

**Aus der I. Medizinischen Klinik
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**ROLLE DES POLYAMINSTOFFWECHSELS IN DER
N-NITROSOMORPHOLIN-INDUZIERTEN LEBERKARZINOGENESE
VON RATTEN**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von

ELENA DORIS STEINBORN

aus Koblenz

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Löser, Rotes-Kreuz-Krankenhaus Kassel
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Culman, Institut für Experimentelle u. Klinische Pharmakologie

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14. Dezember 2012

gez.: Prof. Dr. Matthias Laudes

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALT

	Seite	
1.	Einleitung	1
1.1	Polyamine	1
1.1.1	Vorkommen und Eigenschaften der Polyamine	2
1.1.2	Der Polyaminstoffwechsel	3
1.1.3	Bedeutung der Polyamine für benignes und malignes Zellwachstum	7
1.1.4	Hemmung der Polyaminsynthese durch α -Difluoromethylornithin	8
1.2	Induktion der Hepatokarzinogenese durch N-Nitrosomorpholin	9
1.3	Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	11
2.	Material und Methoden	14
2.1	Chemikalien und Geräte	14
2.2	Applizierte Substanzen	16
2.3	Versuchstiere	17
2.4	Durchgeführte Untersuchungen	18
2.5	Tier- und Organpräparation	24
2.6	Parameteranalyse	26
2.6.1	Bestimmung der Polyaminkonzentrationen im Gewebe	26
2.6.2	Bestimmung der Enzymaktivitäten des Polyaminstoffwechsels	28
2.6.2.1	Ornithindecaboxylase (ODC)	28
2.6.2.2	S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC)	29
2.6.2.3	Spermidin-/Spermin-N ₁ -Acetyltransferase (SAT)	30
2.6.3	Bestimmung der trophischen Parameter	31
2.6.3.1	Desoxyribonukleinsäure (DNA)	31
2.6.3.2	Proteine	32
2.7	Statistische Analysen	32
3.	Ergebnisse	34
3.1	Vorzeitig verstorbene Versuchstiere	34
3.2	Körpergewicht, Organgewicht und Nahrungsaufnahme	35
3.3	Auswirkungen eines veränderten Polyaminhaushalts auf Tumorgenese und Tumorwachstum in der Leber	37

3.3.1	Erkrankungshäufigkeit	38
3.3.2	Gesamtzahl hepatozellulärer Karzinome und Adenome	40
3.3.3	Anzahl hepatozellulärer Karzinome und Adenome pro Tier	41
3.3.4	Malignitätsgrad und Größe der hepatozellulären Karzinome	42
3.3.5	Häufigkeit präneoplastischer Leberzellherde	43
3.3.6	Histologische Klassifizierung präneoplastischer Leberzellherde mittlerer Häufigkeit	44
3.4	Intrazellulärer Polyaminstoffwechsel	45
3.4.1	Leber	46
3.4.1.1	Ornithindecaboxylase (ODC)	46
3.4.1.2	S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC)	47
3.4.1.3	Spermidin-/Spermin-N ₁ -Acetyltransferase (SAT)	48
3.4.1.4	Putrescin (PUT)	48
3.4.1.5	Spermidin (SPD)	49
3.4.1.6	Spermin (SPM)	50
3.4.1.7	DNA und Proteine	50
3.4.2	Niere	50
3.4.2.1	Ornithindecaboxylase (ODC)	50
3.4.2.2	S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC)	51
3.4.2.3	Spermidin-/Spermin-N ₁ -Acetyltransferase (SAT)	51
3.4.2.4	Putrescin (PUT)	52
3.4.2.5	Spermidin (SPD)	52
3.4.2.6	Spermin (SPM)	53
3.4.2.7	DNA und Proteine	53
4.	Diskussion	86
4.1	Auswirkungen eines veränderten Polyaminhaushalts auf Tumorgenese und Tumorwachstum in der Leber	87
4.1.1	Reduzierung der exogenen enteralen Polyamine	88
4.1.2	Reduzierung der exogenen enteralen Polyamine unter gleichzeitig inhibierter intrazellulärer Polyamin de novo-Synthese	91
4.1.3	Erhöhte Zufuhr nahrungsgebundener Polyamine unter inhibierter oxidativer Degradation von intrazellulären Polyaminen	94
4.2	Auswirkungen eines veränderten Polyamihushalts auf intrazelluläre Regulationsmechanismen	97

4.2.1	Reduzierung der exogenen enteralen Polyamine	97
4.2.2	Reduzierung der exogenen enteralen Polyamine unter gleichzeitig inhibierter intrazellulärer Polyamin de novo-Synthese	101
4.2.3	Erhöhte Zufuhr nahrungsgebundener Polyamine unter inhibierter oxidativer Degradation von intrazellulären Polyaminen	103
4.2.4	Auswirkungen einer Karzinomerkrankung auf gesundes Leber- und Nierengewebe	106
5.	Zusammenfassung	108
6.	Literaturverzeichnis	110
7.	Danksagungen	122
8.	Lebenslauf	124

ABBILDUNGEN

		Seite
Abbildung 1	<i>Antony van Leeuwenhoek</i>	1
Abbildung 2	<i>Strukturformeln von Ornithin, Putrescin, Spermidin und Spermin</i>	3
Abbildung 3	<i>Polyaminstoffwechsel</i>	5
Abbildung 4	<i>Wistar Ratte</i>	18
Abbildung 5	<i>Intravitale Perfusionsfixation: Situs 1</i>	25
Abbildung 6	<i>Intravitale Perfusionsfixation: Situs 2</i>	25
Abbildung 7	<i>Histologischer Befund eines klarzelligen präneoplastischen Leberzellherdes</i>	57
Abbildung 8	<i>Makroskopischer Befund präneoplastischer Leberzellherde</i>	57
Abbildung 9	<i>Histologischer Befund eines klarzelligen hepatozellulären Adenoms</i>	58
Abbildung 10	<i>Makroskopischer Befund eines klarzelligen hepatozellulären Adenoms</i>	58
Abbildung 11	<i>Histologischer Befund eines klarzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G1</i>	59
Abbildung 12	<i>Makroskopischer Befund hepatozellulärer Karzinome des Malignitätsgrades G1</i>	59
Abbildung 13	<i>Histologischer Befund eines basophilzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G1</i>	60
Abbildung 14	<i>Klarzelliger Anteil in einem gemischtzelligen hepatozellulären Karzinom des Malignitätsgrades G2</i>	60
Abbildung 15	<i>Histologischer Befund eines basophilzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G2</i>	61
Abbildung 16	<i>Makroskopischer Befund eines basophilzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G2</i>	61
Abbildung 17	<i>Histologischer Befund eines basophilzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G3</i>	62
Abbildung 18	<i>Makroskopischer Befund eines basophilzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G3</i>	62
Abbildung 19	<i>Histologischer Befund eines Angiosarkoms</i>	63
Abbildung 20	<i>Makroskopischer Befund eines Angiosarkoms</i>	63
Abbildung 21	<i>Histologischer Befund eines Gallengangadenoms</i>	64

TABELLEN

		Seite
Tabelle 1	<i>Zeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit vorzeitig verstorbener Tiere</i>	20
Tabelle 2	<i>Kurzzeitgruppen</i>	21
Tabelle 3	<i>Langzeitgruppen</i>	21
Tabelle 4	<i>Zeitlicher Verlauf des Gradienten aus Puffer A und Puffer B zur Analyse von Polyaminen im Gewebe mittels HPLC</i>	27
Tabelle 5	<i>Gruppenstärken infolge des vorzeitigen Todes einzelner Versuchstiere</i>	35
Tabelle 6	<i>Häufigkeit und histologische Klassifizierung präneoplastischer Leberzellherde</i>	69

FORMELN

		Seite
Formel 1	Aktivitätsbestimmung der Ornithindecaboxylase (ODC)	29
Formel 2	Aktivitätsbestimmung der S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC)	30
Formel 3	Aktivitätsbestimmung der Spermidin-/ Spermin-N ₁ -Acetyltransferase (SAT)	31
Formel 4	Bestimmung der DNA- und Proteinkonzentration	32

DIAGRAMME

		Seite
Diagramm 1	Mittleres Körpergewicht in den Kurzzeitgruppen	54
Diagramm 2	Mittleres Körpergewicht in den Langzeitgruppen	54
Diagramm 3 a	Mittleres maximales Körpergewicht	55
Diagramm 3 b	Mittlerer „area under curve“-Wert	55
Diagramm 4	Mittleres Gewicht der linken Niere	56
Diagramm 5	Mittlerer Wasserverbrauch	56
Diagramm 6	Mittlerer Futtermittelverbrauch	56
Diagramm 7	Prozentualer Anteil erkrankter Tiere in den Kurzzeitgruppen	65
Diagramm 8	Prozentualer Anteil erkrankter Tiere in den Langzeitgruppen	65
Diagramm 9	Gesamtzahl hepatozellulärer Karzinome	66
Diagramm 10	Gesamtzahl hepatozellulärer Adenome	66
Diagramm 11	Durchschnittliche Anzahl hepatozellulärer Karzinome pro Tier	66
Diagramm 12	Durchschnittliche Anzahl hepatozellulärer Adenome pro Tier	66
Diagramm 13	Malignitätsgrad der hepatozellulären Karzinome bei Langzeittieren	67
Diagramm 14	Anzahl und Größe der hepatozellulären Karzinome bei Langzeittieren	68
Diagramm 15	Häufigkeit präneoplastischer Leberzellherde	70
Diagramm 16	Histologische Klassifizierung der mit einer mittleren Häufigkeit auftretenden präneoplastischen Leberzellherde	71
Diagramm 17	Aktivität der Ornithindecaboxylase im Lebergewebe	72
Diagramm 18	Aktivität der S-Adenosylmethionindecaboxylase im Lebergewebe	73
Diagramm 19	Aktivität der Spermidin-/Spermin-N ₁ -Acetyltransferase im Lebergewebe	74
Diagramm 20	Putrescinkonzentration im Lebergewebe	75
Diagramm 21	Spermidinkonzentration im Lebergewebe	76
Diagramm 22	Sperminkonzentration im Lebergewebe	77
Diagramm 23	DNA-Gehalt im Lebergewebe	78
Diagramm 24	Proteingehalt im Lebergewebe	78
Diagramm 25	Aktivität der Ornithindecaboxylase im Nierengewebe	79
Diagramm 26	Aktivität der S-Adenosylmethionindecaboxylase im Nierengewebe	80

Diagramm 27	Aktivität der Spermidin-/Spermin-N ₁ -Acetyltransferase im Nierengewebe	81
Diagramm 28	Konzentration von Putrescin im Nierengewebe	82
Diagramm 29	Konzentration von Spermidin im Nierengewebe	83
Diagramm 30	Konzentration von Spermin im Nierengewebe	84
Diagramm 31	DNA-Gehalt im Nierengewebe	85
Diagramm 32	Proteingehalt im Nierengewebe	85

ABKÜRZUNGEN

AcSpd	(N ₁)-Acetylspermidin	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A	MW	arithmetischer Mittelwert
AOM	Azoxymethan	NaCl	Natriumchlorid
AG	Aminoguanidin	NaOH	Natriumhydroxid
AS	Angiosarkom	N	Anzahl gültiger Werte
AUC	area under curve	NNM	N-Nitrosomorpholin
AZ	Antizym	ODC	Ornithindecaboxylase
AZI	Antizym-Inhibitor	PAD	polyaminarme Diät
CCA	cholangiozelluläres Adenom	PAO	Polyaminoxidase
CCC	cholangiozelluläres Karzinom	PAS-Reaktion	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
CGP 48664	4-Amidinoindan-1-2'-Amidino- hydrazan	PCA	Perchlorsäure
DAO	Diaminoxidase	p.o.	per os
DFMO	α-Difluoromethylornithin	PRD	polyaminreiche Diät
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PUT	Putrescin
DMH	1,2-Dimethylhydrazin	RNA	Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SAM-DC	S-Adenosylmethionin- decarboxylase
GABA	γ-Aminobuttersäure	SAT	Spermidin-/Spermin-N ₁ - Acetyltransferase
H33258	Bisbenzimidazol	s.c.	Subkutan
HCA	hepatozelluläres Adenom	SD	Standardabweichung
HCC	hepatozelluläres Karzinom	SK	Standardkost
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	SMO	Sperminoxidase
HPLC	High Performance Liquid- Chromatography	SPD	Spermidin
i.p.	intraperitoneal	SPM	Spermin
KCl	Kaliumchlorid	TNF	Tumornekrosefaktor
KG	Körpergewicht		

1 EINLEITUNG

1.1 Polyamine



Abbildung 1: Der am 24.10.1632 geborene und zunächst als Kaufmann, Tuchhändler und Feldmesser tätige niederländische Naturforscher Antony van Leeuwenhoek konstruierte über 200 Mikroskope und erforschte zahlreiche Mikroorganismen. Wimperntierchen, Geißeltierchen und Bakterien wurden durch ihn beschrieben. Er entdeckte die Blutzellen, untersuchte Muskelurgewebe und den Glaskörper des Auges. Seine intensiven Beobachtungen und Interpretationen auf dem Gebiet der Säuger-Spermien führten schließlich zur Erstentdeckung der Polyamine. (Lexikon der Biologie, 1998; Brockhaus, die Enzyklopädie, 1996).

1678 isolierte der Niederländer Antony van Leeuwenhoek (*Abbildung 1*) Kristalle aus menschlichen Samenzellen und beschrieb damit zum ersten Mal das Auftreten von Polyaminen (*Leeuwenhoek, 1678*). Zu den natürlichen Polyaminen zählen die aliphatischen Amine Spermidin und Spermin, deren Substanzbezeichnungen auf die ursprüngliche Entdeckung durch van Leeuwenhoek verweisen, sowie der Diaminvorläufer Putrescin. Putrescin wurde erstmals aus dem Choleraerreger isoliert und erhielt seinen Namen aufgrund des hohen Vorkommens in verwesendem Fleisch („putrefying flesh“) (*Wallace et al., 2003*). Mit der Herleitung der Strukturformel ermöglichte J. M. Charcot etwa 1920 die Synthese von Sperminphosphat. Kurze Zeit später gelang O. Rosenheim die chemische Herstellung von Spermidin und Spermin (*Rosenheim, 1924; Dudley et al., 1924; Dudley et al., 1926*). Ab 1950 stand zunächst die detaillierte Untersuchung des Polyaminstoffwechsels im Vordergrund, bis man zu Beginn der 80er Jahre mit dem Nachweis erhöhter intrazellulärer Polyaminkonzentrationen in proliferativ aktivem

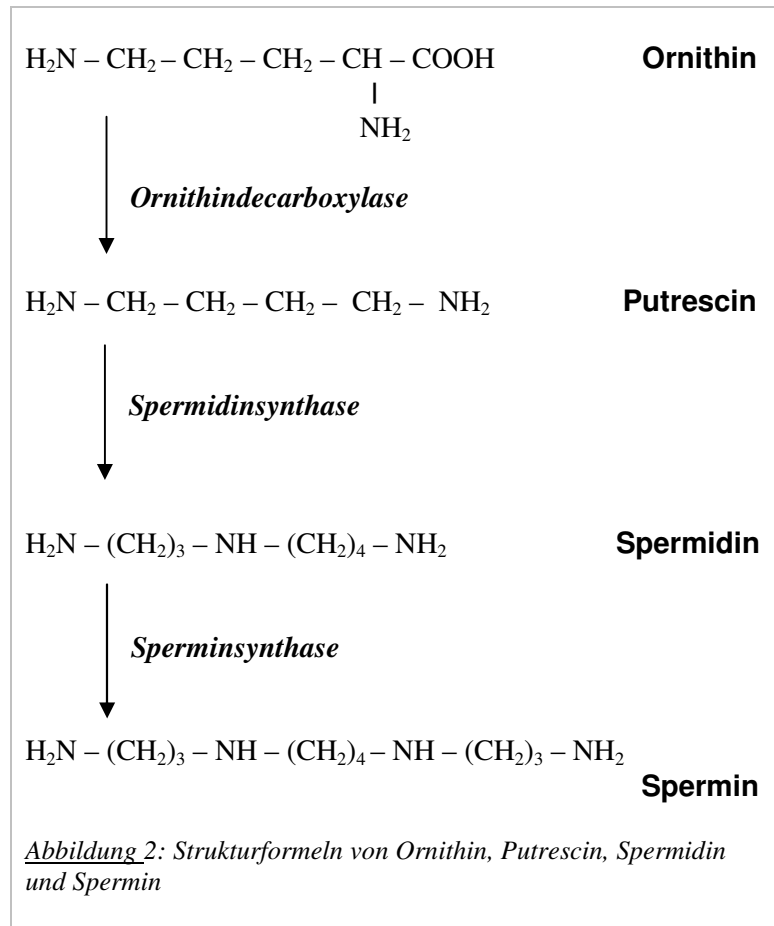
Gewebe zunehmend den regulativen Einfluss der Polyamine auf Differenzierungs- und Wachstumsprozesse der Zelle erkannte (*Pegg und Mc Cann, 1982; Russell, 1983; Heby et al., 1992; Löser et al., 1999; López-García et al., 2008*). Weitere Untersuchungen konzentrierten sich im Folgenden verstärkt auf die Rolle des Polyaminstoffwechsels bei malignem Zellwachstum, wobei verschiedene therapeutische Ansätze zugrunde gelegt wurden (*Marton und Pegg, 1995; Linsalata und Russo, 2008*): spezifische Enzyminhibitoren zur Reduzierung der intrazellulären Polyaminsynthese (*Kingsnorth et al., 1983; Pegg, 1988; Luk et al., 1989; Regenass et al., 1994; Dorhout et al., 1995 a und b; Löser et al., 1998; Seiler, 2003 a*), aber auch eine nahrungsvermittelte Reduzierung der Zufuhr exogener enteraler Polyamine (*Sarhan et al., 1989; Moulinoux et al., 1991; Löser et al., 1998; Löser et al., 1999*) oder der Einsatz von Polyaminanaloga (*Seiler et al., 1996; Frydman et al., 2003; Huang et al., 2003; Seiler, 2003 b; Hacker et al., 2008; Casero et al., 2009*) konnten an unterschiedlichen Tumor- und Wachstumsmodellen signifikante Ergebnisse hinsichtlich einer inhibitorischen Potenz auf das Zellwachstum erzielen. Neben der Tumorforschung verzeichnet die gezielte Beeinflussung des Polyaminstoffwechsels auch in anderen medizinischen Forschungsbereichen wie der Behandlung parasitärer Protozoeninfektionen (*Roberts et al., 2002; Heby et al., 2003*) oder der Schmerztherapie (*Estebe et al., 2006; Rivat et al., 2008*) beachtenswerte Erfolge.

