

ABBAU VON NIKOTIN BEI HAMSTER UND RATTE

H.-P. HARKE, B. FRAHM, CH. SCHULTZ und W. DONTENWILL

Institut der Wissenschaftlichen Forschungsstelle im Verband der Cigarettenindustrie,
38 Gazellenkampf, 2000 Hamburg 54, Germany

(Received 4 July 1969; accepted 12 August 1969)

Abstract—Homogenates of hamster liver are two to three times more effective in degrading nicotine than those from rat liver. Hamsters synthesize 6 to 10 times more cotinine than do rats. Nicotine suffers not only oxidative degradation but also demethylation on incubation with liver homogenates.

ERSTE ausführliche Untersuchungen über den Abbau von Nikotin im Säugetierorganismus wurden seit 1938 von dem Arbeitskreis um Werle durchgeführt. Dabei wurde die Fähigkeit von Gewebeschnitten aus den Organen verschiedener Tierarten zum Abbau von Nikotin *in vitro* untersucht.^{1, 2} Ähnliche Versuche wurden von Miller und Larson³ durchgeführt. In beiden Fällen wurde nur das nicht umgesetzte Nikotin nach der Inkubation bestimmt, eine Erfassung von Abbauprodukten erfolgte nicht. Yamamoto und Mitarbeiter maßen die relative Fähigkeit verschiedener Organe des Kaninchens zum Abbau von Nikotin.⁴ Nach diesen Untersuchungen erbringt die Leber die Hauptabbauleistung für Nikotin. Unter den einzelnen Tierarten bestehen z. T. erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Aktivität. Sie ist z. B. beim Meerschweinchen doppelt so hoch wie bei der Ratte. Für die Ratte wurde dabei die Abbauleistung mit 150 μ g Nikotin/g Leber angegeben. Unter anderen Versuchsbedingungen wurde für die Ratte⁵ ein Wert von 500 Nikotin/g Leber gemessen.

Die Hauptmetaboliten des Nikotins und die Wege ihres Entstehens aus Nikotin im Organismus sind durch die Arbeiten von McKennis, Hucker, Decker und Papadopoulos⁵⁻⁹ weitgehend bekannt. Der Abbau des Nikotins kann über zwei verschiedene Eingangsstufen beginnen. Im Säugetierorganismus scheint die Hauptreaktion die enzymatische Oxydation des Nikotins zum Cottin zu sein.⁷ Daneben kann aber auch die Demethylierung des Nikotins zum Nornikotin, das dann weiter oxydiert wird, eine wichtige Rolle spielen.⁸

Wir haben in der vorliegenden Arbeit versucht zu zeigen, daß auch durch Leberhomogenate und nicht nur durch Leberschnitte von Hamstern und Ratten Nikotin abgebaut wird und daß dabei sowohl der oxidative Abbau zum Cottin als auch die Demethylierung zum Nornikotin eine Rolle spielen. Damit wollten wir sicherstellen, daß die Enzymaktivität nicht, wie von anderer Seite postuliert wurde,^{2, 10} durch Homogenisieren der Organe verlorengeht.

Durch quantitative Bestimmungen des nicht umgesetzten Nikotins und des entstandenen Cottins sollten gleichzeitig die Abbauleistungen der Leberhomogenate der beiden Tierarten gemessen und verglichen werden. Um zu einem Vergleich dieser

Inkubationsversuche mit den Abbauvorgängen im lebenden Tier zu kommen, wurde diesen Nikotin i.p. appliziert. Anschließend wurde deren Harn aufgefangen und auf Nikotin und dessen Metabolite qualitativ untersucht.

