	Sum	134,20	31457,30	31344,10	233,62	1021,01
1-4	82	Nierenmark	17		52,40	7768,60	7724,40	147,44	648,09
1-4	83	Nierenmark	17		34,80	5034,90	5005,50	143,84	632,45
1-4	84	Nierenmark	17		17,70	2346,00	2331,00	131,40	578,42
1-4	85	Nierenmark	17		15,60	2143,50	2130,40	136,91	602,37
1-4		Sum	17	Sum	120,50	17292,90	17191,20	142,68	627,41
1-4	86	Geschlechtsdrüsen	18		25,60	3885,80	3864,20	150,83	662,80
1-4	87	Geschlechtsdrüsen	18		23,00	3822,10	3802,70	165,48	726,35
1-4	88	Geschlechtsdrüsen	18		11,50	2754,50	2744,80	238,88	1043,76
1-4		Sum	18	Sum	60,10	10462,40	10411,70	173,27	759,95

### Tabelle A5: Berechnung der gewichteten rekalkulierten Konzentrationen

Beispiel für die im Tabellenkalkulationsprogramm Excel ausgeführten Berechnungen. Die rekalkulierte Konzentration der akzessorischen Geschlechtsdrüsen der Ratte R6 wurde durch Wichtung der Flächeninhalte der Ebenen 1-4 und der Ebenen 5-8 ermittelt.

	A	B	C	D	E
1	Ebene	Name Organ	Fläche [mm <sup>2</sup> ]	rekalk. Konz. [ng/g]	gewichtete rekalk. Konz. [ng/g]
2	1-4	akzessorische Geschlechtsdrüsen	25,6	662,80	=C2*D2/C\$9 =130,42
3	1-4	akzessorische Geschlechtsdrüsen	23,0	726,35	=C3*D3/C\$9 =128,41
4	1-4	akzessorische Geschlechtsdrüsen	11,5	1043,76	=C4*D4/C\$9 92,26
5	5-8	akzessorische Geschlechtsdrüsen	24,8	710,59	=C5*D5/C\$9 =135,45
6	5-8	akzessorische Geschlechtsdrüsen	11,8	710,18	=C6*D6/C\$9 =64,41
7	5-8	akzessorische Geschlechtsdrüsen	18,5	658,63	=C7*D7/C\$9 =93,66
8	5-8	akzessorische Geschlechtsdrüsen	14,9	486,97	=C8*D8/C\$9 =55,77
9		Summe Fläche	=SUMME(C2:C8) = 130,1		
10		akzessorische Geschlechtsdrüsen			=SUMME(E2:E8) =700,39

**Tabelle A6: Zusammenfassung der quantitativen Auswertung zu Ratte R6: 0,1 Stunden nach Applikation**

vE: vor Extraktion; nE: nach Extraktion; x: nicht bestimmbar

Name Organ	gew. rekalk. Konz. [ng/g]		nicht extrahierbar (%)
	vE	nE	
Dickdarm, Inhalt	46,28	x	x
Drüsenmagen, Inhalt	635,69	75,20	11,83
Drüsenmagen, Wand	293,13	34,34	11,71
Dünndarm, Inhalt	344,71	18,86	5,47
akzessorische Geschlechtsdrüsen	700,39	53,76	7,68
Hardersche Drüse	1411,38	21,02	1,49
Harn	922,77	95,59	10,36
Leber	527,52	95,77	18,16
Lunge	193,71	37,41	19,31
Melanin, Auge	1178,30	253,29	21,50
Melanin, Haut	403,38	142,83	35,41
Muskel	157,24	14,50	9,22
Nasenmuscheln	426,20	27,20	6,38
Nierenmark	625,85	53,04	8,48
Nierenrinde	1019,25	24,03	2,36
Präputialdrüse	1070,32	31,00	2,90
Speicheldrüse	698,32	15,93	2,28
Speiseröhre	306,03	41,14	13,44
Tränendrüse	1223,79	28,68	2,34
Vormagen, Inhalt	74,50	10,16	13,64