1.1.1 Vorkommen und Eigenschaften der Polyamine

Polyamine werden mit der Ausnahme einiger Bakterienarten bei allen lebenden Spezies nachgewiesen (*Wallace et al., 2003*). Die Konzentrationen der Polyamine und der am Polyaminstoffwechsel beteiligten Enzyme unterscheiden sich je nach untersuchter Zellart, Spezies- bzw. Organzugehörigkeit, aber auch Lebensalter oder aktuellen Wachstumsbedingungen (*Seiler, 1990*). Entsprechend ihrer wachstumsfördernden Funktion liegen sie relativ hoch konzentriert in der Milch von Menschen und Säugetieren vor (*Löser, 2000*). Auch die Zellen von Säugetieren zeichnen sich durch vergleichsweise hohe Polyaminkonzentrationen aus (*Pegg und Mc Cann, 1982*). Gleiches gilt für sekretorische Drüsen wie Pankreas und Prostata (*Tabor und Tabor, 1984*). Schließlich variieren die Polyaminkonzentrationen auch innerhalb der Zelle, wobei das Zytoplasma gegenüber dem Zellkern deutlich höhere Konzentrationen aufweist.

EINLEITUNG

Polyamine sind aliphatische, niedermolekulare Polykationen mit 2 (Putrescin), 3 (Spermidin) oder 4 (Spermin) Aminogruppen, die bei einem physiologischen pH-Wert mit Protonen besetzt sind (Jänne *et al.*, 1991) (Abbildung 2). Aufgrund ihrer kationischen Eigenschaften zeigen sie eine hohe Reaktionsbereitschaft mit polyanionischen Makromolekülen und weisen zahlreiche Interaktionspartner wie DNA, RNA, Proteine, Phospholipide oder negativ geladene Zellmembranbestandteile auf (Pegg, 1988; Fredericq *et al.*, 1991).



Zu den vielfältigen Effekten der Polyamine zählt die Stabilisierung der 3fach-Helix-Struktur von DNA; eine Eigenschaft, die insbesondere im Forschungsbereich der genetischen Tumorthherapie genutzt wird (Hampel *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1996). Polyamine beeinflussen die Funktion bestimmter Ionenkanäle und Rezeptoren (Johnson, 1996; Williams, 1997; Nichols und Lopatin, 1997). Indem sie mit Proteinen und Phospholipiden Komplexe bilden, erhöhen sie die Stabilität biologischer Membranen (Schuber, 1989). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Polyamine die intrazelluläre Bildung freier Sauerstoffradikale unterbinden und damit zum Schutz der Zelle vor Oxidationsschäden beitragen (Tadolini, 1988 a und b).

1.1.2 Der Polyaminstoffwechsel

Der zellulären Polyaminhomöostase dienen mehrere intra- und extrazelluläre Mechanismen (Abbildung 3). Hierzu zählen die Polyamin de novo-Synthese, der Interkonversionsstoffwech-

EINLEITUNG

sel, die zelluläre Polyaminaufnahme sowie die oxidative Degradation und die extrazelluläre Ausschleusung acetylierter Polyaminderivate (*Seiler et al., 1985; Pegg, 1988; Seiler, 1990; Persson et al., 1992; Seiler, 1992*).

Die intrazelluläre Neubildung von Polyaminen geschieht im Rahmen der Polyamin de novo-Synthese. Das Schlüsselenzym der Polyamin de novo-Synthese ist die Ornithindecaboxylase (ODC), die die Decarboxylierung von Ornithin zu Putrescin katalysiert. Ihre Ornithinvorräte bezieht die Zelle aus extrazellulären Ressourcen und aus intrazellulärem Arginin (*Pegg, 1988*). Die Ornithindecaboxylase ist ein schnell und potent induzierbares Enzym. Mit ca. 10 - 60 min weist sie die kürzeste Halbwertszeit der im Säugetierorganismus vorkommenden Enzyme auf (*Heby, 1985*). Die ODC-Regulierung erfolgt durch eine Vielzahl komplexer Mechanismen (*Cannellakis et al., 1981; Pegg und Mc Cann, 1982; Tabor und Tabor, 1984; Pegg, 1988; Persson et al., 1988; Pegg et al., 1992*). Intrazellulär ansteigende Polyaminkonzentrationen hemmen die Aktivität der ODC, niedrige Polyaminspiegel dagegen wirken induzierend. Dieser feedback-Steuerung liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde. Unter anderem beruht sie auf der polyaminvermittelten Induktion des ODC-spezifischen Inhibitors „Antizym“ (AZ), der das Enzym bindet und es hemmt (*Murakami et al, 1985*). Unabhängig davon wirkt sich AZ auch direkt inhibierend auf die zelluläre Polyaminaufnahme aus (*Mitchell et al., 1994; Suzuki et al., 1994; Sakata et al., 2000*). Im Gegenzug aktiviert ein stimuliertes Zellwachstum einen „Antizym-Inhibitor“ (AZI), der aufgrund seiner höheren Bindungsaffinität ODC aus der Kopplung an AZ herauslöst (*Nielsson et al., 2000*).

Das durch die ODC-katalysierte Decarboxylierung aus Ornithin gewonnene Putrescin wird mit der spermidinsynthesevermittelten Ankopplung eines Aminopropylrestes in Spermidin umgewandelt (*Abbildung 3*). Aus Spermidin entsteht nach Anbindung einer zweiten Aminopropylgruppe Spermin. Katalysator ist hierbei die Sperminsynthase. Die Entstehung des Aminopropylrestes wird durch das zweite Schlüsselenzym der Polyaminsynthese, der S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC), katalysiert. Die SAM-DC decarboxyliert das aus L-Methionin entstehende S-Adenosylmethionin. Das Reaktionsprodukt dissoziiert spontan zu S-Methylthioadenosin und dem nötigen Aminopropylrest. S-Methylthioadenosin wird zu L-Methionin regeneriert und damit erneut der intrazellulären Polyaminsynthese als Substrat zugeführt. Wie die Ornithindecaboxylase ist auch die S-Adenosylmethionindecaboxylase ein komplex reguliertes Enzym mit einer niedrigen Halbwertszeit von ca. 50 - 120 min. Hohe

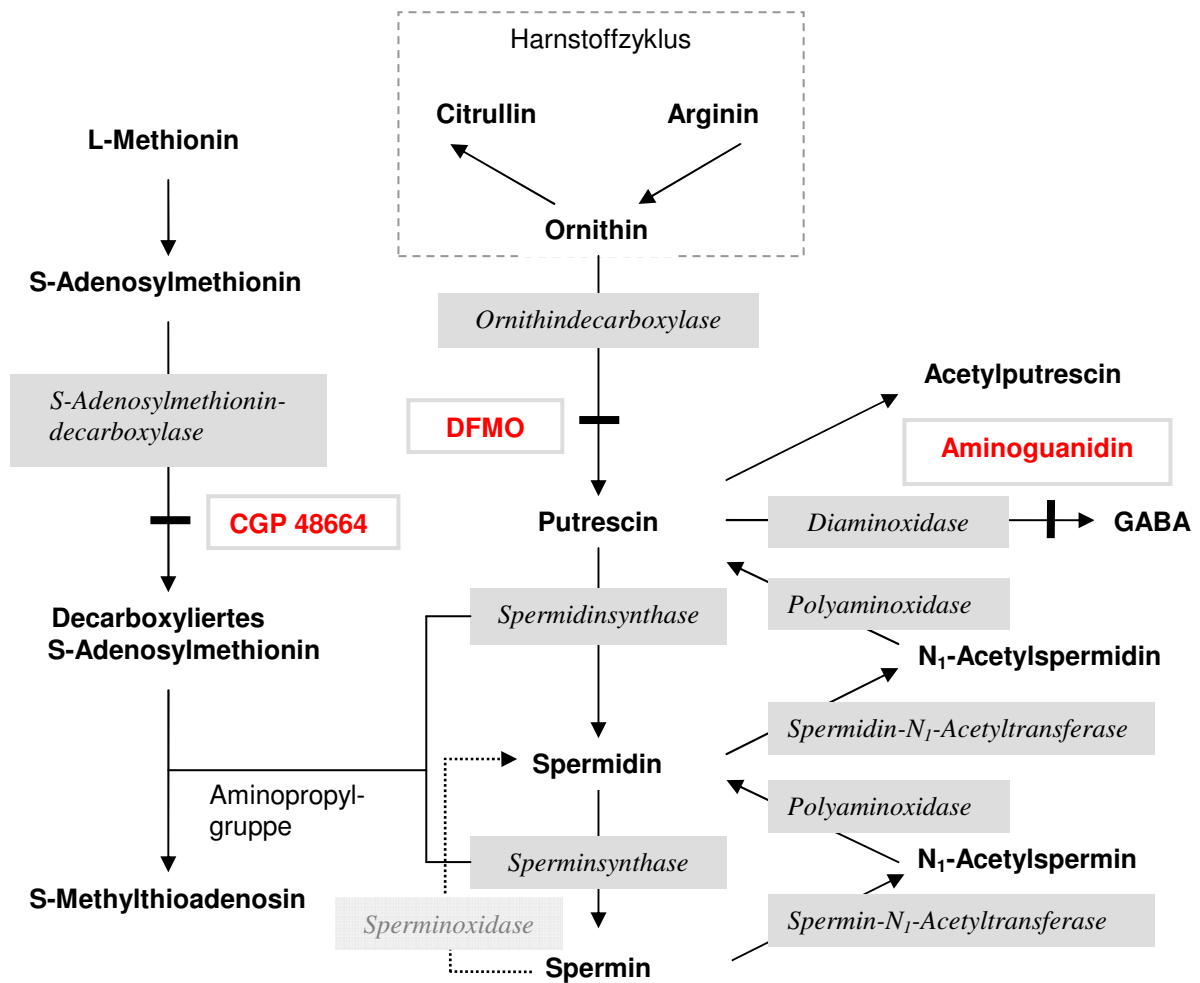


Abbildung 3: Polyaminstoffwechsel

intrazelluläre Putrescinkonzentrationen wirken SAM-DC-aktivierend, Spermidin und Spermin hemmen das Enzym (Persson et al., 1989; Heby et al., 1992).

Als ein weiteres Schlüsselenzym stellt die SAM-DC einen geeigneten Angriffspunkt für regulative Eingriffe in den Polyaminhaushalt dar. Die reversible Hemmung des Enzyms durch 4-Amidinoindan-1-2'-Amidinohydrazan (CGP 48664) erzielt beispielsweise in vitro und in vivo eine Wachstumshemmung verschiedener Tumorzellen (Stanek et al., 1993; Regenss et al., 1994; Dorhout et al., 1995 a und b; Manni et al., 1995). Darüber hinaus spielt die SAM-DC-Inhibition eine Rolle bei der Erforschung antiparasitärer Chemotherapien (Roberts et al., 2002).

Zusätzlich zur intrazellulären Polyamin de novo-Synthese deckt der Organismus seinen Polyaminbedarf aus enteral aufgenommenen Polyaminen. Diese Polyamine sind entweder Bestandteil der aufgenommenen Nahrung oder werden von luminalen Darmbakterien gebildet (*Sarhan et al., 1989; Löser et al., 1997 b und c*).

Die Rückgewinnung von Putrescin aus Spermidin bzw. Spermin erfolgt im Interkonversionsstoffwechsel über die Bildung acetylierter Polyaminzwischenprodukte (*Abbildung 3*). Katalysator ist hierbei die Spermidin-/Spermin-N₁-Acetyltransferase (SAT), die die primären Aminogruppen von Spermin und Spermidin acetyliert. Auch die SAT ist ein komplex reguliertes und leicht induzierbares Enzym mit einer kurzen Halbwertszeit von 20 - 40 min. Die entstehenden Zwischenprodukte N₁-Acetylspermidin und -spermin werden unter Beteiligung der Polyaminoxidase (PAO) in Putrescin bzw. Spermidin umgewandelt oder aus der Zelle ausgeschleust und mit dem Urin ausgeschieden (*Bolkenius und Seiler, 1981; Seiler, 1987; Seiler, 1992; Pegg, 2008*). Ob Ausschleusung oder Oxidation der acetylierten Polyaminderivate überwiegen, hängt vom Wachstumsstatus der Zelle ab. Gesteigertes Wachstum geht bevorzugt mit einer Aktivierung der Oxidation einher, wogegen bei einer Wachstumsinhibition der Polyaminexport überwiegt (*Coleman und Wallace, 1990*).

In Untersuchungen an embryonalen Mäusestammzellen mit inaktiviertem SAT-Gen beobachteten Niiranen et al. 2002 erwartungsgemäß ein Ausbleiben der Rückgewinnung von Putrescin aus Spermidin. Die Re-Synthese von Spermin in Spermidin dagegen erfolgte weiterhin (*Niiranen et al., 2002*). Dieses Ergebnis führte zur Entdeckung der bis dahin unbekanntes Sperminoxidase (SMO), die ausschließlich Spermin als Substrat nutzt und – im Gegensatz zur Polyaminoxidase (PAO) – die N₁-acetylierten Derivate ebenso wenig einer Rückgewinnung zuführt wie Spermidin (*Vujcic et al., 2002; Wallace et al., 2003; Jänne et al., 2004*).

Ein Absinken der intrazellulären Polyaminkonzentration wird neben der Ausschleusung von Polyaminen bzw. deren N₁-acetylierter Derivate durch den terminalen Polyaminkatabolismus erreicht. Hierbei werden Putrescin, Spermin und Spermidin sowie N₁-Acetylspermidin durch eine oxidative Degradation in Aldehyde und anschließend in Aminosäuren umgewandelt. Katalysatoren sind kupferhaltige Aminoxidasen wie beispielsweise die Diaminoxidase (DAO) (*Luk et al., 1980; Seiler, 1990*). In der Darmmukosa katalysiert die DAO die oxidative Degradation von Putrescin zu γ -Aminobutyraldehyd, welches weiter zu γ -Aminobuttersäure (GABA) abgebaut wird. Dieser Mechanismus ermöglicht der Mukosazelle den Ausgleich

schnell ansteigender Polyaminspiegel, wie sie beispielsweise bei nahrungsvermittelten hohen Polyaminkonzentrationen im Darmlumen auftreten können (*Bieganski, 1983; Seiler, 1992*). Ein hochpotenter Inhibitor der kupferhaltigen Aminoxidasen und insbesondere der DAO ist Aminoguanidin, das die oxidative Degradation von Putrescin komplett hemmt (*Seiler et al., 1985; Seiler, 1992*).

1.1.3 Bedeutung der Polyamine für benignes und malignes Zellwachstum

Die Anwesenheit natürlicher Polyamine ist eine wesentliche Voraussetzung für normale Wachstums- und Differenzierungsvorgänge der Zelle, wobei die einzelnen Phasen des Zellzyklus mit jeweils charakteristischen Veränderungen der intrazellulären Polyaminspiegel bzw. der am Polyaminstoffwechsel beteiligten Enzyme einhergehen (*Heby, 1981*). Löser et al. wiesen die Bedeutung der luminalen Polyamine als lokale Wachstumsfaktoren für intestinales Gewebe nach, indem sie bei Wistar Ratten unter langfristiger Verabreichung einer polyaminreduzierten Nahrung mit und ohne Antibiotikazusatz zum Abtöten der polyaminproduzierenden Darmbakterien eine signifikante Hypoplasie der Dünndarm- und Kolonmukosa zeigen konnten (*Löser et al., 1999*). Dass neben gesundem Organgewebe auch maligne Wachstumsprozesse der Regulation durch den Polyaminstoffwechsel unterliegen, belegen zahlreiche Studien, die an verschiedenen Tumormodellen in vitro und in vivo die Wirksamkeit hochspezifischer Polyaminsyntheseinhibitoren oder einer reduzierten Verfügbarkeit luminal enteraler Polyamine untersuchten (*Kingsnorth et al., 1983; Pegg, 1988; Luk et al., 1989; Pegg und McCann, 1992; Marton und Pegg, 1995; Löser et al., 1998*)

Andere Autoren erreichten mit der Einschleusung von Polyaminanaloga in Tumorzellen eine effiziente Inhibition des Tumorwachstums. Unter anderem gelang dies Frydman et al. in ihren Untersuchungen an Prostatakarzinomen bei Mäusen (*Frydman et al., 2003*) oder Huang et al. am Beispiel menschlicher Brustkrebszellen (*Huang et al., 2003*). Grundgedanke der als Wachstumsinhibitoren synthetisch entwickelten Polyaminanaloga ist, dass die Ähnlichkeit der Derivate zu den natürlichen Polyaminen den Transport in die Zelle sowie die feedback-Hemmung der Schlüsselenzyme ODC und SAM-DC gewährleistet, ohne dabei die wachstumsfördernde Funktion zu ersetzen (*Porter und Bergeron, 1988*). Mitchell et al. wiesen nach, dass bei einer Vielzahl bekannter Polyaminanaloga die wachstumsreduzierenden Effekte mit der Induktion des ODC-Inhibitors Antizym (AZ) verbunden sind (*Mitchell et al., 2002*).