METHODE

Für die Versuche wurden männliche Wistar AF/Han Ratten mit einem Mittelgewicht von 150 g und männliche syrische Goldhamster (Züchter Seboth/Frankfurt) mit einem Mittelgewicht von 82 g benutzt. Die Tiere wurden gewogen und dekapitiert, anschließend wurde sofort die Leber entnommen, gewogen und jeweils die Organe von 3 Tieren gemeinsam in der doppelten Gewichtsmenge wäßriger, 1·15% iger KCl-Lösung mit Hilfe eines Homogenisators nach Potter 5 min lang bei 2-4° homogenisiert. Von jeder Leber wurde ein Stück histologisch untersucht, um leberkranke Tiere aus dem Versuch auszuschließen. 6 g Homogenat entsprechend 2 g Leber wurden mit den folgenden Zusätzen versetzt: 3 mg Glukose in 0·1 ml wäßriger Lösung, 220 μ mole Nikotinsäureamid in 0·2 ml wäßriger Lösung, 150 μ mole Mg Cl₂ in 0·1 ml wäßriger Lösung, 1·200 mg Nikotin in 0·2 ml wäßriger Lösung und 2 ml 0·2 M Dinatriumphosphatpuffer pH 8·6. Damit ergibt sich ein pH-Wert von 7·4 für den Ansatz. Alle Lösungen wurden in aqua bidest. angesetzt. Die derart angesetzten Lösungen wurden anschließend in Glasgefäßen 1½ Stunden unter Durchleiten von Carbogen im Schüttelwasserbad bei 37° inkubiert, danach wurde die Reaktion durch Zusatz von 5 ml 2 N Essigsäure beendet. Die Bestimmung des Nikotins und des Cotonins erfolgte nach der von uns früher beschriebenen Methode.¹¹

Für die Versuche zur Erfassung des Abbaus im lebenden Tier wurden Hamster und Ratten des obenbeschriebenen Typs in Stoffwechselkäfigen gehalten (Typ 3120 der Fa. Altromin GmbH). Den Hamstern bzw. den Ratten wurden über 5 Tage täglich 10 mg Nikotin/kg in einer 0·25% igen Lösung in physiologischer Kochsalzlösung bzw. 2·5 mg Nikotin/kg in einer 0·063% igen Lösung i.p. injiziert.

Der Harn wurde in vorgelegter 0·02N HCl aufgefangen und in Anlehnung an unsere Vorschrift (11) auf Nikotin und dessen Abbauprodukte untersucht. Für die dünn-schichtchromatographischen Identifizierungen auf Kieselgel-Fertigplatten F 254 wurden die folgenden Laufmittel benutzt:

1. Benzol, sek-Propanol und 25%iges Ammoniak 80:20:0·8
2. n-Butanol, Äthanol und 0·5 N Ammoniak 40:10:10
3. Chloroform, Methanol und Eisessig 60:10:1

Die getrennten Substanzen wurden mit Bromcyan und Benzidin angefärbt. Als Vergleichssubstanzen dienten Nikotin, Nornikotin (Schuchardt), Cotonin (synthetisiert nach McKennis *et al.*¹²) und Demethylcotonin (synthetisiert in Anlehnung an McKennis *et al.*¹²)

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisse der Inkubationsansätze zeigen eindeutig, daß Nikotin auch von Leberhomogenaten metabolisiert wird. Die Enzymaktivität ist nicht an die in Leberschnitten erhaltenen Zellstrukturen gebunden. Bei der Abbaureaktion spielen sowohl oxidative Reaktionen als auch die N-Demethylierung eine Rolle.

Bei den vergleichenden qualitativen Untersuchungen des Nikotinabbaus *in vivo* ergab sich, daß in beiden Fällen bei Hamster und bei Ratte Cotonin ein wesentlicher Abbauprodukt ist. Daneben entsteht Nornikotin. Demethylcotonin war nur im Urin,