**Tabelle A7: Zusammenfassung der quantitativen Auswertung zu Ratte R7: 0,25 Stunden nach Applikation**

vE: vor Extraktion; nE: nach Extraktion; x: nicht bestimmbar

Name Organ	gew. rekalk. Konz. [ng/g]		nicht extrahierbar (%)
	vE	nE	
Dickdarm, Inhalt	91,07	x	x
Drüsenmagen, Inhalt	1582,61	262,25	16,57
Drüsenmagen, Wand	445,58	84,66	19,00
Dünndarm, Inhalt	287,38	19,36	6,74
akzessorische Geschlechtsdrüsen	1810,97	586,61	32,39
Hardersche Drüse	1501,73	32,84	2,19
Harn	2915,28	268,71	9,22
Leber	554,36	107,40	19,37
Lunge	239,13	48,23	20,17
Melanin, Auge	1882,90	822,85	43,70
Melanin, Haut	704,42	255,01	36,20
Muskel	144,84	23,24	16,05
Nasenmuscheln	1528,08	165,66	10,84
Nierenmark	1244,05	111,01	8,92
Nierenrinde	726,71	74,08	10,19
Präpuialdrüse	x	x	x
Speicheldrüse	936,26	23,49	2,51
Speiseröhre	466,91	51,86	11,11
Tränendrüse	1730,75	49,58	2,86
Vormagen, Inhalt	212,69	29,38	13,81

**Tabelle A8: Zusammenfassung der quantitativen Auswertung zu Ratte R8: 1 Stunde nach Applikation**

vE: vor Extraktion; nE: nach Extraktion; x: nicht bestimmbar

Name Organ	gew. rekalk. Konz. [ng/g]		nicht extrahierbar (%)
	vE	nE	
Dickdarm, Inhalt	131,15	23,34	17,79
Drüsenmagen, Inhalt	952,60	325,25	34,14
Drüsenmagen, Wand	254,97	73,77	28,93
Dünndarm, Inhalt	798,22	91,27	11,43
akzessorische Geschlechtsdrüsen	2461,63	529,75	21,52
Hardersche Drüse	815,43	14,40	1,77
Harn	7090,40	546,78	7,71
Leber	325,40	59,38	18,25
Lunge	108,47	31,58	29,12
Melanin, Auge	1344,69	565,12	42,03
Melanin, Haut	343,93	144,03	41,88
Muskel	68,85	22,10	32,10
Nasenmuscheln	576,67	84,79	14,70
Nierenmark	648,88	90,98	14,02
Nierenrinde	369,35	57,16	15,48
Präputialdrüse	x	x	x
Speicheldrüse	280,44	18,03	6,43
Speiseröhre	203,00	47,78	23,54
Tränendrüse	1021,05	29,85	2,92
Vormagen, Inhalt	338,15	79,12	23,40

**Tabelle A9: Zusammenfassung der quantitativen Auswertung zu Ratte R9: 4 Stunden nach Applikation**

vE: vor Extraktion; nE: nach Extraktion; x: nicht bestimmbar

Name Organ	gew. rekalk. Konz. [ng/g]		nicht extrahierbar (%)
	vE	nE	
Dickdarm, Inhalt	1013,80	98,59	9,72
Drüsenmagen, Inhalt	221,34	74,35	33,59
Drüsenmagen, Wand	68,35	16,32	23,87
Dünndarm, Inhalt	339,06	54,74	16,14
akzessorische Geschlechtsdrüsen	2905,35	622,25	21,42
Hardersche Drüse	83,36	5,50	6,60
Harn	3798,31	252,82	6,66
Leber	77,31	13,87	17,94
Lunge	23,97	7,56	31,54
Melanin, Auge	597,98	347,31	58,08
Melanin, Haut	187,02	121,57	65,00
Muskel	18,25	5,35	29,30
Nasenmuscheln	79,18	31,25	39,47
Nierenmark	115,37	32,24	27,94
Nierenrinde	63,77	14,19	22,26
Präputialdrüse	x	x	x
Speicheldrüse	21,57	3,73	17,29
Speiseröhre	137,75	29,39	21,33
Tränendrüse	70,34	8,18	11,63
Vormagen, Inhalt	114,13	38,68	33,90