Andere Autoren beobachteten eine Induktion der Spermidin-/Spermin-N₁-Acetyltransferase (SAT) (Pegg, 2008) oder apoptoseinduzierende Eigenschaften (Mc Closkey et al., 1995). Im Gegensatz zur enzyminhibitorvermittelten Wachstumshemmung, wie beispielsweise durch den ODC-Inhibitor α -Difluoromethylornithin (DFMO), werden bei dem Einsatz von Polyaminanaloga keine kompensatorischen Mechanismen zur Konstanthaltung der intrazellulären Polyaminspiegel aktiviert. Eine weitgehende Reduzierung aller in der Zelle vorkommenden natürlichen Polyamine ist so effektiver möglich.

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass maligne Erkrankungen mit erhöhten Polyaminkonzentrationen in Blut und Urin einhergehen. Aufgrund der geringen Spezifität eignen sich Polyamine jedoch nicht als Tumormarker (Löser et al., 1989, 1990 a, b, c, 1992).

Zusätzlich zu der Vermittlung von Wachstum und Differenzierung spielt der Polyaminstoffwechsel auch für apoptotische und wachstumshemmende Vorgänge eine regulative Rolle. Monti et al. beobachteten infolge einer DFMO-vermittelten Polyaminreduzierung eine Apoptoseverzögerung, die sich nach der Zufuhr exogener enteraler Polyamine reversibel zeigte (Monti et al., 1998). Neben weiteren Hinweisen auf eine apoptoseinduzierende Wirkung der Polyamine (Stefanelli et al., 1999; Ray et al., 2000; Flamigni et al., 2007) beschreibt die Literatur auch zytotoxische Effekte (Brunton et al., 1990 und 1991; Tome et al., 1997). Andere Untersuchungen belegen wiederum protektive Eigenschaften der Polyamine. Beispielsweise konnten Polyamine in Versuchen von Harada und Sugimoto Kleinhirnzellen der Ratte vor einem durch Kaliumchlorid verursachten Zelltod schützen (Harada und Sugimoto, 1997).

1.1.4 Hemmung der Polyaminsynthese durch α -Difluoromethylornithin

Der erste effektive, mit dem Ziel einer medikamentös induzierten Proliferationshemmung synthetisch hergestellte Polyaminsyntheseinhibitor war α -Difluoromethylornithin (DFMO). Das Ornithinstrukturanalogon bindet irreversibel an die katalysierende Ornithindecarboxylase und hemmt damit das Schlüsselenzym der intrazellulären Polyamin de novo-Synthese (Pegg, 1988; Luk et al., 1989; Pegg et al., 1992) (Abbildung 3). Folgen sind eine Abnahme der intrazellulären Putrescin- und Spermidinkonzentrationen und eine Wachstumshemmung der Zelle. Die Langzeitverabreichung hoher Dosen kann zu Nebenwirkungen wie einer Thrombozytopenie oder einer reversiblen Ototoxizität führen. Niedrige Dosierungen weisen dagegen auch bei langfristiger Medikation keine nennenswerten toxischen Effekte auf (Verma, 1990). Positive

Ergebnisse erzielt DFMO als Therapeutikum in der Krebsforschung. Verschiedene Untersuchungen belegen eine präventive oder wachstumsinhibierende Wirkung in Bezug auf Kolon- und Rektumkarzinome, Tumoren von Haut, Brust und Blase sowie Neuroblastome oder rezidivierende Gliome (*Weeks et al., 1982; Kingsnorth et al., 1983; Malt et al., 1985; Thompson et al., 1985; Benrezzak et al., 1987; Uchida et al., 1989; Levin et al., 1992; Hogarty et al., 2008*). Unter der gleichzeitigen Verabreichung einer antibiotikahaltigen (zur Reduktion der polyaminproduzierenden Darmbakterien) und polyaminarmen Kost mit dem Effekt der Reduzierung der luminal enteralen Polyamine konnte die DFMO-Wirkung am Kolonkarzinommodell zusätzlich verbessert werden (*Löser et al., 1998*). Als weitere Möglichkeiten zur Verstärkung des therapeutischen Effekts von DFMO wurden unter anderem die Inhibition der für den Interkonversionsstoffwechsel verantwortlichen Polyaminoxidase (PAO) (*Claverie et al., 1987*), die Unterdrückung des zellulären Polyamintransports (*Ask et al., 1992*) oder die Kombination mit nicht-steroidalen Antiphlogistika (*Raul, 2007*) beschrieben. Sehr gute Ergebnisse erzielte in Untersuchungen an Lungenkarzinomen oder Glioblastomen auch die Dreierkombination von DFMO, einer polyaminarmen und antibiotikahaltigen Kost und einem PAO-Inhibitor (*Sarhan et al., 1989; Moulinoux et al., 1991*).

Neben der Tumorthherapie stellen Protozoeninfektionen wie verschiedene Formen der afrikanischen Schlafkrankheit, die Chagaskrankheit oder Leishmaniosen einen weiteren großen Anwendungsbereich für DFMO dar. Insbesondere die durch *Trypanosoma brucei gambiense* hervorgerufene westafrikanische Schlafkrankheit kann beim Menschen auch noch in späten Krankheitsstadien erfolgreich mit DFMO therapiert werden (*Milord et al., 1992; Bacchi et al., 1993; Heby et al., 2007*).

1.2 Induktion der Hepatokarzinogenese durch N-Nitrosomorpholin

Die karzinogene Wirkung von N-Nitrosomorpholin (NNM) wurde in zahlreichen experimentellen Studien an Ratten und anderen Spezies nachgewiesen (*Druckrey et al., 1967; Bannasch et al., 1979; Bannasch und Zerban, 1986; Enzmann et al., 1995; Dombrowski et al., 2005*). Sowohl einmalige als auch längerfristige Verabreichungen des heterozyklischen Nitrosamins führen zu neoplastischen Veränderungen an Leber und Pankreas. Unter sehr hohen Dosierungen entstehen weiterhin an Ösophagus, Niere und Zunge Tumoren. Metastatische Absiedlun-

gen gehen in erster Linie von hepatozellulären Karzinomen und Hämangiosarkomen der Leber aus und betreffen vornehmlich die Lunge (*Lijinski et al., 1988*). In verschiedenen Studien an Mäusen, Ratten und Hamstern wurden nach der getrennten Verabreichung von Morpholin und Nitrit die gleichen geweblichen Veränderungen beobachtet, wie sie durch die Applikation von NNM verursacht werden. Demzufolge kann das hochkarzinogene Nitrosamin nach Zuführen der Vorstufen im Verdauungstrakt der Tiere synthetisiert werden – ein Mechanismus, der auch beim menschlichen Organismus denkbar ist und in ernährungswissenschaftlichen Untersuchungen Berücksichtigung findet (*Bannasch et al., 1979*). Neben seiner karzinogenen Potenz verfügt N-Nitrosomorpholin über eine ausgesprochen hohe Toxizität, die sich an verschiedenen Organen in Form meist reversibler, ausgedehnter zellnekrotischer Veränderungen manifestiert und bei hohen Dosierungen zum Tod des Versuchstieres führt (*Bannasch et al., 1979*).

Zielorgan der NNM-induzierten Parenchymveränderungen ist in den üblichen Ratten- und Mäusemodellen die Leber (*Bannasch et al., 1979*). Die hier entstehenden Tumoren lassen sich entsprechend der jeweiligen Ausgangszellart differenzieren in hepatozelluläre Adenome und Karzinome, in Cholangiofibrome und Cholangiokarzinome, in Hämangioendotheliome und Angiosarkome sowie in Perizytome, die von den perisinusoidalen Zellen (auch Itozellen, Fettspeicherzellen oder Lipozyten) ausgehen. NNM-induzierte hepatozelluläre Karzinome entsprechen in ihrer Histologie und Zytologie grundlegend den korrespondierenden menschlichen Tumoren. Begleitende Zirrhosen treten eher unter einer kontinuierlichen Applikation hoher Dosen auf, die erhebliche nekrotische Parenchymveränderungen vornehmlich in den azinuszentralen Läppchenanteilen verursacht. Niedrige Dosierungen führen nicht zu derartig ausgeprägten Zellnekrosen und die entstehenden Neoplasien kommen weitestgehend isoliert und ohne einher- oder vorausgehende fibrotische bzw. zirrhatische Gewebeschädigungen vor (*Bannasch und Zerban, 1986*).

Ausdehnung und Geschwindigkeit der Hepatokarzinogenese sind von der Dosierung und dem Verabreichungszeitraum des Karzinogens abhängig, wobei die Zellveränderungen jeweils einem typischen Verlauf folgen (*Bannasch, et al., 1984; Dombrowski et al., 2005*). Zunächst entstehen präneoplastische Herde veränderter Hepatozyten, so genannte Foci, die sich schließlich zu Adenomen und Karzinomen weiterentwickeln. Anhand morphologischer Eigenschaften erfolgt die Differenzierung der präneoplastischen Zellherde in klarzellige, azidophilzellige, gemischtzellige und basophilzellige Foci. Daneben werden in der Literatur weitere Formen wie tigroidzellige oder amphophilzellige Zellfoci beschrieben. Der unter präneoplastischen

Herden vorherrschende Phänotyp bzw. die zeitliche Abfolge der Veränderungen ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, unter anderem von der Menge und Dauer des verabreichten NNM (*Bannasch et al., 1989; Weber und Bannasch, 1994 a, b, c; Enzmann et al., 1995*). Typischerweise treten zuerst klarzellige Foci auf, die ein erhöhter Glykogengehalt, eine verstärkte proliferative und apoptotische Aktivität sowie ein veränderter Karboanhydrat-Stoffwechsel kennzeichnen (*Dombrowski et al., 2005*). Davon unabhängig können in selteneren Fällen auch azidophilzellige oder amphophilzellige Foci am Anfang des Karzinogenese-prozesses stehen. Gemischtzellige und danach rein basophilzellige präneoplastische Zellherde entwickeln sich üblicherweise erst später.

Makroskopisch entsprechen erste präneoplastische Veränderungen kleinen weißlichen Rundherden, die multizentrisch auftreten und im zeitlichen Verlauf an Größe und Anzahl zunehmen. Sie werden zum Ursprung erhabener, solider Tumoren mit knotigem Erscheinungsbild und häufig hämorrhagischen Anteilen (*Cortinovis et al., 1991*).

Trotz der unumstrittenen karzinogenen Potenz von NNM ist der genaue Mechanismus der Tumorinduktion nach wie vor nicht vollständig geklärt (*Lijinsky et al., 1988*). Neben der indirekten genotoxischen Wirkung infolge einer enzymvermittelten metabolischen Aktivierung verfügt das N-Nitrosamin neueren Studien zufolge auch über die Fähigkeit zur direkten Erbgutschädigung (*Robichová et al., 2004*).

1.3 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Der wesentliche Einfluss des Polyaminstoffwechsels und seiner Schlüsselenzyme bei der Entstehung maligner Veränderungen ist an verschiedenen Karzinogenesemodellen – insbesondere des Gastrointestinaltraktes – mehrfach gut belegt worden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf das *in vivo*-Modell der N-Nitrosomorpholin-induzierten Leberkarzinogenese untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Bedeutung verschiedener Regulationsmechanismen des Polyaminstoffwechsels im Rahmen des etablierten NNM-Karzinogenesemodells bei der Entstehung von Lebertumoren bei Ratten *in vivo*.

Indem in dieser Arbeit der Polyamingehalt der Nahrung moduliert sowie körper- und zelleigene Mechanismen zur Polyaminhomöostase gezielt beeinflusst und manipuliert wurden, sollten Situationen einer erhöhten bzw. einer reduzierten Polyaminverfügbarkeit geschaffen werden. In einer **ersten Versuchsgruppe** wurde unter Erhalt der intrazellulären de novo-Synthese der Anteil der aus dem Darmlumen aufgenommenen Polyamine durch eine Reduzierung der Nahrungspolyamine und die gleichzeitige Reduktion der enteralen polyaminproduzierenden Bakterien mittels der Nahrung zugesetzter Antibiotika minimiert. Hier lag die Fragestellung zugrunde, welche Bedeutung luminal enteralen Polyaminen aus Nahrung und Darm bei der Entstehung von Leberneoplasien zukommt. Am Modell der DMH-induzierten Kolonkarzinogenese konnte in der Vergangenheit durch die Verabreichung einer polyaminreduzierten und antibiotikahaltigen Kost bereits eine hochsignifikante Hemmung der Tumorgenese erzielt werden (Löser *et al.*, 1998).

In einer **zweiten Versuchsgruppe** wurde zusätzlich zur Reduzierung der exogenen enteralen Polyamine die intrazelluläre Polyamin de novo-Synthese als Kompensationsmechanismus reduziert. In der Gegenüberstellung dieser beiden Gruppen konnten die Bedeutung der luminal enteralen Polyaminaufnahme durch die Zelle einerseits und der intrazellulären Polyaminproduktion andererseits verglichen werden. Die Reduktion der de novo-Synthese geschah in Form einer Ornithindecaboxylasehemmung (ODC) durch α -Difluoromethylornithin (DFMO).

Experimenteller Ansatz für eine **dritte Versuchsgruppe** war die Erhöhung des Polyaminangebots vermittelt durch eine polyaminangereicherte Kost und der gleichzeitigen Gabe von Aminoguanidin. Mit der Aminoguanidin-vermittelten Hemmung der Aminoxidasen sollte ein kompensatorischer Anstieg des terminalen Polyaminkatabolismus verhindert werden. Die Ergebnisse der vermehrten exogenen enteralen Polyaminzufuhr sollten im Rahmen des gewählten Karzinogenesemodells über eine eventuelle karzinogenesefördernde Potenz von Polyaminen Aufschluss geben.

Die Dokumentation aller makroskopischen Auffälligkeiten und die histologische Auswertung der beobachteten Gewebeeränderungen erlaubte als wesentlicher Teil der Studien neben der Beurteilung von Tumorinzidenz und -initiation auch Aussagen über die histologische Prognostik und den Malignitätsgrad der auftretenden Präneoplasien und Neoplasien.

EINLEITUNG

Gewebeuntersuchungen zur Evaluierung des Polyamingehalts und der einzelnen Synthesenzyme sollten darüber hinaus die Effekte auf zelluläre Mechanismen zur Polyaminhomöostase darstellen. Es wurden Gewebeproben von Leber, Leberkarzinomen und Nieren analysiert, um sowohl organspezifische als auch karzinomtypische Veränderungen zu erfassen. Zusätzlich sollte der Vergleich zwischen leberkarzinomerkrankten und gesunden Tieren eventuelle Auswirkungen einer Malignomerkrankung auf Organgewebe aufzeigen, das am Karzinogeneseprozess selbst nicht beteiligt ist (*Pizzi et al., 1994; Halline et al., 1989 b*).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Geräte

[1-¹⁴C]-Acetyl-Coenzym A (2,07 GBq/mmol), S-Adenosyl-L-[Carboxyl-¹⁴C]-Methionin (2,11 GBq/mmol), DL-[1-¹⁴C]-Ornithindihydrochlorid (2,11 GBq/mmol), [Methyl-³H]-Desoxy-Thymidintriphosphat (1,78 GBq/mmol)

Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig

Bio-Rad-Proteinreagenz Coomassie Brilliant Blue G-250

Bio-Rad Laboratorien GmbH München

Bisbenzimidazol (33258)

Hoechst AG, Frankfurt/Main

Acetonitril, Glycerol (87 %), Methanol, Mercaptoäthanol, Äthanol, Perchlorsäure, Ethylendi-
amintetraacetat-Na₂, Phenylmethylsulfonyl-Flourid, Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄-
2H₂O), Natriumhydroxid (NaOH), Tetranatriumdiphosphat (Na₄P₂O₇), Schwefelsäure
(H₂SO₄) *E. Merck, Darmstadt*

Brij 35, Natriumoktansulfonat, O-Phthalaldehyd, Rinderserumalbumin, Dithiothreitol, Py-
ridoxalphosphat, Tris-HCl, Tris-Base, Desoxyadenosin-, Desoxycytidin- und Desoxyguano-
sin-5-Triphosphat (d-ATP, d-CTP, d-GTP), kristalline Pankreas-DNAse-Lösung, Kalbsthymus-
DNA, Hydroxylaminhydrochlorid, Sucrose, Methyl Benzethonium Hydroxid, S-Adenosyl-
Methionin sowie Standards für Polyamine: Acetylputrescin, Putrescin, Histamin, 1,7-
Diaminoheptan, N1-Acetylspermidin, Spermidin, Spermin, Acetylcadaverin, Cadaverin

Sigma Chemical Co., St.Louis, USA

MATERIAL UND METHODEN

Quickszint 2000 Szintillationsflüssigkeit

Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt/Main

Trichloressigsäure (1,2 mol/l) und Test-Kombination Kreatinin: Kreatinin (2 mg/dl), Pikrinsäure (35 mmol/l), Natriumhydroxid (1,6 mmol/l)

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Millipore Filterwäscher, Millex-GS-Filter (Porengröße 0,22 µm)

Millipore GmbH, Eschborn

Whatman Zellulosephosphat-Filter P81, Whatman Glasfaser-Filter (GF/C)

Whatman International Ltd., Maidstone, UK

Beckman LS-2800 Liquid Szintillation System, Beckmann Marquee Display

Beckman Instruments GmbH, München

Potter S-Homogenisator

Braun GmbH, Melsungen

Wheaton-Glashomogenisator (10 ml)

Wheaton Instruments Co., Milville, USA

Sonicator Cell Disruptor

Ultrasonics Inc., Plainview, N.Y., USA

HPLC-Steuergerät L-5000, HPLC-Pumpe 655 A-12, automatischer Probenaufgeber 655 A-40, Säulentermostat 655 A-52, Reaktionspumpe für die Nachsäulenderivatisierung 655 A-13, Fluoreszenzspektrophotometer F-1000, Integrator D-2000

E. Merck-Hitachi, Darmstadt

Nova-Pak C₁₈ (4 µm) Säule (150 mm x 3,9 mm I.D.), Vorsäule Guard-Pak µBondapak C₁₈ (10 µm)

Millipore-Waters GmbH, Eschborn

Eppendorf Tischthermostat 5320

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Fluoreszenzspektrophotometer 650-40

Perkins-Elmer & Co. GmbH, Überlingen

MATERIAL UND METHODEN

Kontron Z 364-K Laborzentrifuge

Berthold Hermle AG, Gosheim, Baden-Württemberg

Beckman L7-55 Ultrazentrifuge

Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Kalifornien, USA

Chemikalien zur Fixation: Ringerlösung, Longasteril, Paraformaldehyd, 10 % Formalin, Glutaraldehyd, Procain 0,5 %.