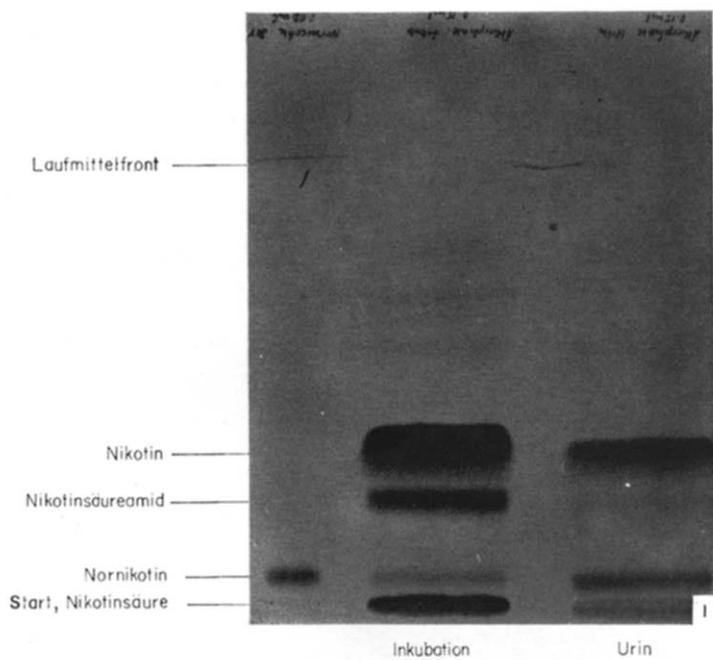


ABB. 1. Chromatographischer Vergleich der Ätherextrakte aus Inkubationsansätzen mit Hamsterleber und aus Hamsterurin. Nachweis von Nornikotin. Laufmittel: Benzol, sek. Propanol, 25%iges Ammoniak 80:20:0.8.

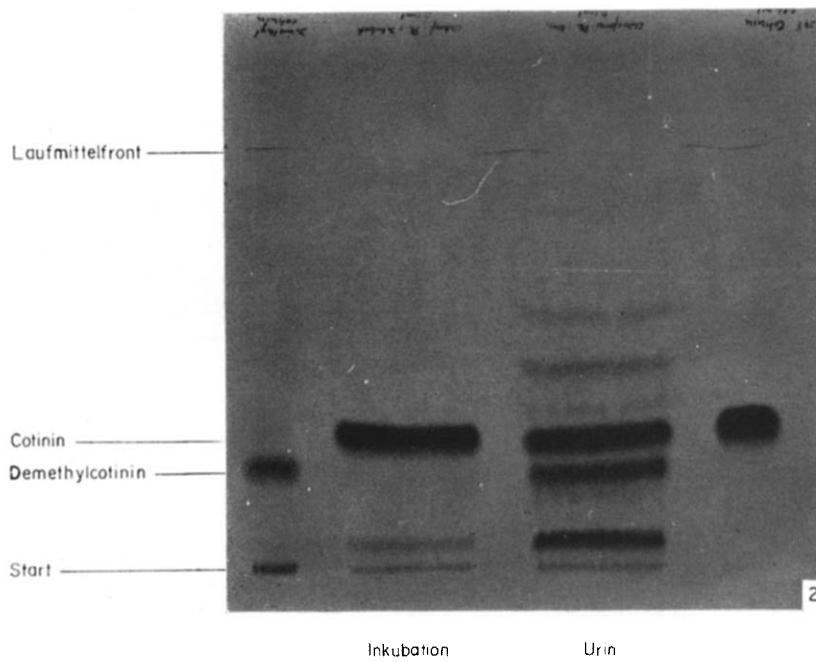


ABB. 2. Chromatographischer Vergleich der Chloroformextrakte aus Inkubationsansätzen mit Hamsterleber und aus Hamsterurin. Nachweis von Demethylcotinin (in Verbb. mit Abb. 3). Laufmittel Benzol, sek. Propanol, 25%iges Ammoniak 80:20:0.8.