**Tabelle A10: Zusammenfassung der quantitativen Auswertung zu Ratte R10: 24 Stunden nach Applikation**

vE: vor Extraktion; nE: nach Extraktion; x: nicht bestimmbar

Name Organ	gew. rekalk. Konz. [ng/g]		nicht extrahierbar (%)
	vE	nE	
Dickdarm, Inhalt	10,69	x	x
Drüsenmagen, Inhalt	3,21	x	x
Drüsenmagen, Wand	6,16	x	x
Dünndarm, Inhalt	3,75	x	x
akzessorische Geschlechtsdrüsen	6,34	x	x
Hardersche Drüse	9,11	x	x
Harn	51,06	6,57	12,87
Leber	15,48	3,72	24,03
Lunge	5,73	x	x
Melanin, Auge	506,33	284,76	56,24
Melanin, Haut	65,89	54,57	82,82
Muskel	4,43	0,25	5,64
Nasenmuscheln	16,05	x	x
Nierenmark	16,80	x	x
Nierenrinde	15,55	x	x
Präputialdrüse	629,79	19,37	3,08
Speicheldrüse	5,83	x	x
Speiseröhre	7,81	3,53	45,20
Tränendrüse	4,52	x	x
Vormagen, Inhalt	8,77	x	x

**Tabelle A11: Halbwertszeiten**

Gewebe	Halbwertszeit für den Zeitraum		R <sup>2</sup>	Wichtung
	0,1 - 24 (h)	0,25 - 24 (h)		
Muskel	0,71		0,9949	keine
	0,88		0,9906	1/Y
Melanin, Auge		1,03	0,9998	keine
		1,01	0,9997	1/Y
Melanin, Haut		0,56	0,9708	keine
		1,17	0,9282	1/Y
Speiseröhre		0,49	0,9267	keine
		2,11	0,8301	1/Y
Nierenrinde	0,55		0,9851	keine
	0,69		0,9794	1/Y
Nierenmark		0,79	0,9983	keine
		0,97	0,9938	1/Y
Speicheldrüsen		0,42	0,9998	keine
		0,43	0,9997	1/Y
Nasenmuscheln		0,51	0,9990	keine
		0,57	0,9971	1/Y
Tränendrüsen		0,95	0,9992	keine
		0,83	0,9966	1/Y
Hardersche Drüse		0,85	1,0000	keine
		0,86	0,9999	1/Y
Leber		0,98	0,9977	keine
		1,15	0,9952	1/Y
Lunge		0,62	0,9966	keine
		0,81	0,9876	1/Y

**Tabelle A12: Untersuchung der Ausscheidung der Substanz mit Urin und Faezes**

**Zusammenfassung Meßprobenergebnisse:  
Flüssigszintillationszählung**

Material: Urin und Faezes

Nuklid:  $^{14}\text{C}$

Tier	Intervall (h)	Abgesetzte Menge	Probenart	Probenanzahl	Probenmenge	Mittelwert Aktivität (dpm je Probe)	Gesamtaktivität (dpm je abgesetzte Menge)
R9	0 - 4	0,39 mL	Harn	3	100 µL	1.651.860	6.442.252
R9	0 - 4	24,00 mL	Waschwasser	3	200 µL	32.792	3.935.072
R10	0 - 4	0,55 mL	Harn	3	100 µL	2.175.190	11.963.545
R10	4 - 24	12,50 mL	Harn	3	200 µL	205.248	25.656.042
R10	0 - 24	23,00 mL	Waschwasser	3	200 µL	5.252	6.039.352
R10	0 - 24	53,20 g	Faezes	3	1 g	95.901	5.101.930

**Tabelle A13: Messung der Radioaktivität in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen**

**Vergleich der Meßprobenergebnisse:**

**Autoradiographie (ARG) und Flüssigszintillationszählung (LSC)**

Material: akzessorische Geschlechtsdrüsen

Nuklid:  $^{14}\text{C}$

Zeitpunkt (h)	0,1	0,25	1	4	24
<b>ARG:</b>					
ng/g	700,39	1.810,97	2.461,63	2.905,35	6,34
dpm/g	582.703,55	1.506.678,70	2.048.010,64	2.417.178,84	5.278,22
<b>LSC:</b>					
Einwaage (g)	0,0339	0,0270	0,0445	0,0045	0,0185
dpm/Probe	21.801,80	32.895,50	95.926,80	13.381,80	282,73
dpm/g	643.120,94	1.218.351,85	2.155.658,43	2.973.733,33	15.282,70

**Tabelle A14: Messung Restradioaktivität im Schwanz****Zusammenfassung Meßprobenergebnisse:****Verbrennungsproben und  
Flüssigszintillationszählung**

Material: Rattenschwänze

Nuklid:  $^3\text{H}$ 

<b>Ratte</b>	<b>Verabreichung</b>	<b>Verbrennungsproben</b>	<b>%Anteil</b>
	<b>dpm/Tier</b>	<b>dpm/je Schwanz</b>	<b>je Schwanz</b>
<b>R1</b>	83.294.541	2.142.626,80	<b>2,57</b>