Sonstige, nicht einzeln aufgeführte Chemikalien und Substanzen waren vom höchsten kommerziell verfügbaren Reinheitsgrad.

Sämtliche Glasbehälter, die mit Material zur Bestimmung von Polyaminen und Polyaminstoffwechsellenzymen in Berührung kamen, waren silikonisiert (**Firma Sherwood Medicals GmbH, Sulzbach**).

2.2 Applizierte Substanzen

N-Nitrosomorpholin (NNM)

Steinbeis Transferzentrum/Glykokonjugate-Synthese, Heidelberg

α -Difluoromethylornithin (DFMO)

Marion Merrell Dow Research Institute, Straßburg, Frankreich

Aminoguanidin

Sigma Chemical Co., St.Louis, USA

Rompun, Injektionslösung 2%

Bayer, Leverkusen

Ketavet, Injektionslösung 100 mg/ml

Pharmazia Upjohn, Erlangen

Standardkost für Nagetiere (SK) (80 mg/kg Putrescin, 300 mg/kg Spermidin, 100 mg/kg Spermin)¹, polyaminreiche Diät (PRD) (500 mg/kg Putrescin, 2000 mg/kg Spermidin, 600 mg/kg Spermin)¹, polyaminarme Diät nach Seiler (PAD) (2 g/kg Neomycin, 34 mg/kg Metronidazol)¹. In Kontrollmessungen mittels HPLC-Analyse konnten in Proben der polyaminarmen Kost die Polyamine Putrescin und Spermin nicht nachgewiesen werden. Spermidin fand sich in Spuren von durchschnittlich $9 \pm 2,1$ nmol/g und war damit gegenüber dem Gehalt der Standardkost ($559,7 \pm 147,4$ nmol/g) um 98% vermindert.

Firma Altromin GmbH in Lage, Lippe

Bei den polyaminreduzierten Diäten handelte es sich um etablierte Rattennahrungen nach Seiler et al. und Sarhan et al. (Seiler et al., 1990; Sarhan et al., 1989). Die Anwendung dieser Diäten konnte bereits in mehreren Vorversuchen die Bedeutung der Nahrungspolyamine unter physiologischen Bedingungen und in der Karzinogenese belegen (Paulsen et al., 1997; Löser et al., 1997 b), ohne dass hierbei Nebenwirkungen auf den Gesundheitszustand oder das Trink- und Fressverhalten der Versuchstiere auftraten. Veröffentlichungen zur Anwendung der hier verabreichten polyaminreichen Diät lagen zu Beginn dieser Studie noch nicht vor. Der Entscheidung für eine Nahrung mit im Vergleich zur Standardkost 10fach erhöhter Polyaminkonzentration lag das Ziel zugrunde, durch eine vermehrte exogene enterale Polyaminzufuhr eine Limitierung der aufgenommenen Nahrungspolyamine aufgrund einer nicht maximal ausgenutzten enteralen Aufnahmekapazität zu vermeiden.

2.3 Versuchstiere

Die insgesamt 80 männlichen Wistar Ratten (*Abbildung 4*) wurden durch die Firma **Harlan Winkelmann** in Borcheln im Alter von 10 Tagen und mit einem Gewicht von etwa 20 g geliefert. Zunächst wurden die Tiere noch bis zur natürlichen Muttermilchentwöhnung zwischen dem 20. und 22. Lebenstag mit Amme gehalten. Im Alter von 24 Tagen erfolgte die Trennung von der Amme.

¹ gemäß Herstellerangaben

MATERIAL UND METHODEN

Je nach Gruppenzugehörigkeit erhielten die Tiere eine Standardlaborkost, eine polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz oder eine polyaminreiche Diät plus Aminoguanidin. Freier Zugang zu Trinkwasser und Futter war während des gesamten Versuchszeitraums jederzeit gewährleistet. Die Unterbringung der Tiere erfolgte im Tierstall der I. Medizinischen Klinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bei einer konstanten Raumtemperatur von 24 °C und einem 12stündigen Hell-/ Dunkel-Rhythmus. Nach der Trennung von der Amme wurden jeweils zwei Tiere in einem Käfig gehalten. Körpergewicht, Trinkmenge und Futterverbrauch wurden täglich dokumentiert. Sämtliche Tierversuche waren der zuständigen Tierschutz-Kommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gemeldet und durch das Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.



Die Albinoratte wurde 1913 - 1916 im Rahmen von Inzestversuchen im Wistar Institute of Anatomy and Biology der University of Pennsylvania in Philadelphia als Laborrattenstamm gezüchtet. Mittlerweile ist sie weltweit verbreitet und gilt als hervorragendes Versuchstier in Medizin, Biologie, bei Arzneimittelprüfungen und technischen Tests. Nach 3¹/₂wöchiger Trächtigkeitdauer werden 6 - 12 Junge blind und nackt geboren, die nach 2 - 3 Wochen die Augen öffnen und mit drei Monaten selbstständig sind. (Brockhaus, die Enzyklopädie, 1996).

Abbildung 4: Wistar Ratte

2.4 Durchgeführte Untersuchungen

Die Versuchstiere wurden in 4 Behandlungsgruppen eingeteilt. Eine erste Gruppe erhielt eine Standardlaborkost mit natürlichem, nicht modifiziertem Polyamingehalt (Gruppe SK). Tieren der zweiten Gruppe wurde eine polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz verabreicht (Gruppe PAD). Die dritte Gruppe erhielt ebenfalls eine polyaminarme, antibiotikahaltige Diät und wurde zusätzlich mit α -Difluoromethylornithin (DFMO) behandelt (Gruppe DFMO). Die Nahrung der 4. Gruppe bestand aus einer polyaminangereicherten Diät. Diesen Tieren wurde zusätzlich der Aminoxidasen-Inhibitor Aminoguanidin (AG) appliziert (Gruppe PRD). Verabreichungszeitraum und Dosierung des Karzinogens N-Nitrosomorpholin (NNM) waren bei

MATERIAL UND METHODEN

allen 4 Gruppen identisch. Gemäß den Vorgaben der Ethikkommission stand nur eine begrenzte Tierzahl zur Verfügung, weshalb auf eine Kontrollgruppe ohne Karzinogenexposition verzichtet werden musste.

Aus Kapazitätsgründen wurden die insgesamt 80 Versuchstiere in 2 Lieferungen zu je 40 Tieren aufgeteilt. Zwischen den beiden Lieferungen lag ein Zeitraum von 4 Wochen. Jeweils 2 Tage nach Anlieferung erfolgte im Alter von 12 Tagen und mit einem Gewicht von 20 – 25 g die Gruppenteilung. 2 fälschlicherweise zusätzlich gelieferte Tiere wurden in den Versuch mit aufgenommen, sodass sich für die Gruppen SK und PAD eine Stärke von jeweils 20 Tieren und für die Gruppen DFMO und PRD eine Stärke von jeweils 21 Tieren ergab.

Bis zur Muttermilchentwöhnung wurden auch die Ammen entsprechend der Gruppenzugehörigkeit der Jungtiere mit unterschiedlich polyaminhaltiger Kost ernährt. Die daraus resultierende Beeinflussung der Muttermilch sollte die frühest mögliche Konfrontation der Jungtiere mit der gruppenspezifischen Nahrungszusammensetzung gewährleisten. Darüber hinaus war polyaminarm ernährten Jungtieren so auch nicht das Anlegen eventueller Polyaminvorräte aus der anfangs noch parallel verabreichten Ammenmilch möglich. Die Karzinogenapplikation erfolgte ab einem Alter von 33 Tagen (9 Tage nach der Trennung von der Amme) und wurde nach dem Muster eines Stopp-Versuchs für einen Zeitraum von 10 Wochen täglich durchgeführt.

Im Versuchsverlauf entwickelte ein zunehmender Teil der Ratten eine Pneumonie. Die Krankheitsfälle traten unabhängig von Lieferzeitpunkt oder Gruppenzugehörigkeit auf und führten innerhalb weniger Wochen zu einem deutlich verschlechterten Allgemeinzustand und zum Tod von insgesamt 13 Tieren (*Tabelle 1*). Tiere der ersten Lieferung zeigten 9 Wochen nach Absetzen des Karzinogens erste Erkrankungszeichen. Aufgrund des zeitlich versetzten Versuchsbeginns waren die Tiere der zweiten Lieferung bereits 5 Wochen nach Absetzen des Karzinogens betroffen. Spontan verstorbene Tiere wurden sezirt und hinsichtlich NNM-induzierter makroskopischer Gewebeveränderungen an Leber, Niere, Milz oder Ösophagus beurteilt. Teilweise konnten hier bereits deutliche tumoröse Veränderungen der Leber festgestellt werden. Eine Inspizierung der Lungen vor dem Hintergrund der Pneumoniesymptomatik und auch angesichts möglicher metastatischer Absiedlungen ergab bei allen vorzeitig verstorbenen Tieren eitrig infiltrierte und teilweise hämorrhagisch und fibrotisch verändertes pulmonales Gewebe. Gemäß der histologischen Untersuchung des Lungengewebes konnten die

MATERIAL UND METHODEN

schwerwiegenden Krankheitsverläufe auf eine Mykoplasmen-Pneumonie zurückgeführt werden. Spontan verstorbene Tiere wurden in den statistischen Analysen nicht berücksichtigt.

Standardkost	<i>Kurzzeitgruppe</i>	Gruppe SK 1	3 Tiere verstorben an Tag 59, 69 und 79 nach NNM-Stopp
Standardkost	<i>Langzeitgruppe</i>	Gruppe SK 2	1 Tier verstorben an Tag 102 nach NNM-Stopp
polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz	<i>Kurzzeitgruppe</i>	Gruppe PAD 1	keine Todesfälle
polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz	<i>Langzeitgruppe</i>	Gruppe PAD 2	3 Tiere verstorben an Tag 78, 79 und 84 nach NNM-Stopp
polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz + α-Difluoromethylornithin	<i>Kurzzeitgruppe</i>	Gruppe DFMO 1	2 Tiere verstorben an Tag 54 und 58 nach NNM-Stopp
polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz + α-Difluoromethylornithin	<i>Langzeitgruppe</i>	Gruppe DFMO 2	2 Tiere verstorben jeweils an Tag 88 nach NNM-Stopp
polyaminreiche Diät + Aminoguanidin	<i>Kurzzeitgruppe</i>	Gruppe PRD 1	keine Todesfälle
polyaminreiche Diät + Aminoguanidin	<i>Langzeitgruppe</i>	Gruppe PRD 2	2 Tiere verstorben an Tag 95 und 96 nach NNM-Stopp

Tabelle 1:

Zeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit vorzeitig verstorbener Tiere

Mit zunehmender Ausbreitung der Pneumonie musste der Versuch für alle Tiere vorzeitig beendet werden, um weitere Verluste und damit eine Gefährdung der Auswertbarkeit aufgrund zu niedriger Fallzahlen zu vermeiden. Das ursprünglich für alle Gruppen 17 Wochen nach letztmaliger NNM-Applikation vorgesehene Versuchsende erfolgte so für die Tiere der ersten Lieferung 14 Wochen (Langzeittiere) und für die Tiere der zweiten Lieferung 10 Wochen (Kurzzeittiere) nach Absetzen des Karzinogens. Damit ergaben sich statt der vorgesehenen 4 insgesamt 8 verschiedene Versuchsgruppen (*Tabelle 2 und 3*). Zwar resultierte hieraus eine deutliche Reduzierung der Fallzahlen, aufgrund des unterschiedlichen zeitlichen Abstands zwischen Karzinogenexposition und Tötung wurde allerdings die zusätzliche Erfassung verschiedener Tumorgenesestadien möglich.

Kurzzeitgruppen

Gruppe SK 1	Gruppe PAD 1	Gruppe DFMO 1	Gruppe PRD 1
n = 10 (+ 1 Amme) abzüglich 3 verstorbener Tiere	n = 10 (+ 1 Amme)	n = 10 (+ 1 Amme) abzüglich 2 verstorbener Tiere	n = 10 (+ 1 Amme)
Tötung 10 Wochen nach letzter NNM-Medikation	Tötung 10 Wochen nach letzter NNM-Medikation	Tötung 10 Wochen nach letzter NNM-Medikation	Tötung 10 Wochen nach letzter NNM-Medikation
NNM (12 mg/kg KG per Schlundsonde einmal täglich)	NNM (12 mg/kg KG per Schlundsonde einmal täglich)	NNM (12 mg/kg KG per Schlundsonde einmal täglich)	NNM (12 mg/kg KG per Schlundsonde einmal täglich)
+ Standardkost (nach Bedarf)	+ polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) (nach Bedarf)	+ polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) (nach Bedarf) + α-Difluoromethylornithin (2%ig gelöst im Trinkwasser; nach Bedarf)	+ polyaminreiche Diät (nach Bedarf) + Aminoguanidin (50 mg/kg KG einmal täglich intraperitoneal)

Langzeitgruppen

Gruppe SK 2	Gruppe PAD 2	Gruppe DFMO 2	Gruppe PRD 2
n = 10 (+ 1 Amme) abzüglich eines verstorbenen Tieres	n = 10 (+ 1 Amme) abzüglich 3 verstorbener Tiere	n = 11 (+ 1 Amme) abzüglich 2 verstorbener Tiere	n = 11 (+ 1 Amme) abzüglich 2 verstorbener Tiere
Tötung 14 Wochen nach letzter NNM-Medikation	Tötung 14 Wochen nach letzter NNM-Medikation	Tötung 14 Wochen nach letzter NNM-Medikation	Tötung 14 Wochen nach letzter NNM-Medikation
NNM (12 mg/kg KG per Schlundsonde einmal täglich)	NNM (12 mg/kg KG per Schlundsonde einmal täglich)	NNM (12 mg/kg KG per Schlundsonde einmal täglich)	NNM (12 mg/kg KG per Schlundsonde einmal täglich)
+ Standardkost (nach Bedarf)	+ polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) (nach Bedarf)	+ polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) (nach Bedarf) + α-Difluoromethylornithin (2%ig gelöst im Trinkwasser; nach Bedarf)	+ polyaminreiche Diät (nach Bedarf) + Aminoguanidin (50 mg/kg KG einmal täglich intraperitoneal)

Tabelle 2:

Kurzzeitgruppen (SK 1, PAD 1, DFMO 1, PRD 1): Die Tötung der Tiere erfolgte 10 Wochen nach Absetzen des Karzinogens N-Nitrosomorpholin (NNM)

Tabelle 3:

Langzeitgruppen (SK 2, PAD 2, DFMO 2, PRD 2): Die Tötung der Tiere erfolgte 14 Wochen nach Absetzen des Karzinogens N-Nitrosomorpholin (NNM)

Die ausgewerteten Leberveränderungen umfassten präneoplastische Leberzellherde (Foci), hepatozelluläre Adenome (HCA), hepatozelluläre Karzinome (HCC), cholangiozelluläre Adenome (CCA), cholangiozelluläre Karzinome (CCC) und Angiosarkome (AS). Präneoplastische Zellherde wurden entsprechend der in der Literatur üblicherweise beschriebenen Zellfolge in klarzellige, gemischtzellige und basophilzellige Foci unterteilt. In vereinzelten Fällen konnten darüber hinaus auch azidophilzellige und amphophilzellige Foci identifiziert werden, welche neben den klarzelligen Foci ebenfalls als initiale Veränderungen bekannt sind. Das sehr zahlreiche und nicht exakt quantifizierbare Auftreten der präneoplastischen Foci wurde in 3 Häufigkeitsgraden („sehr wenige Foci“, „mehrere Foci“ und „multipel auftretende Foci“) angegeben. Bezüglich der hepatozellulären Karzinome erfolgte entsprechend zunehmend stark ausgeprägter Malignitätskriterien eine Unterteilung in die Malignitätsgrade G1 bis G3.