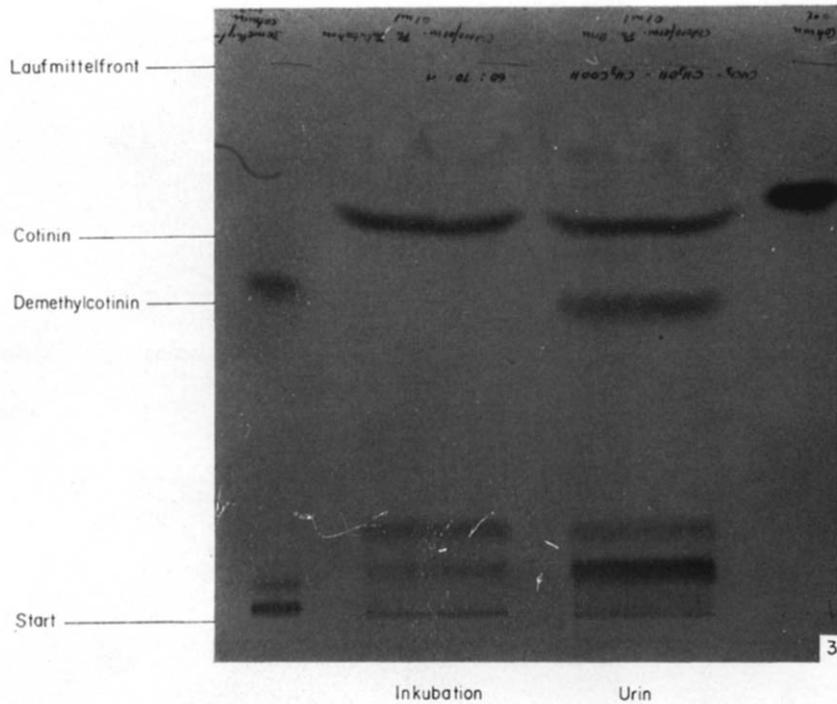


ABB. 3. Chromatographischer Vergleich der Chloroformextrakte aus Inkubationsansätzen mit Hamsterleber und aus Hamsterurin. Nachweis von Demethylcotinin (in Verbb. mit Abb. 2). Laufmittel Chloroform Methanol, Essigsäure 60:10:1.

nicht aber in Inkubationsansätzen nachweisbar. Selbstverständlich fand sich sowohl im Urin als auch in den Inkubationsansätzen unverändertes Nikotin.

Die quantitativen Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Tabelle zusammengefaßt. Die dort angegebenen Werte wurden aus den Ergebnissen von jeweils 5 bzw. 6 Inkubationsansätzen gemittelt. Je Ansatz wurde dabei wie erwähnt Homogenat aus der Leber von 3 Tieren eingesetzt. Mit Hamstern wurden zwei Versuchsserien durchgeführt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1% hinsichtlich der Abbauleistungen für Nikotin *in vitro*.

TABELLE 1. ERGEBNISSE QUANTITATIVER MESSUNGEN DES ABBAUS VON NIKOTIN DURCH LEBERHOMOGENATE VON HAMSTERN UND RATTEN. IN KLAMMERN SIND DIE STANDARDABWEICHUNGEN DER MEßWERTE ANGEgeben

Tierart	Mittelgewicht (g)	Mittelgewicht der Leber (g)	Abbau des Nikotins		entstandenes Cotinin (μg/g Leber)	Tierzahl in Gruppen
			(%)	(μg/g Leber)		
Ratten	150 (3.4)	7.1 (0.68)	26.4 (3.9)	158 (23)	35 (14)	15/5
	82 (7.4)	3.6 (0.36)	53.7 (7.5)	322 (45)	236 (14)	15/5
Hamster	76 (7.6)	3.9 (0.5)	82.3 (9.7)	494 (58)	380 (53)	September/ November 18/6 Februar/ März

vitro zwischen beiden Serien. Die erste Serie der Inkubation erfolgte von September bis November, die zweite von Februar bis März. Ob diese Differenzen auf den jahreszeitlichen Unterschied, auf genetische Unterschiede des verwendeten Tiermaterials oder auf andere Faktoren zurückzuführen ist, muß dahingestellt bleiben. Die Inkubationsansätze mit Rattenleberhomogenaten wurden im August und Dezember durchgeführt, dabei zeigten sich keine derartigen Unterschiede.