Nuklid:  $^{14}\text{C}$ 

<b>Ratte</b>	<b>Verabreichung</b>	<b>Verbrennungsproben</b>	<b>%Anteil</b>
	<b>dpm/Tier</b>	<b>dpm/je Schwanz</b>	<b>je Schwanz</b>
<b>R6</b>	38.232.707	4.413.980,00	<b>11,55</b>
<b>R7</b>	37.199.390	1.599.409,70	<b>4,30</b>
<b>R8</b>	38.277.634	433.042,00	<b>1,13</b>
<b>R9</b>	36.727.659	193.640,36	<b>0,53</b>
<b>R10</b>	35.200.148	25.883,87	<b>0,07</b>

## Danksagung

Dem kommissarischen Vorstand des Walther Straub-Institutes, Herrn Professor Dr. Peter Eyer, gilt mein Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Ganz besonders herzlich danke ich meinem Betreuer Herrn Professor Dr. Elmar Richter für die großzügige Unterstützung, die jederzeit gewährte freundliche Anleitung sowie für die vielen wertvollen Anregungen und die große Hilfestellung in fachlichen Fragen. Danke auch für die mir ermöglichte Teilnahme am 18. Europäischen Workshop zum Arzneimittel-metabolismus in Valencia.

Herrn Stefan Tyroller danke ich sehr für die geduldigen Erläuterungen zur Chemie, für die große Hilfsbereitschaft und für das Korrekturlesen der Arbeit.

Dem Team der Arbeitsgruppe Richter sowie Frau Iris Bahnemann danke ich für das stets angenehme Arbeitsklima.

Für die mir zur Verfügung gestellten Geräte und Materialien sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanke ich mich sehr bei Herrn Dr. Bernhard Ladstetter, dem Leiter des Instituts für Pharmakokinetik und Metabolismus der Merck KGaA.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Kurt Steiner für die vielen interessanten Denkanstöße und die motivierenden Worte.

Frau Gudrun Rickert, die durch ihre zahlreichen praktischen Tipps und Tricks und ihre vielen guten Ratschläge wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, gilt mein ganz besonderer Dank.

Für die schnell gewährte Hilfe bei der Synthese des  $^{14}\text{C}$ -markierten Myosmins bedanke ich mich bei Herrn Dr. Florian Huber und Herrn Hans-Werner Crößmann.

Bei Frau Theresia Manger-Harasim und allen weiteren Mitarbeitern der Abteilung Tierkinetik möchte ich mich für das immer gute Arbeitsklima und die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft bedanken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Reinhold Erben möchte ich für die Übernahme der Arbeit am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München danken.

Meinen Eltern danke ich herzlich für die Geduld, die sie für meinen langen Ausbildungsweg aufgebracht haben, für die Unterstützung und den immer vorhandenen Rückhalt.

## Lebenslauf

Name: Glas  
Vorname: Susanna  
Geburtsdatum: 28. Dezember 1969  
Geburtsort: Steinhöring  
Eltern: Antonia Glas, geb. Steidler und Johann Glas  
Geschwister: Julia und Manfred Glas

### Schulischer und beruflicher Werdegang:

1976 - 1980 Grund- und Hauptschule Ebersberg  
1980 - 1984 Gymnasium Grafing  
1984 - 1986 Realschule Ebersberg  
Abschluss mit dem Zeugnis der Mittleren Reife  
1986 - 1989 Ausbildung zur Kauffrau im Groß- und Außenhandel  
1989 - 1991 Kaufmännische Angestellte  
1991 - 1993 Besuch der städt. Berufsoberschule München  
Abschluss mit dem Zeugnis der fachgebundenen Hochschulreife  
1994 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife durch die Ergänzungsprüfung  
im Fach Latein  
1994 - 2000 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Abschluss mit dem 3. Staatsexamen  
10/2000 Approbation als Tierärztin  
01/2001 - 05/2001 Hospitanz an der I. Medizinischen Tierklinik der LMU München  
06/2001 - 09/2001 Praktikum in der Kleintierpraxis Dr. E. Dahmen, Dachau  
seit 10/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Walther Straub-Institut für  
Pharmakologie und Toxikologie und Anfertigung der Doktorarbeit zum  
Thema „Autoradiographische Untersuchungen zur Toxikokinetik von  
Myosmin in Ratten“, Betreuer Prof. Dr. E. Richter