N-Nitrosomorpholin (NNM) wurde in Trinkwasser gelöst und den Tieren mit einer Knopfsonde in der Dosierung von 12 mg/kg KG/d transösophageal appliziert. Die applizierten Lösungsvolumina sollten dabei in dem gut zu verabreichenden Bereich zwischen 200 µl und 1000 µl liegen, weshalb wöchentlich mit zunehmendem Körpergewicht der Tiere variierende NNM-Lösungen angesetzt wurden. Bis zu einem durchschnittlichen Tiergewicht von 100 g betrug das Mischungsverhältnis der Lösung 253 µl NNM (entspricht 302,4 mg) auf 100,8 ml Trinkwasser. Um die Dosierung von 12 mg NNM/kg KG zu erzielen, erhielt ein 50 g schweres Tier somit 200 µl Lösung mit 0,6 mg NNM. Entsprechend wurden bis zu Tiergewichten von 200 g wöchentlich 940 µl NNM (entspricht 1123,2 mg) in 187,2 ml Wasser und ab dem mittleren Gewicht von 200 g 1880 µl NNM (entspricht 2246,4 mg) in 187,2 ml Wasser gelöst.

Die Dosierung von 12 mg/kg KG/d wie auch die Applikationsform orientierten sich an verschiedenen in der Literatur beschriebenen Dosierungsmodellen (*Bannasch und Zerban, 1986; Lijinsky et al., 1988; Weber und Bannasch, 1994 a, b und c*). Einmalige hohe Dosierungen von 200 oder 300 mg/kg KG/d eigneten sich zwar zur Untersuchung früh entstehender präneoplastischer Zellherde, hepatozelluläre Karzinome bildeten sich hierbei allerdings nur in wenigen Fällen und erst sehr spät aus. Darüber hinaus waren derart hohe Dosierungen aufgrund ausgedehnter unspezifisch toxischer Zellnekrosen vorwiegend in Leber- und Nierengewebe mit einer hohen Mortalität der Versuchstiere verbunden. Die einmalige Applikation von 320 mg NNM/kg KG führte bei Bannasch et al. innerhalb von 3 Wochen zum Tod von 27 % der Tiere (*Bannasch et al., 1979*). Unter 7wöchiger Verabreichung von 12 mg NNM/kg KG/d

MATERIAL UND METHODEN

traten bei Weber und Bannasch nach 15 Wochen Gesamtzeit bei 20 % und nach 27 Wochen Gesamtzeit bei 40 % der Tiere Tumoren auf. Unter 7wöchiger Applikation von 24 mg NNM/kg KG/d wurden schon nach insgesamt 11 Wochen bei 40 % der Tiere Tumoren diagnostiziert (*Weber und Bannasch, 1994 b*). 22 % der Tiere reagierten auf diese Dosis allerdings mit einem signifikanten Gewichtsverlust. Da in der vorliegenden Arbeit die Anzahl der Tierverluste möglichst gering gehalten werden sollte, wurde die niedrigere Dosierung von 12 mg/kg KG/d gewählt. Gleichzeitig wurde die Applikationsdauer auf 10 Wochen erweitert, um die Anzahl der auswertbaren Tumoren zu erhöhen. Die NNM-Applikation erfolgte ab dem 33. Lebenstag über den Zeitraum von 10 Wochen einmal täglich zur gleichen Uhrzeit. Mit einem zeitlichen Abstand von 10 und 14 Wochen zwischen dem Absetzen des Karzinogens und der Entnahme der Gewebeproben wurden in der Versuchsauswertung möglichst fortgeschrittene Stadien der Tumorgenese erfasst. Gleichzeitig konnte das Risiko umgangen werden, aufgrund ähnlicher Zytologie und zytochemischer Eigenschaften die unmittelbaren und nach Absetzen des Karzinogens reversiblen NNM-verursachten toxischen Läsionen nicht eindeutig von den eigentlich zu untersuchenden präneoplastischen Zellveränderungen abgrenzen zu können.

Die Verabreichung des spezifischen und irreversiblen ODC-Inhibitors **α -Difluoromethylornithin** (DFMO) basierte bezüglich Dosierung und Darreichungsform auf vorangegangenen Studien, die eine ODC-inhibierende Wirkung von DFMO nachwiesen, ohne dass dabei toxische Veränderungen und Nebenwirkungen verursacht wurden (*Thompson et al., 1985; Nigro et al., 1987; Benrezzak et al., 1987; Zhang et al., 1988; Halline et al., 1989 a*). Der ODC-Hemmer wurde 2%ig im Trinkwasser gelöst und den Tieren kontinuierlich bis zum Versuchsende dargeboten. Beginn der Verabreichung war jeweils 2 Tage vor der ersten NNM-Applikation, sodass mit Beginn der Karzinogenexposition eine effektive Hemmung der Polyamin de novo-Synthese gewährleistet war. Die Substanz wurde alle 3 Tage frisch angesetzt und aufgrund der Lichtempfindlichkeit in lichtundurchlässige Trinkbehältnisse abgefüllt.

Aminoguanidin (AG) wurde parallel zur polyaminangereicherten Diät in der Dosierung von 50 mg/kg KG/d intraperitoneal injiziert, um über die Inhibition der für den terminalen Polyaminkatabolismus verantwortlichen Aminoxidasen eine größtmögliche Polyaminanflutung der Zelle zu gewährleisten. Dosierung und Applikationsart orientierten sich dabei an Vorversuchen aus der Literatur, in denen u.a. einmalig intraperitoneal injiziertes Aminoguanidin in der Dosierung von 50 mg/kg KG eine effektive Hemmung der Diaminoxidase für eine Dauer von

72 Stunden zur Folge hatte (Pegg, 1977; Pegg und Mc Gill, 1978). Die erste Injektion erfolgte 1 Tag vor Beginn der NNM-Applikation, sodass zu Versuchsbeginn ein effektiver Wirkspiegel bestand. In täglich frischen Ansätzen wurden abhängig vom durchschnittlichen Gewicht der Tiere 60, 200 oder 400 mg Aminoguanidin in 10, 15 oder 30 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst. Die Injektionsvolumina lagen so zwischen 290 µl und 1500 µl.

2.5 Tier- und Organpräparation

Zur optimalen Fixierung der für die histologischen Untersuchungen vorgesehenen Organpräparate wurde in leicht modifizierter Weise die durch Herrn Prof. Dr. Dombrowski beschriebene Methode der intravitalen Perfusionsfixation angewandt (Dombrowski *et al.*, 1994). Die Organfixierung erfolgte unter Ausnutzung des noch intakten Kreislaufsystems, wodurch postmortal auftretende Gewebeeränderungen verhindert bzw. minimiert wurden. Am betäubten Tier wurde das intravasale Blut zunächst durch eine Spüllösung und in einem zweiten Schritt durch eine Fixationslösung ersetzt. Zur Herstellung der Spüllösung wurden pro Tier 1,25 g Procain in 125 ml Ringerlösung und 125 ml Longasteril gelöst. Die Fixationslösung für ein Versuchstier bestand aus 125 ml Ringerlösung und 125 ml Longasteril, worin nach Erhitzen auf 70 °C 7,5 g Paraformaldehyd gelöst wurden. Unmittelbar vor der Anwendung wurden dieser Lösung noch 5 ml Glutaraldehyd zugegeben. Sowohl Spüllösung als auch Fixationslösung wurden mit NaOH auf den physiologischen pH-Wert von 7,4 titriert. Zur Tier- und Organpräparation wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Ketanest und Rompun in einem Mischungsverhältnis von 1:10 betäubt. Nach durchgeführter Laparotomie und Thorakotomie wurde die freipräparierte Aorta abdominalis über einen möglichst distal gelegenen Zugang oberhalb der Bifurkation für wenige Minuten mit Spüllösung infundiert (Abbildung 5). Die gleichzeitige Durchtrennung der Vena cava inferior distal ihres Zwerchfelldurchtritts sowie die großzügige Inzision der Pfortader ermöglichten unter weiterhin stattfindender Herzaktion den kompletten Blutaustausch. Nach Abklemmen der zuführenden Gefäße zur Unterbindung der weiteren Perfusion erfolgte die Entnahme der zur biochemischen Untersuchung vorgesehenen linken Niere und des Mittellappens der Leber, welcher möglichst nach makroskopischer Einschätzung karzinomatöses und tumorfreies Gewebe enthalten sollte (Abbildung 6). Bot der Mittellappen der Leber keine karzinomatös veränderten Areale, wurde das

MATERIAL UND METHODEN

für die biochemische Untersuchung bestimmte karzinomatöse Lebergewebe den eigentlich zur histologischen Begutachtung vorgesehenen Leberanteilen entnommen. Der Spülung folgte die etwa 10minütige Perfusion mit der Fixationslösung und die anschließende Entnahme der fixierten rechten Niere sowie der noch im Situs vorhandenen Leberanteile. Abdomen und Thorax, insbesondere Lunge, Ösophagus und die einzelnen Abschnitte des Gastrointestinaltrakts wurden hinsichtlich möglicher Metastasen, weiterer tumoröser Läsionen oder pathologischer Lymphknoten gründlich inspiziert. Auch Veränderungen wie Aszites, zirrhotisches Lebergewebe, Splenomegalie, peritonealkarzinomatöse Tumorausbreitung oder pulmonale Veränderungen wurden berücksichtigt und gegebenenfalls zur histologischen Abklärung entnommen.

Die rechte Niere und die in vivo fixierten Leberanteile wurden nach Dokumentation und Fotografie aller unter Lupenansicht auffälligen Herde in einer Transportlösung aufbewahrt und zur histologischen Begutachtung Herrn Prof. Dr. Dombrowski am Institut für Pathologie der Universität zu Bonn zugesandt. Äußerliche Beschaffenheit, Größe und Lokalisation von Tumoren oder anderen makroskopischen Gewebeveränderungen des nicht fixierten Lebermittellappens wurden ebenfalls genau protokolliert und fotografiert. Durch die Anfertigung ca. 3 mm dicker Parenchymschnitte konnten auch Auffälligkeiten erfasst werden, die bei der Begutachtung der Organoberfläche nicht erkannt worden waren. Für die biochemische Untersuchung waren jeweils Proben von Nierengewebe sowie von normalem und makroskopisch karzinomatös verändertem Lebergewebe vorgesehen. Der

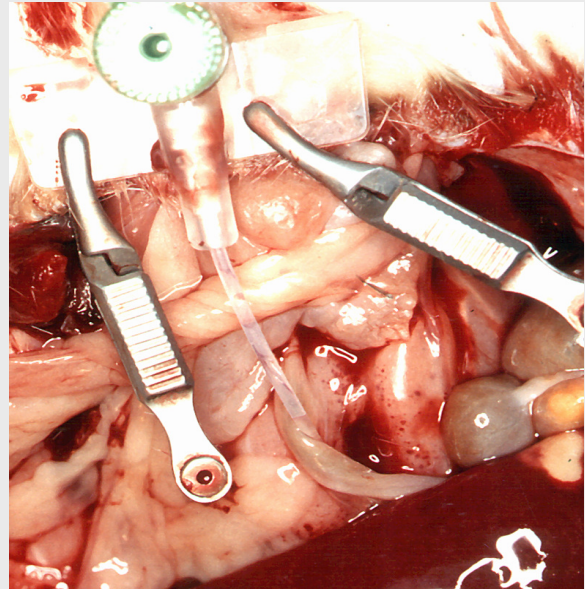


Abbildung 5: Intravitale Perfusionsfixation: Situs 1
Zugang zur Aorta abdominalis.

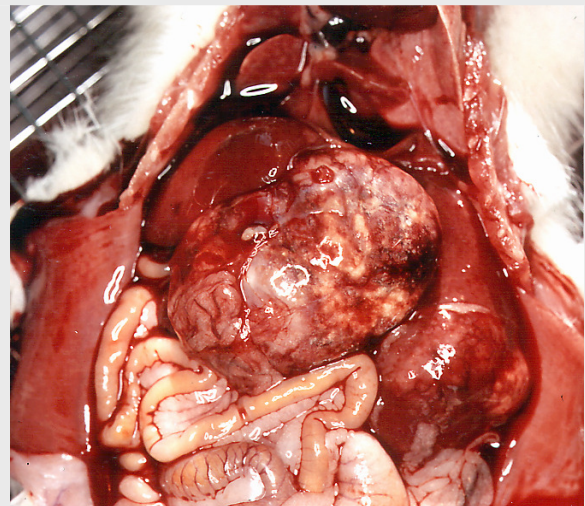


Abbildung 6: Intravitale Perfusionsfixation: Situs 2
Makroskopisch massive tumoröse Veränderungen an Mittellappen und linkem Leberlappen

nicht fixierte Mittellappen und die linke Niere wurden von Fettgewebe befreit, mit eiskalter NaCl-Lösung gereinigt und auf einem Filterpapier getrocknet. Nach Trennung von normalem und pathologischem Lebergewebe und der genauen Bestimmung des jeweiligen Probengewichts wurden die eisgekühlten Organproben im Verhältnis 1:5 in einem ebenfalls eisgekühlten Homogenisationspuffer gelöst. Bei sehr kleinen Materialmengen betrug das Mischungsverhältnis 1:10. Zur weiteren Verarbeitung wurde den Gewebeproben ein Puffer zugegeben, der aus 10 mM Trispuffer (pH 7,9), 0,25 M Sucrose, 5 mM Dithiothreitol, 1 mM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid, 25 mM KCl und 5 mM MgCl₂ bestand. Die Homogenisation erfolgte mithilfe des Potter S bei 1000 Umdrehungen pro Minute (10 Auf- und Abwärtsbewegungen) und den Wheaton-Glashomogenisator (10 Auf- und Abwärtsbewegungen mit Stab A und 4 Auf- und Abwärtsbewegungen mit Stab B). Das Homogenat wurde aufgeteilt in 500 µl zur Polyaminanalyse, 150 µl zur Bestimmung des Proteingehalts und 150 µl zur DNA-Analyse. Alle Proben wurden bis zur endgültigen Bestimmung bei einer Temperatur von -20 °C eingefroren.

Die Aktivitätsmessung der Ornithindecaboxylase (ODC) und der S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC) erfolgte aufgrund der Enzymlabilität am Tötungstag. Hierzu wurde das restliche Homogenat 10 min bei 1000 g und 2 °C zentrifugiert und der Überstand bei 110.000 g und 2 °C 50 min ultrazentrifugiert. Von dem resultierenden Zytosol wurden 600 µl zur ODC-Aktivitätsbestimmung und 250 µl zur SAM-DC-Aktivitätsbestimmung in Polystyrol-Reagenzröhrchen gefüllt und auf Eis gekühlt. 50 µl der Zytosolfraktion wurden zur späteren Spermidin-/Spermin-N₁-Acetyltransferase-Bestimmung (SAT) in ein Eppendorf-Hütchen abgefüllt und bei einer Temperatur von -20 °C eingefroren.

2.6 Parameteranalyse

2.6.1 Bestimmung der Polyaminkonzentrationen im Gewebe

Die Bestimmung der intrazellulären Polyamine Putrescin, Spermin und Spermidin erfolgte durch die Ionenpaar Reversed Phase HPLC-Methode (Löser *et al.*, 1988). Prinzip dieser Methode ist die puffergradientenabhängige Auftrennung der im Homogenat enthaltenen Polyamine auf der HPLC-Säule und die nachfolgende quantitative fluoreszenzspektrophotometri-

MATERIAL UND METHODEN

sche Bestimmung der einzelnen Polyaminderivate. Die Detektionsgrenze für Polyamine liegt unter Anwendung dieses Messverfahrens bei 0,5 - 1,0 pmol. In einem Bereich von 3 pmol bis über 10 nmol erhält man gleich bleibend gut reproduzierbare Messergebnisse. Die Polyaminkonzentration wurde in Relation zum DNA-Gehalt des jeweiligen Gewebes in nmol/mg DNA angegeben.

Um die Zellmembranen zu zerstören, wurden jeweils 500 µl Gewebehomogenat 4 x 15 s mit dem Sonicator Cell Disruptor beschallt. Zur Proteinfällung wurde die Substanz mit 300 µl 0,5 M Perchlorsäure gemischt. Nach der Zugabe von 200 µl Internem Standard aus 3000 nmol 1,7-Diaminoheptan/ml wurde die Mischung 5 min bei 3200 g zentrifugiert und der abpipettierte Überstand über Millex-GS-Filter (Porengröße 0,22 µm) filtriert. 100 µl des Filtrats wurden auf die HPLC-Säule gegeben und 2 Puffer wurden in einem vorgegebenen Gradienten (Tabelle 4) mit einer Flussrate von 1,5 ml/min über die Säule geleitet. Puffer A bestand aus 0,1 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,5) und 0,01 M Oktan-Sulfonsäure, Puffer B setzte sich aus 0,2 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 4,5), 0,01 M Oktan-Sulfonsäure und 4,4 M Acetonitril zusammen. Vor der photometrischen Analyse der Polyaminderivate wurde das Eluat unter lichtgeschützten Bedingungen mit einer Fluoreszenzflüssigkeit aus 0,2 M Borsäure (pH 10,4), 0,003 M o-Phthalaldehyd, 3 ml Brij 35-Lösung, 0,12 M Methanol und 0,03 M Mercaptoäthanol gemischt. Die definierte Flussrate betrug hierbei 0,75 ml/min. Der Routinelauf einer Probe dauerte in diesem Verfahren insgesamt 27 min.