Zwischen Ratten und Hamstern besteht hinsichtlich der Nikotin-Abbauleistungen bzw. der Abbaugeschwindigkeit ein erheblicher Unterschied. Bezogen auf das Gramm Leber sind die von uns untersuchten Hamster während der konstanten Inkubationszeit zu einer zwei-bis dreimal größeren Abbauleistung fähig als die Ratten. Die von uns früher beschriebenen Beobachtungen¹³ über die größere Toxizität von Zigarettenrauch für Ratten im Vergleich mit Hamstern findet möglicherweise in den hier vorgelegten Befunden ihre Erklärung.

Zum Zeitpunkt des Abbruchs der Inkubation findet sich bei beiden Tierarten ein sehr unterschiedliches Verhältnis der Abbauprodukte des Nikotins zueinander. Während bei den Ratten nur rund 20% des abgebauten Nikotins als Cotinin vorliegen, sind es bei den Hamstern rund 70%. Ob sich hierbei der Einfluß von Enzymen bemerkbar macht, die den weiteren Abbau der Metaboliten steuern, ob unterschiedliche Anteile des Abbaus durch Oxidation bzw. Demethylierung eine Rolle spielen oder ob nur die Reaktionsgeschwindigkeit des Abbaus einen Einfluß hat, ist aus den vorliegenden Ergebnissen nicht erkennbar. Bei beiden Tierarten wurde in den Extraktten aus den Inkubationsansätzen eindeutig Nornikotin nachgewiesen; das Demethylcotinin war nicht nachweisbar.

Zusammenfassung—Homogenate von Hamsterleber bauen die zwei bis dreifache Menge Nikotin ab wie entsprechende Rattenleberhomogenate. Cotinin wird dabei vom Hamster in sechs- bis zehnfach größerer Menge synthetisiert als von der Ratte. Neben einem oxidativen Abbau unterliegt das Nikotin auch einer Demethylierung bei den Inkubationen.

LITERATUR

1. E. WERLE und E. USCHOLD, *Biochem. Z.* **318**, 531 (1948) und vorangehende Mitteilungen.
2. E. WERLE, H. SCHIEVELBEIN und D. SPIETH, *Arzneimittelforsch.* **6**, 322 (1956).
3. A. W. MILLER JR. and P. S. LARSON, *J. Pharmac. exp. Ther.* **109**, 218 (1953).
4. I. YAMAMOTO, Y. KUROGOCHI und M. TAKEUCHI, *Fol. pharmacol. Jap.* **51**, 2 (1955). Ref.: C. 1957, 1241.
5. H. MCKENNIS JR., L. B. TURNBULL und E. R. BOWMAN, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6597 (1958).
6. H. MCKENNIS JR., E. R. BOWMAN und L. B. TURNBULL, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **107**, 145 (1961).
7. H. B. HUCKER, J. R. GILETTE und B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **129**, 94 (1960).
8. K. DECKER und R. SAMMECK, *Biochem. Z.* **340**, 326 (1964).
9. N. M. PAPADOPoulos, *Can. J. Biochem.* **42**, 435 (1964).
10. H. SCHIEVELBEIN, in *Nikotin*, S. 25. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968).
11. H.-P. HARKE, B. FRAHM und CH. SCHULTZ, *Z. anal. Chem.* **244**, 119 (1969).
12. H. MCKENNIS JR., L. B. TURNBULL, E. R. BOWMAN und E. WADA, *J. Am. chem. Soc.* **81**, 3951 (1959).
13. G. RECKZEH, K. RÜCKER, H.-P. HARKE und W. DONTENWILL, *Arzneimittelforsch.* **19**, 237 (1969).