Zeit [min]	Puffer A [%]: 0,1 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 4,5) + 0,01 M Oktan-Sulfonsäure	Puffer B [%]: 0,2 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 4,5) + 0,01 M Oktan-Sulfonsäure + 4,4 M Acetonitril
0 (Start)	50	50
10	25	75
12	0	100
16	0	100
17	50	50
27 (Ende der Analyse)	50	50
32 (Spülen)	50	50

Tabelle 4: Zeitlicher Verlauf des Gradienten aus Puffer A und Puffer B zur Analyse von Polyaminen im Gewebe mittels HPLC

2.6.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten des Polyaminstoffwechsels

2.6.2.1 Ornithindecaboxylase (ODC)

Zur Aktivitätsbestimmung der Ornithindecaboxylase (ODC) wurde die Methode von Haarstad angewandt (*Haarstad et al., 1985*). Dieses Verfahren misst die Stoffmenge $^{14}\text{CO}_2$ in pmol, die in einer Decarboxylierungsreaktion aus $[1-^{14}\text{C}]$ -markiertem Ornithin bei einer Inkubationszeit von 60 min freigesetzt wird. Zum Ausgleich von Messungenauigkeiten wurden bei allen Enzymbestimmungen Doppelmessungen durchgeführt. Die hieraus gebildeten Mittelwerte bildeten die Grundlage für weitere Berechnungen.

250 μl Überstand ultrazentrifugierten Gewebehomogenats wurden mit 2 mM EDTA und 0,4 mM in 250 μl 87%igem Glyzerol gelöstem Pyridoxalphosphat in ein silikonisiertes Reagenzröhrchen gegeben und mit 1,5 ml Standardreaktionsmischung aus 75 μmol Trispuffer (pH 7,5), 1,5 μmol EDTA, 3 μmol Dithiothreitol, 0,3 μmol Pyridoxalphosphat und 8,77 nmol DL- $[1-^{14}\text{C}]$ -Ornithindihydrochlorid (2,11 GBq/mmol) gemischt. Das Reagenzröhrchen wurde mit einem Stopfen verschlossen, durch den zuvor eine durch einen Stöpsel abgedichtete Kanüle gestochen worden war, an deren unterem Ende ein 7x7 mm großes, mit 20 μl Methylbenzethoniumhydroxid getränktes Filterpapier fixiert wurde. Dieses Filterpapier fing das während der Reaktion im Reagenzglas entstehende $^{14}\text{CO}_2$ auf. Nach einer 60minütigen Inkubationszeit im 37 °C warmen Wasserbad wurde die Reaktion mit 500 μl 6M Perchlorsäure gestoppt, die durch die Kanüle in das Reagenzglas gegeben wurde, ohne dass das Filterpapier mit Säure in Kontakt kam. Nach weiteren 30 min Nachinkubation wurde das Filterpapier in ein Szintillationsgefäß mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit Quickszint 2000 gegeben. Um den Effekt der Chemolumineszenz zu verhindern, wurde die vom Filterpapier aufgenommene und in counts per minute (CPM) angegebene Radioaktivität erst nach 24 h im Beckman LS-2800 Liquid Scintillation System gemessen.

In jedem Analysegang wurden zusätzlich 3 Leerwerte (Blancs) gemessen, die anstelle des Zytosol-Glyzerol-Gemischs jeweils 500 μl Aqua bidestillata mit Standardreaktionslösung enthielten und die ohne Anwesenheit von ODC freigesetzte Radioaktivität erfassten. Außerdem wurde in 3 weitere Szintillationsgefäße mit 10 ml Quickszint 2000 direkt die pro Probe eingesetzte Menge an $[^{14}\text{CO}_2]$ -markiertem Ornithindihydrochlorid zugefügt (Totals), um den Ausgangswert der in der Messung eingesetzten Radioaktivität zu erhalten. So konnte die im Fil-

terpapier gemessene Radioaktivität auf den Wert des in den Proben enthaltenen radioaktiven Materials bezogen werden.

$$^{14}\text{CO}_2[\text{pmol}]^*) = \frac{\text{CPM}_{\text{Probe}} - \text{CPM}_{\text{Blanc}}}{\text{CPM}_{\text{Total}}} \cdot [1-^{14}\text{C}] - \text{Ornithindihydrochlorid}_{\text{Total}} [\text{pmol}]$$

*) = bei einer Inkubationszeit von 60 min und der eingesetzten Zytosolmenge von 250 µl

CPM = counts per minute

[1-¹⁴C]-Ornithindihydrochlorid_{Total} = im Total enthaltene Stoffmenge [1-¹⁴C]-Ornithindihydrochlorid (s. Herstellerangaben)

Formel 1: Aktivitätsbestimmung der Ornithindecaboxylase (ODC)

Die Berechnung der ODC-Aktivität erfolgte mithilfe oben dargestellter Formel (*Formel 1*). Um die Vergleichbarkeit verschiedener Organproben zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse auf den DNA-Gehalt [mg] des jeweiligen Gewebes bezogen. Die Angabe der Stoffmenge ¹⁴CO₂ als Maß für die ODC-Aktivität erfolgte damit in **pmol ¹⁴CO₂/h/mg DNA**.

2.6.2.2 S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC)

Die Aktivitätsbestimmung der S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC) erfolgte nach der Methode von Pegg und Pösö (*Pegg und Pösö, 1983*). Zugrunde liegendes Prinzip war die Messung der Stoffmenge ¹⁴CO₂ [nmol], die aus [Carboxyl-¹⁴C]-markiertem S-Adenosyl-L-Methionin in einer Zeit von 30 min freigesetzt wurde. 100 µl Zytosol wurden mit 167,5 µl eines Substratgemisches aus 12,5 µmol Natriumphosphatpuffer (pH 7,5), 5 µmol Putrescin, 0,75 µmol Dithiothreitol, 0,05 µmol S-Adenosyl-L-Methionin und 0,02 µmol S-Adenosyl-L-[Carboxyl-¹⁴C]-Methionin (2,11 GBq/mmol) bei einer Temperatur von 37 °C 30 min im Wasserbad inkubiert. Analog zur ODC-Messung fing ein mit 20 µl Methylbenzethoniumhydroxid getränktes Filterpapier das im Reagenzröhrchen freiwerdende ¹⁴CO₂ auf. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 150 µl 20%iger Schwefelsäure gestoppt und nach 30 min Nachinkubation wurde das Filterpapier in ein Szintillationsgefäß mit 10 ml der Szintillationsflüssigkeit Quickszint 2000 gegeben. Auch hier erfolgte die Messung der vom Filter aufgenommenen Radioaktivität im Beckman LS-2800 Liquid Scintillation System erst nach 24 h und zusätzlich zu jeder Messreihe wurden Blancs und Totals erstellt.

$$^{14}\text{CO}_2[\text{nmol}]^*) = \frac{\text{CPM}_{\text{Probe}} - \text{CPM}_{\text{Blanc}}}{\text{CPM}_{\text{Total}}} \cdot [\text{Carboxyl-}^{14}\text{C}]\text{-S-Adenosyl-L-Methionin}_{\text{Total}} [\text{nmol}]$$

*) = bei einer Inkubationszeit von 30 min und der eingesetzten Zytosolmenge von 100 µl

CPM = counts per minute

[Carboxyl-¹⁴C]-S-Adenosyl-L-Methionin_{Total} = im Total enthaltene Stoffmenge [Carboxyl-¹⁴C]-S-Adenosyl-L-Methionin (s. Herstellerangaben)

Formel 2: Aktivitätsbestimmung der S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC)

Nach Berechnung mithilfe der angegebenen Formel (*Formel 2*) und bezogen auf den DNA-Wert wurde die Aktivität der SAM-DC in **nmol ¹⁴CO₂/30 min/mg DNA** angegeben.

2.6.2.3 Spermidin-/Spermin-N₁-Acetyltransferase (SAT)

Die von Matsui beschriebene und durch Pegg und Erwin modifizierte Methode zur Bestimmung der Spermidin-/Spermin-N₁-Acetyltransferase (SAT) misst das in einer Zeit von 10 min gebildete ¹⁴C-markierte N₁-Acetylspermidin, das SAT-katalysiert aus Spermidin und [¹⁴C]-Acetyl-CoA entsteht (*Matsui et al., 1981; Pegg und Erwin, 1985*).

5 µl Zytosol wurden mit 200 µl 0,1 M Trispuffer (pH 7,8) gemischt. Nach einer 30minütigen Inkubation im Wasserbad wurden 21µl eines Reaktionsgemisches aus 300 nmol Spermidin, 8,2 nmol [1-¹⁴C]-Acetyl-Coenzym A (2,07 GBq/mmol) und 0,1 M Trisphosphatpuffer (pH 7,8) zugegeben und nach weiteren 10 min Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von 20 µl 1 M Hydroxylaminhydrochlorid im Eppendorf-Tischthermostat 5320 bei 100 °C in 3 min gestoppt. Die unmittelbar danach eisgekühlte Lösung wurde 5 min bei 1250 Umdrehungen/min zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurde auf einen mit Aqua bidestillata angefeuchteten Whatman Zellulosephosphat-Filter P 81 im Millipore Filterwäscher aufgetragen, der jeweils mit 5x5 ml Aqua bidestillata und 2x5 ml reinem Äthanol ausgewaschen wurde. Die Filter wurden getrocknet und in Szintillationsgefäße mit je 10 ml Szintillationsflüssigkeit Quickszint 2000 gegeben. Nach 24 h wurde im Beckman LS-2800 Liquid Scintillation System die aufgenommene Radioaktivität bestimmt. Analog zur ODC-Bestimmung erfolgte parallel die Messung von Blancs und Totals.

$$[^{14}\text{C}]-N_1\text{-Acetylspermidin}[\text{pmol}]^{*)} = \frac{\text{CPM}_{\text{Probe}} - \text{CPM}_{\text{Blanc.}}}{\text{CPM}_{\text{Total}}} \cdot [^{14}\text{C}]-\text{Acetyl-CoA}_{\text{Total}}[\text{pmol}]$$

*) = bei einer Inkubationszeit von 10 min und der eingesetzten Zytosolmenge von 5 µl

CPM = counts per minute

[¹⁴C]-Acetyl-CoA_{Total} = im Total enthaltene Stoffmenge [¹⁴C]-Acetyl-CoA (s. Herstellerangaben)

Formel 3: Aktivitätsbestimmung der Spermidin-/Spermin-N₁-Acetyltransferase (SAT)

Die Berechnung wurde entsprechend dargestellter Formel (*Formel 3*) durchgeführt und das Ergebnis auf den DNA-Gehalt bezogen. Damit ergab sich für die Aktivität der SAT die Einheit **pmol [¹⁴C]-N₁-AcSpd./min/mg DNA**.

2.6.3 Bestimmung der trophischen Parameter

2.6.3.1 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Der Bestimmung des DNA-Gehaltes lag die Methode von Labarca und Paigen zugrunde (*Labarca und Paigen, 1980*). 150 µl des Homogenats wurden im Verhältnis 1:4 mit 2 M NaCl verdünnt und auf Eis gelagert. Indem die Probe 4x15 s mit dem Sonicator Cell Disruptor beschallt wurde, wurden die Zellmembranen zerstört. Es folgte die weitere Verdünnung mit einem Puffer aus 10 mM EDTA-Na₂, 2 M NaCl und 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄-H₂O (pH 7,4)) zunächst im Verhältnis 1:25 und schließlich im Verhältnis 1:5, so dass eine Endverdünnung von 1:2500 bzw. bei geringen Stoffmengen 1:5000 resultierte. Zu 2 ml dieser Lösung wurden der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimidazol (H33258) und ein Puffer aus 9,85 µmol EDTA, 1,97 mmol Natriumchlorid und 0,05 µmol Dinatriumhydrogenphosphat beigemischt. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte im Fluoreszenzspektrophotometer die Messung der Extinktion bei 356 nm und 458 nm. Dem Erstellen einer Eichkurve als Referenz diente eine Verdünnungsreihe mit absteigendem Kalbsthymus-DNA-Gehalt von 10, 2, 1,25, 1, 0,8, 0,4 und 0,2 µg/ml. Der DNA-Gehalt wurde nach unten dargestellter Formel unter Verwendung eines aus der Standardreihe bestimmten Quotienten aus Konzentration/Extinktion (Q) berechnet und in **mg DNA/g Organ** angegeben (*Formel 4*).

$$Extinktion_{Probe} \cdot Q_{Standard} \cdot \left(\frac{Verdünnung_{Probe}}{1000} \right) = \left[\frac{[mg]DNA^*}{[g]Organ} \right]$$

*) = in der Berechnung der Proteinkonzentration Angabe in [mg]Protein/[g]Organ

Formel 4: Bestimmung der DNA- und Proteinkonzentration

2.6.3.2 Proteine

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford ermittelt (*Bradford, 1976*). Hierbei wurde die Extinktion des an Protein gebundenen Bio-Rad-Proteinreagenzes Coomassie Brilliant Blue G-250 gemessen. 100 µl Rohhomogenat wurden 100 µl 1 M Natriumhydroxid zugefügt und 50 µl dieses Gemischs wurden mit 1200 µl Aqua bidestillata verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden wiederum mit 5 ml 20%igem Bio-Rad-Proteinreagenz vermischt. Auch hier wurde eine Verdünnungsreihe von 200 bis 1400 µg/ml als Referenz zum Erstellen einer Eichkurve angefertigt, wobei die Stammlösung aus 100 mg in 10 ml Aqua bidestillata gelöstem Rinderserumalbumin bestand. Die Messung der Extinktion im Fluoreszenzspektrophotometer erfolgte bei 595 nm gegen den Leerwert, den ein 20%iges Farbreagenz bildete. Die Proteinkonzentrationen wurden mithilfe der bereits bei der DNA-Berechnung angewandten Formel berechnet (*Formel 4*) und in **mg Protein/g Organ** angegeben.

2.7 Statistische Analysen

Während des Versuchszeitraums spontan verstorbene Tiere wurden in den Auswertungen nicht berücksichtigt, da eine intravitale Perfusionsfixation zur optimalen Darstellung der Gewebeeränderungen in diesen Fällen nicht mehr möglich war. Darüber hinaus verhinderten teilweise fortgeschrittene Autolyseprozesse die biochemische Messung der am Polyaminstoffwechsel beteiligten Parameter.

Die statistischen Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Inf. J. Hedderich vom Institut für Medizinische Informatik und Statistik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sowie mit Herrn Dr. W. Reimers, dessen Auswertungen mit dem Programmpaket

MATERIAL UND METHODEN

STATISTICA der Firma StatSoft, Inc., Tulsa, USA durchgeführt wurden (*StatSoft, Inc.: STATISTICA für Windows (Software-System für Datenanalyse, Version 9.1). Eigenverlag: Tulsa, USA, 2010*).

Zur Darstellung und weiteren Bearbeitung der gewonnenen Daten wurden folgende Kennwerte bestimmt: Anzahl der gültigen Werte (N), arithmetischer Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD). Unterschiede zwischen den unabhängigen Stichproben wurden als „statistisch signifikant“ bezeichnet, wenn die angewandten Tests eine Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 (=5 %) ergaben (*Sachs, 2004; Pospeschill, 2006*). Eine „hochsignifikante“ Differenz beschrieb eine Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 0,0025 (=0,25 %) und eine „tendenziell signifikante Differenz“ bezeichnete eine Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner 0,1 (10 %).

Bei der Analyse der in den verschiedenen Versuchsgruppen gemessenen Enzymwerte (Ermittlung von Unterschieden in den Mittelwerten stetiger Variablen) wurden zum Vergleich zweier Gruppen der U-Test von Mann und Whitney bzw. zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen die Varianzanalyse von Kruskal und Wallis (H-Test) angewandt (*Diagramm 17 bis 32*).

Die Auswertung der Tumoren (Ermittlung von Unterschieden in der Häufigkeitsverteilung diskreter Variablen) erfolgte mit der Aufstellung von Vierfeldertafeln bzw. $k \times c$ -Felder-Tafeln und dem χ^2 -Test. Im Falle von sehr kleinen Besetzungszahlen wurde der Test nach Fisher angewandt (*Diagramm 7 bis 12*).

Für den Vergleich der Wachstumskurven (*Diagramm 1 und 2*) wurden jeweils die Flächen unter den Kurven („area under curve“/AUC), das Maximum, das Minimum sowie die Spannweite (Differenz aus Maximum und Minimum) ermittelt (*Bender und Lange, 2001*).

3 ERGEBNISSE

3.1 Vorzeitig verstorbene Versuchstiere

Die in Kapitel 2.4 erläuterte Ausbreitung einer Pneumonie führte zum vorzeitigen Tod von insgesamt 13 Versuchstieren. Da die in dieser Studie angewandte intravitale Perfusionsfixation zur histologischen Aufbereitung bei diesen Tieren nicht mehr durchgeführt werden konnte, wurden sie in den statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt.

Unter Standardkost starben drei Tiere der Kurzzeitgruppe (Gruppe SK 1) 59, 69 und 79 Tage nach NNM-Stopp und ein Tier der Langzeitgruppe (Gruppe SK 2) 102 Tage nach Absetzen des Karzinogens (*Tabelle 1*). In den Gruppen mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost traten bei den Kurzeittieren (Gruppe PAD 1) keine Todesfälle auf. In der Langzeitgruppe (Gruppe PAD 2) verstarben drei Tiere 78, 79 und 84 Tage nach Beenden der NNM-Medikation. In den Gruppen mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Diät plus DFMO traten zwei Todesfälle bei den Kurzeittieren (Gruppe DFMO 1) 54 und 58 Tage nach NNM-Stopp auf. Bei den Langzeittieren (Gruppe DFMO 2) kam es ebenfalls zu zwei Todesfällen an Tag 88 nach NNM-Gabe. Unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin verstarben zwei Tiere der Langzeitgruppe (Gruppe PRD 2) 95 und 96 Tage nach NNM-Medikation.

Für die einzelnen Versuchsgruppen ergaben sich infolge der vorzeitigen Tierverluste die auf der nächsten Seite in *Tabelle 5* dargestellten Gruppenstärken.

Standardkost	<i>Kurzzeitgruppe</i>	Gruppe SK 1	<u>7 Tiere</u>
Standardkost	<i>Langzeitgruppe</i>	Gruppe SK 2	<u>9 Tiere</u>
polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz	<i>Kurzzeitgruppe</i>	Gruppe PAD 1	<u>10 Tiere</u>
polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz	<i>Langzeitgruppe</i>	Gruppe PAD 2	<u>7 Tiere</u>
polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz + α-Difluoromethylornithin	<i>Kurzzeitgruppe</i>	Gruppe DFMO 1	<u>8 Tiere</u>
polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz + α-Difluoromethylornithin	<i>Langzeitgruppe</i>	Gruppe DFMO 2	<u>9 Tiere</u>
polyaminreiche Diät + Aminoguanidin	<i>Kurzzeitgruppe</i>	Gruppe PRD 1	<u>10 Tiere</u>
polyaminreiche Diät + Aminoguanidin	<i>Langzeitgruppe</i>	Gruppe PRD 2	<u>9 Tiere</u>

Tabelle 5:

Gruppenstärken infolge des vorzeitigen Todes einzelner Versuchstiere

3.2 Körpergewicht, Organgewicht und Nahrungsaufnahme

Der Versuch endete für die Tiere der Kurzzeitgruppen 70 Tage und für die Tiere der Langzeitgruppen 98 Tage nach letztmaliger NNM-Gabe, wodurch in der Auswertung zwei Entwicklungsstadien erfasst wurden, die 28 Tage auseinander lagen. Für die statistische Auswertung von Körpergewicht und Nahrungsaufnahme wurde der Zeitraum von Tag 12 (Alter der Tiere bei Lieferung) bis jeweils 1 Tag vor Beginn der Pneumonieausbreitung gewählt, da mit dem Auftreten einzelner Krankheitsfälle innerhalb der Gruppen sehr stark voneinander abweichende Individualverläufe bzgl. Gewicht und Nahrungsaufnahme einsetzten und die Betrachtung von Mittelwerten keine zuverlässige Beurteilung eventueller gruppenspezifischer Tendenzen mehr zuließ. Der in der Betrachtung der Kurvenverläufe festgelegte Beginn der Pneumonieausbreitung orientierte sich an dem erstmaligen Auftreten der klinischen Symptome Husten und blutiger Auswurf und entsprach bei den Kurzzeittieren Tag 138, bei den Langzeit-tieren Tag 166.

ERGEBNISSE

Die zeitliche Entwicklung des Körpergewichts zeigte im Vergleich der Kurzzeitgruppen bzw. der Langzeitgruppen einen weitgehend übereinstimmenden Kurvenverlauf (*Diagramm 1 und 2*), wobei das Gewicht der DFMO-Tiere in beiden Diagrammen vergleichsweise niedrige Werte aufwies. Zur Überprüfung dieser Beobachtungen wurden die durchschnittlichen maximalen Körpergewichte sowie die Flächen unter den Kurven („area under curve“/AUC) errechnet (*Diagramm 3 a und b*). Insgesamt traten im Vergleich der durchschnittlichen maximalen Körpergewichte keine statistisch signifikanten Differenzen auf (*Diagramm 3 a*). Tendenziell lagen in allen Versuchsgruppen die Maximalgewichte der Kurzzeittiere leicht unter den Maximalgewichten der Langzeittiere und sowohl bei den Kurzzeittieren als auch bei den Langzeittieren erreichte jeweils die Gruppe mit polyaminarmer Kost und zusätzlich verabreichtem DFMO den niedrigsten Wert (345 ± 21 g in Gruppe DFMO 1 und 377 ± 36 g in Gruppe DFMO 2). Die Analyse der Flächen unter den Kurven bestätigte diese Beobachtungen (*Diagramm 3 b*). Kurvenverläufe der Kurzzeitgruppen wiesen insgesamt kleinere AUC-Werte auf als die entsprechenden Langzeitgruppen und die geringsten AUC-Werte ergaben sich bei Kurzzeittieren und Langzeittieren unter polyaminarmer Kost plus DFMO (29504 ± 1147 in Gruppe DFMO 1 und 38249 ± 3948 in Gruppe DFMO 2). Statistisch signifikante Unterschiede waren auch in der Analyse der AUC-Werte nicht zu ermitteln.

Zur Enzymdiagnostik wurden unmittelbar vor der Perfusionsfixation der Mittellappen der Leber und die linke Niere entfernt. Um Auswirkungen der unterschiedlichen Behandlungsmuster auf das Proliferationsverhalten des Parenchyms zu erfassen, wurden die entnommenen Nieren gewogen und das Feuchtgewicht pro kg Körpergewicht bestimmt (*Diagramm 4*). Das durchschnittliche Feuchtgewicht der verschiedenen Versuchsgruppen betrug zwischen $3,41 \pm 0,71$ g pro kg Körpergewicht in Gruppe SK 1 und $3,94 \pm 0,66$ g pro kg Körpergewicht in Gruppe DFMO 2. Signifikante Differenzen traten im Vergleich der Versuchsgruppen sowie im Vergleich zwischen Kurzzeittieren und Langzeittieren nicht auf. Da die entnommenen Lebermittellappen in sehr unterschiedlichem Ausmaß von teilweise massiv ausgedehnten tumorösen Veränderungen betroffen waren (*Abbildung 6*), entfiel hier eine Vergleichbarkeit der Organgewichte.

Der Futter- und Wasserverbrauch zeigte, dass Tiere der Standardkostgruppen im Vergleich zu den anderen Ernährungsgruppen etwas mehr Nahrung und Wasser zu sich nahmen, wobei diese Differenz nicht signifikant war (*Diagramm 5 und 6*). Unterschiedliche geschmackliche

Eigenschaften der Nahrung oder beigefügte durstverstärkende Inhaltsstoffe scheiden als ursächlich aus, da die Zusammensetzung der Nahrungssorten abgesehen vom Polyamingehalt identisch war. Die durchschnittliche aufgenommene Futtermenge lag insgesamt bei $15,3 \pm 1,2$ g/d/Tier. Die durchschnittliche Trinkmenge betrug $21 \pm 2,3$ ml/d/Tier.

3.3 Auswirkungen eines veränderten Polyaminhaushalts auf Tumorgenese und Tumorwachstum in der Leber

Die unterschiedlichen NNM-induzierten Leberveränderungen wurden absolut und prozentual ausgewertet. Da aufgrund der starken Durchsetzung des Lebergewebes mit präneoplastischen Zellherden (Foci) eine diesbezügliche genaue Zahlenangabe nicht immer möglich war, wurde die Häufigkeit des Auftretens in den 3 Ausprägungen „wenige“, „mehrere“ und „multipel auftretende“ Foci angegeben. Entsprechend der in der Literatur beschriebenen Abfolge NNM-induzierter Veränderungen wurden die präneoplastischen Zellherde in klarzellige (*Abbildung 7 und 8*), gemischtzellige und basophilzellige Foci unterteilt, die sich insbesondere im Glykogengehalt der Zellen unterschieden. Eher selten beschriebene azidophilzellige und amphophilzellige Foci konnten in dieser Arbeit ebenfalls diagnostiziert werden und wurden als zeitgleich mit klarzelligen Foci auftretende Veränderungen betrachtet.

Für jede der drei Häufigkeitsausprägungen wurde ein Verteilungsmuster der unterschiedlichen Foci erstellt. Wie aus der tabellarischen Auflistung aller präneoplastischen Herde ersichtlich wird (*Tabelle 6*), zeigten multipel auftretende Foci oft ausschließlich klarzellige und gemischtzellige Eigenschaften. Selten auftretende präneoplastische Herde („wenige Foci“) wiesen dagegen häufig hohe Anteile des außerhalb der regulären Zellreihe entstehenden azidophilzelligen und amphophilzelligen Typs auf. Mit einer mittleren Häufigkeit auftretende Foci („mehrere Foci“) bildeten ein gut auswertbares Spektrum der üblichen unter NNM bekannten Herdtypen ab und wurden in dieser Arbeit daher der histologischen Auswertung zugrunde gelegt (*Diagramm 16*).

Wie präneoplastische Zellherde zeigten auch hepatozelluläre Adenome (HCA) klarzellige, gemischtzellige oder basophilzellige Eigenschaften (*Abbildung 9 und 10*). Bezogen auf die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit ergaben sich aus dem Verteilungsmuster jedoch keine relevanten Ergebnisse. Gleiches gilt für hepatozelluläre Karzinome (HCC), deren unter-

schiedliche Färbeeigenschaften in der statistischen Auswertung ebenfalls nicht berücksichtigt wurden. Aufschlussreicher waren dagegen die Unterscheidungen anhand des Malignitätsgrades (G1 bis G3) und der Größe der HCC. Der Einteilung in verschiedene Malignitätsgrade lagen Häufung und Ausprägung allgemeingültiger Malignitätskriterien zugrunde. G1-Karzinomzellen ähnelten normalen Hepatozyten und wiesen eine trabekuläre Wachstumsstruktur auf (*Abbildung 11, 12 und 13*). In G2-Karzinomen traten größere und prominente Zellkerne auf und vereinzelt waren glanduläre Wachstumsstrukturen erkennbar (*Abbildung 14, 15 und 16*). G3-Karzinome verfügten über eine solide Wachstumsstruktur mit einem deutlich veränderten Kern/Zytoplasma-Verhältnis, einem basophilen Zytoplasma und sehr häufig auftretenden Mitosen und Apoptosen (*Abbildung 17 und 18*).

Aus der Literatur bekannte NNM-induzierte Veränderungen an Lebergefäßen oder Gallengängen wurden in dieser Arbeit insbesondere in Form von Angiosarkomen (AS) (*Abbildung 19 und 20*) und cholangiozellulären Adenomen (CCA) (*Abbildung 21*) diagnostiziert. Ebenfalls in der Literatur beschriebene Nierentumoren konnten mithilfe des histologischen screenings der jeweils rechten Niere ausgeschlossen werden.

3.3.1 Erkrankungshäufigkeit

In den Diagrammen 7 und 8 wurde das prozentuale Auftreten der verschiedenen NNM-induzierten Lebertumorentitäten zusammengefasst sowie im Einzelnen dargestellt. Prä-neoplastische Leberzellherde wurden als eigenständige Kategorie betrachtet. 10 Wochen nach NNM-Gabe traten die meisten Tumorerkrankungen unter Standardkost auf (71 %) (*Diagramm 7*). Die niedrigste Tumorrage lag bei Tieren mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost plus DFMO vor (25 %). Tiere mit alleiniger polyaminarmer, antibiotikahaltiger Diät und Tiere mit polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin bildeten nach 10 Wochen zu gleichen Anteilen Tumoren aus (jeweils 50 % in Gruppe PAD 1 und in Gruppe PRD 1). Nach 14 Wochen wiesen in allen Gruppen deutlich mehr bzw. alle Tiere Tumoren auf (jeweils 100 % in den Gruppen SK 2, PAD 2 und PRD 2 und 44 % in Gruppe DFMO 2) (*Diagramm 8*). Hier war das Erkrankungsrisiko unter polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost plus DFMO gegenüber allen anderen Versuchsgruppen sogar signifikant gesenkt (jeweils $p < 0,05$).

In der differenzierten prozentualen Auswertung der Tiere mit hepatozellulärem Karzinom bzw. Adenom (*Diagramm 7 und 8*) stieg das Erkrankungsrisiko zwischen der 10. und 14. Wo-

ERGEBNISSE

che ebenfalls in nahezu allen Ernährungsgruppen erkennbar an (SK: 57 % HCC auf 78 % HCC; PAD: 30 % HCC auf 86 % HCC und 20 % HCA auf 71 % HCA; PRD: 40 % HCC auf 89 % HCC und 30 % HCA auf 44 % HCA. Nur der Anteil unter Standardkost diagnostizierter Leberzelladenome ging von 71 % auf 56 % zurück. In den DFMO-Gruppen war das prozentuale Auftreten hepatozellulärer Karzinome und Adenome nach 10 und 14 Wochen gegenüber den anderen Versuchsgruppen deutlich reduziert. Bezüglich der Karzinombildung nach 14 Wochen war diese Reduzierung gegenüber den Gruppen PAD und PRD signifikant (22 % HCC in Gruppe DFMO 2 gegen 86 % HCC in Gruppe PAD 2 und 89 % HCC in Gruppe PRD 2 ($p < 0,05$)). Im Vergleich zu den Standardkosttieren fiel die Reduzierung mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,1$ noch „tendenziell statistisch signifikant“ aus (22 % in Gruppe DFMO 2 gegen 78 % in Gruppe SK 2 ($p < 0,1$)).

Unter alleiniger polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost lag der Anteil karzinom- bzw. adenomausbildender Tiere 10 Wochen nach NNM-Gabe über den entsprechenden Ergebnissen der DFMO-Gruppe (30 % HCC und 20 % HCA in Gruppe PAD 1 gegen jeweils 13 % HCC bzw. HCA in Gruppe DFMO 1) (*Diagramm 7*). Gegenüber den Standardkostergebnissen (57 % HCC und 71 % HCA in Gruppe SK 1) war die Erkrankungsrate deutlich, wenn auch nicht signifikant, gesenkt. Nach 14 Wochen ergab der Vergleich zwischen PAD-Tieren und Standardkosttieren sowohl für Karzinome als auch für Adenome ein bei PAD-Tieren leicht erhöhtes Erkrankungsrisiko (86 % HCC und 71 % HCA in Gruppe PAD 2 gegen 78 % HCC und 56 % HCA in Gruppe SK 2) (*Diagramm 8*).

Tiere mit polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin bildeten 10 Wochen nach NNM-Applikation seltener hepatozelluläre Karzinome und Adenome aus als Standardkosttiere (40 % HCC und 30 % HCA in Gruppe PRD 1 gegen 57 % HCC und 71 % HCA in Gruppe SK 1) (*Diagramm 7*). Gegenüber Tieren mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Diät ohne bzw. plus DFMO zeigten sie allerdings ein erhöhtes Krankheitsrisiko (30 % HCC und 20 % HCA in Gruppe PAD 1 bzw. jeweils 13% HCC und HCA in Gruppe DFMO 1). 14 Wochen nach NNM-Applikation lag der Anteil adenomerkrankter PRD-Tiere weiterhin, wenn auch weniger deutlich, unter dem entsprechenden Standardkostergebnis (44 % HCA in Gruppe PRD 2 gegen 56 % HCA in Gruppe SK 2) (*Diagramm 8*). Bezüglich der Karzinomentwicklung war das Risiko unter polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin allerdings jetzt gegenüber Standardkostbedingungen erhöht (89 % HCC in Gruppe PRD 2 gegen 78 % HCC in Gruppe SK 2).

In der Leber lokalisierte Angiosarkome traten im Vergleich zu hepatozellulären Karzinomen und Adenomen insgesamt weniger häufig auf (*Diagramm 7 und 8*). Tiere der DFMO-Gruppen bildeten auffälligerweise überhaupt keine Angiosarkome aus. In den anderen Versuchsgruppen lagen die Erkrankungsraten nach 10 Wochen zwischen 10 % (Gruppe PAD 1) und 20 % (Gruppe PRD 1) (*Diagramm 7*) und nach 14 Wochen zwischen 11 % (Gruppe SK 2) und 43 % (Gruppe PAD 2) (*Diagramm 8*).

Ein cholangiozelluläres Karzinom (CCC) wurde lediglich unter Standardkost 10 Wochen nach letztmaliger NNM-Exposition befundet (*Diagramm 7*). Cholangiozelluläre Adenome (CCA) traten bei allen Ernährungsgruppen auf, wobei nach 10 Wochen nur Tiere mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost ohne bzw. plus zusätzlich verabreichtes DFMO betroffen waren (10 % CCA in Gruppe PAD 1 und 25 % CCA in Gruppe DFMO 1) (*Diagramm 7*). Nach 14 Wochen wurden auch unter Standardkosttieren und PRD-Tieren cholangiozelluläre Adenome diagnostiziert (*Diagramm 8*). Zu diesem Zeitpunkt wiesen alle Gruppen eine etwa vergleichbare Erkrankungshäufigkeit zwischen 11 % in Gruppe PRD 2 und jeweils 22 % in den Gruppen SK 2 und DFMO 2 auf.

Sowohl nach 10 als auch nach 14 Wochen hatten ausnahmslos alle Tiere präneoplastische Leberzellherde entwickelt, sodass Aussagen bzgl. eines unterschiedlichen Erkrankungsrisikos nicht möglich waren (*Diagramm 7 und 8*).

3.3.2 Gesamtzahl hepatozellulärer Karzinome und Adenome

Die niedrigsten Gesamtzahlen traten sowohl 10 als auch 14 Wochen nach NNM-Exposition in den Gruppen mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Diät und DFMO auf (*Diagramm 9 und 10*). Insbesondere die Anzahl der hepatozellulären Karzinome zeigte sich bei den DFMO-Tieren im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen deutlich erniedrigt. 14 Wochen nach NNM-Gabe war diese Differenz zu den PRD-Tieren signifikant (3 HCC in Gruppe DFMO 2 gegen 30 HCC in Gruppe PRD 2 ($p < 0,05$)) (*Diagramm 9*).

Unter alleiniger polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost entsprachen die nach 10 und 14 Wochen diagnostizierten hepatozellulären Karzinome den Ergebnissen der Standardkostgruppen (5 HCC in Gruppe PAD 1 gegen 6 HCC in Gruppe SK 1 und 18 HCC in Gruppe PAD 2 gegen 17 HCC in Gruppe SK 2) (*Diagramm 9*). Die Gesamtzahl der Adenome war bei den

PAD-Tieren 10 Wochen nach NNM-Applikation zunächst gegenüber der Adenomzahl unter Standardkost reduziert (4 HCA in Gruppe PAD 1 gegen 7 HCA in Gruppe SK 1) (*Diagramm 10*), nach 14 Wochen hatten sich bei den PAD-Tieren allerdings mehr Adenome ausgebildet als bei den SK-Tieren (10 HCA in Gruppe PAD 2 gegen 8 HCA in Gruppe SK 2).

Unter polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin konnten teilweise erhöhte Tumorgesamtzahlen festgestellt werden. Hepatozelluläre Karzinome traten bei PRD-Langzeittieren im Vergleich zur Standardkostgruppe fast doppelt so häufig auf (30 HCC in Gruppe PRD 2 gegen 17 HCC in Gruppe SK 2) (*Diagramm 9*). Hepatozelluläre Adenome zeigten sich dagegen vor allem bei den PRD-Kurzzeittieren gegenüber den anderen Versuchsgruppen vermehrt (10 HCA in Gruppe PRD 1 gegen 7 HCA in Gruppe SK 1, 4 HCA in Gruppe PAD 1 und 2 HCA in Gruppe DFMO 1) (*Diagramm 10*). Eine Zunahme der Adenomgesamtzahl erfolgte zwischen der 10. und 14. Woche nach NNM-Applikation unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin im Gegensatz zu allen anderen Versuchsgruppen nicht (jeweils 10 HCA in Gruppe PRD 1 und PRD 2) (*Diagramm 10*). Die Zunahme der hepatozellulären Karzinome dagegen fiel zwischen der 10. und 14. Woche bei PRD-Tieren deutlicher aus als in den anderen Gruppen (6 HCC in Gruppe PRD 1 gegen 30 HCC in Gruppe PRD 2) (*Diagramm 9*).

3.3.3 Anzahl hepatozellulärer Karzinome und Adenome pro Tier

In den Gruppen mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost und zusätzlich verabreichtem DFMO war die auf das einzelne Tier bezogene Ausbildung hepatozellulärer Karzinome 10 und 14 Wochen nach Karzinogenverabreichung im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen erniedrigt (*Diagramm 11 und 12*). Entsprechend der Auswertung der HCC-Gesamtzahlen war dieser Unterschied nach 14 Wochen zu den Tieren mit polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin signifikant (1,5 HCC in Gruppe DFMO 2 gegen 3,8 HCC in Gruppe PRD 2 ($p < 0,05$)) (*Diagramm 11*). Bezüglich der Adenomausbildung pro Tier fiel unter den DFMO-Tieren gegenüber den SK- und PAD-Gruppen keine Reduzierung auf (*Diagramm 12*).

Unter polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost traten im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen weder bzgl. der hepatozellulären Karzinome pro Tier noch bzgl. der hepatozellulären Adenome pro Tier signifikante Unterschiede auf. Bei Tieren mit polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin deutete sich bei den ausgebildeten hepatozellulären Adenomen pro Tier 10

und 14 Wochen nach NNM-Gabe mit 3,3 HCA pro Tier in Gruppe PRD 1 und 2,5 HCA pro Tier in Gruppe PRD 2 eine Erhöhung gegenüber allen anderen Versuchsgruppen an (*Diagramm 12*). Die Entstehung hepatozellulärer Karzinome pro Tier zeigte sich bei den PRD-Tieren nur nach 14 Wochen mit durchschnittlich 3,8 HCA pro Tier ebenfalls erkennbar erhöht (*Diagramm 11*).

Ein Anstieg der pro Tier diagnostizierten Befunde zwischen der 10. und 14. Woche nach NNM-Gabe trat vor allem bei den hepatozellulären Karzinomen und hier besonders unter PRD-Tieren auf (von 1,5 HCC in Gruppe PRD 1 auf 3,8 HCC in Gruppe PRD 2) (*Diagramm 11*). Die hepatozellulären Adenome pro Tier nahmen allenfalls diskret bei SK-Tieren zu (von 1,4 HCA in Gruppe SK 1 auf 1,6 HCA in Gruppe SK 2) (*Diagramm 12*). Bei PAD-Tieren veränderte sich die Adenomanzahl pro Tier im zeitlichen Verlauf nicht und bei DFMO- und PRD-Tieren nahm sie sogar ab (von 2,0 HCA in Gruppe DFMO 1 auf 1,7 HCA in Gruppe DFMO 2 bzw. von 3,3 HCA in Gruppe PRD 1 auf 2,5 HCA in Gruppe PRD 2).

3.3.4 Malignitätsgrad und Größe der hepatozellulären Karzinome

In der Auswertung der Malignitätsgrade wurden nur Langzeittiere berücksichtigt, bei denen der zeitliche Abstand zur letztmaligen NNM-Applikation 14 Wochen betrug. Bei den 10 Wochen nach NNM-Gabe getöteten Kurzzeittieren erwies sich eine Unterscheidung der Malignitätsgrade aufgrund der geringen Tumorgesamtzahl als nicht sinnvoll.

Unter Standardkost wurden 70 % der nach 14 Wochen diagnostizierten hepatozellulären Karzinome dem Malignitätsgrad G2 zugeordnet (*Diagramm 13*). 18 % der Karzinome wurden niedriger maligne (G1) und 12 % höher maligne (G3) eingestuft. Bei den Tieren mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost war im Vergleich dazu der Anteil der G3-Karzinome mit 6 % deutlich reduziert und niedrig maligne Karzinome traten mit 39 % vermehrt auf. Leberzellkarzinome der Tiere mit polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin zeigten im Vergleich zur Standardkostgruppe bei einem etwa gleich hohen Anteil an G1-Karzinomen (17 %) erkennbar häufiger hochmaligne Eigenschaften (33%). Unter DFMO 2-Tieren wurden keine G3-Karzinome diagnostiziert und gegenüber den anderen Gruppen trat hier der weitaus höchste Anteil an niedrigmalignen G1-Befunden auf (67 %).

Bezüglich der Größe (Durchmesser in mm) der 14 Wochen nach NNM-Gabe induzierten hepatzellulären Karzinome (*Diagramm 14*) zeigten die Standardkost-Langzeittiere im Vergleich zur PAD 2-Gruppe und zur PRD 2-Gruppe keine Auffälligkeiten. Bei den Tieren der Gruppe DFMO 2 betrug die durchschnittliche Karzinomgröße 4 mm und war damit vergleichsweise gering. Der mit Abstand größte Tumor von 6,5 cm Durchmesser wurde nach 10 Wochen unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin diagnostiziert.

3.3.5 Häufigkeit präneoplastischer Leberzellherde

Die Häufigkeit der verschiedenen präneoplastischen Leberzellherde wurde in den 3 Stufen „wenige Foci“, „mehrere Foci“ und „multiple Foci“ angegeben. Im Versuchsverlauf entwickelten alle Tiere präneoplastische Veränderungen, wobei jedem Tier mehrere Herde mit jeweils unterschiedlichen histologischen Eigenschaften und auch unterschiedlichen Häufigkeiten zugeordnet werden konnten (*Tabelle 6*).

Die Auswertung der 7 Standardkost-Kurzzeittiere umfasste 10 Wochen nach NNM-Gabe insgesamt das 28malige Vorkommen unterschiedlicher präneoplastischer Leberzellherde, wobei diese größtenteils mit einer geringen Häufigkeit auftraten (47 % „wenige Foci“) (*Diagramm 15*). 39 % aller Präneoplasien wiesen eine mittlere Häufigkeit auf und nur 14 % der Foci wurden sehr häufig diagnostiziert. 4 Wochen später überwogen präneoplastische Zellherde mit einer mittleren Häufigkeit (58 %). „Wenige Foci“ traten seltener (25 %) und „multiple Foci“ häufiger (17 %) auf. Unter polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost zeigte 10 Wochen nach NNM-Gabe die Häufigkeitsverteilung unter den insgesamt 30 diagnostizierten präneoplastischen Herden mit 47 % „wenigen Foci“, 40 % „mehreren Foci“ und 13 % „multiplen Foci“ eine in etwa den Standardkostergebnissen entsprechende Verteilung. Ebenfalls entsprechend den Standardkosttieren nahm 14 Wochen nach NNM-Gabe der Anteil „weniger Foci“ auf 39 % ab und der Anteil „multipler Foci“ auf 22 % zu. Bei Tieren mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost plus DFMO waren die Anteile der „multiplen Foci“ nach 10 und nach 14 Wochen mit 6 % und 5 % gegenüber den anderen Versuchsgruppen deutlich reduziert. 14 Wochen nach NNM-Applikation lag der Anteil „weniger Foci“ bei DFMO-Tieren mit 63 % zudem deutlich über den Ergebnissen in den anderen Gruppen. Tiere mit polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin wiesen 10 Wochen nach NNM-Gabe im Gruppenvergleich den höchsten Anteil an „multiplen Foci“ auf (26 % „multiple Foci“). Der Anteil an „wenigen Foci“ ent-

sprach mit 42 % etwa den Ergebnissen der anderen Gruppen. Zwischen der 10. und 14. Woche fand ausschließlich unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin eine deutliche Verringerung des Anteils „multipler Foci“ von 26 % auf 17 % statt.

3.3.6 Histologische Klassifizierung präneoplastischer Leberzellherde mittlerer Häufigkeit

Unter Standardkost zeigten 10 Wochen nach NNM-Applikation mit insgesamt 64 % (55 % gemischtzellige und 9 % basophilzellige Foci) bereits mehr als die Hälfte der mit einer mittleren Häufigkeit auftretenden präneoplastischen Herde späte histologische Eigenschaften (*Diagramm 16*). 36 % der Foci waren dem initialen klarzelligen Herdtyp zuzuordnen. 4 Wochen später lag der Anteil gemischtzelliger und basophilzelliger Foci zwar nur noch bei 43 % (19 % plus 24 %), die isolierte Betrachtung der im Karzinogeneseverlauf zuletzt auftretenden basophilzelligen Foci zeigte allerdings einen deutlichen Anstieg von 9 % auf 24 %. Amphophilzellige und azidophilzellige Veränderungen traten unter Standardkost erstmalig nach 14 Wochen auf und bildeten einen Gesamtanteil von 24 % (5 % plus 19 %).

Tiere mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost entwickelten sowohl ohne, als auch mit zusätzlich verabreichtem DFMO 10 Wochen nach NNM-Gabe keine basophilzelligen Foci. Unter zusätzlich verabreichtem DFMO fiel nach 10 Wochen allerdings ein gegenüber den PAD-Tieren erheblich vermehrtes Auftreten erster klarzelliger Foci auf (75 % in Gruppe DFMO 1 gegen 41 % in Gruppe PAD 1). Dementsprechend zeigte sich der Anteil späterer gemischtzelliger Foci in Gruppe PAD 1 mit 42 % gegenüber Gruppe DFMO 1 mit 12,5 % erhöht. In beiden Gruppen wurde mit 17 % in Gruppe PAD 1 und 12,5 % in Gruppe DFMO 1 ein etwa gleich großer Anteil initialer azidophilzelliger Foci ausgebildet. 14 Wochen nach NNM-Applikation zeigten sich bei PAD-Tieren erstmals basophilzellige Veränderungen (11 %) und der Anteil gemischtzelliger Foci war mit 56 % gegenüber dem 10-Wochen-Ergebnis von 42 % erhöht. Unter zusätzlichem DFMO waren auch 14 Wochen nach NNM-Applikation – im Gegensatz zu allen anderen Versuchsgruppen – keine basophilzelligen Herde nachweisbar. Der Anteil klarzelliger Foci blieb zwischen der 10. und 14. Woche weitgehend konstant auf dem im Gruppenvergleich höchsten Niveau von 75 % in Gruppe DFMO 1 bzw. 71 % in Gruppe DFMO 2.

Die höchsten Anteile basophilzelliger Foci wurden 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe bei Tieren mit polyaminreicher Ernährung plus Aminoguanidin nachgewiesen. Ähnlich der Standardkostergebnisse stieg dabei der Anteil basophilzelliger Foci zwischen der 10. und 14. Woche deutlich an (von 18 % auf 44 %) bei einem gleichzeitigen Rückgang der gemischtzelligen Anteile (von 46 % auf 21 %). Der Anteil klarzelliger Veränderungen blieb weitgehend konstant (27 % CCF in Gruppe PRD 1 und 21 % CCF in Gruppe PRD 2). Azidophilzellige Herde traten bei PRD-Tieren nach 10 und nach 14 Wochen auf und zeigten während dieses Zeitraumes einen leichten Anstieg von 9 % auf 14 %.

3.4 Intrazellulärer Polyaminstoffwechsel

Die Auswertung der Polyaminstoffwechsellparameter umfasste die beiden Schlüsselenzyme der intrazellulären de novo-Synthese Ornithindecaboxylase (ODC) und S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC) sowie die am Interkonversionsstoffwechsel beteiligte Spermidin-/Spermin-N1-Acetyltransferase (SAT). Daneben wurden die intrazellulären Polyaminkonzentrationen von Putrescin (PUT), Spermin (SPM) und Spermidin (SPD) gemessen und auf den DNA-Gehalt der Gewebeproben bezogen. Zielgewebe der Untersuchungen waren Leber- und Nierengewebe karzinomfreier Tiere, unauffälliges Leber- und Nierengewebe von Tieren mit karzinomatöser Erkrankung und hepatozelluläres Karzinomgewebe. Bei den Langzeittieren mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost (Gruppe PAD 2) war die tumoröse Durchsetzung der Lebermittellappen so weit fortgeschritten, dass eine ausreichende Isolierung unauffälligen Lebergewebes zur Enzym- und Polyaminauswertung nicht möglich war. Daten bezüglich gesunden Lebergewebes wurden in dieser Gruppe daher nicht gewonnen. Unter den Kurzzeittieren mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost plus DFMO (Gruppe DFMO 1) entwickelte nur eines der Versuchstiere ein hepatozelluläres Karzinom, das allerdings nicht den Mittellappen betraf und daher nicht zur Enzym- bzw. Polyaminbestimmung zur Verfügung stand. Entsprechende Messwerte karzinomatösen Gewebes liegen demzufolge nicht vor und auch die Bestimmung einer Standardabweichung war bezogen auf Leber- bzw. Nierengewebe karzinomerkrankter Tiere nicht möglich. Unter den Standardkost-Kurzzeittieren (Gruppe SK 1) konnte nur bei einem der karzinomerkrankten Tiere ausreichend karzinomatöses Lebergewebe aus dem Mittellappen isoliert werden und bei den Standardkost-Langzeittieren (Gruppe SK 2) sowie bei den Langzeittieren mit polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin

(Gruppe PRD 2) trat jeweils nur ein einzelnes makroskopisch karzinomfreies Tier auf. Auch in diesen Fällen wurde keine Standardabweichung ermittelt.

3.4.1 Leber

3.4.1.1 Ornithindecaboxylase (ODC)

In allen Versuchsgruppen, in denen hepatozelluläres Karzinomgewebe isoliert werden konnte, fiel dieses durch erhöhte ODC-Aktivitäten auf (*Diagramm 17*). 10 Wochen nach NNM-Exposition war dieser ODC-Anstieg innerhalb der Versuchsgruppe mit polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin gegenüber Lebergewebe karzinomfreier Tiere sowie gegenüber karzinombenachbartem Lebergewebe signifikant ($144,98 \pm 133,11$ gegen $4,24 \pm 1,74$ und gegen $5,53 \pm 1,98$ pmol $^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg}$ DNA ($p < 0,05$)). Nach 14 Wochen trat die signifikante ODC-Erhöhung karzinomatösen Gewebes nicht nur bei PRD-Tieren auf ($129,92 \pm 77,31$ gegen $6,86 \pm 5,19$ pmol $^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg}$ DNA ($p < 0,0025$)), sondern auch unter Standardkost ($148,98 \pm 144,76$ gegen $13,79 \pm 9,09$ pmol $^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg}$ DNA ($p < 0,05$)) und unter polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost ($89,32 \pm 8,5$ gegen $14,83 \pm 8,27$ pmol $^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg}$ DNA ($p < 0,05$)). Vergleichsproben karzinomfreier Tiere konnten in diesen Gruppen nicht in ausreichendem Umfang gewonnen werden. Auch in der Kurzzeit-PAD-Gruppe (PAD 1) und der Langzeit-DFMO-Gruppe (DFMO 2) lagen die ODC-Werte im entnommenen Karzinomgewebe deutlich über den Ergebnissen der übrigen Lebergewebeproben. Signifikante Unterschiede ergaben sich hier nicht.

Im Vergleich der Lebergewebeproben fielen unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin teilweise signifikant erniedrigte ODC-Aktivitäten auf. 10 Wochen nach NNM-Gabe betraf dies insbesondere den Vergleich zwischen Lebergewebe karzinomfreier PRD-Tiere und entsprechenden Gewebeproben von SK- und PAD-Tieren ($4,24 \pm 1,74$ gegen $22,72 \pm 9,85$ und gegen $12,15 \pm 6,71$ pmol $^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg}$ DNA ($p < 0,05$)). 14 Wochen nach NNM-Gabe war die ODC-Reduzierung in karzinombenachbartem Lebergewebe der PRD-Gruppe gegenüber entsprechenden Gewebeproben der PAD-Gruppe signifikant ($6,86 \pm 5,19$ gegen $14,83 \pm 8,27$ pmol $^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg}$ DNA ($p < 0,05$)).

In karzinomatösem Gewebe erreichte die ODC-Aktivität dagegen unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin größtenteils deutlich höhere Werte als in entsprechenden Proben der anderen Versuchsgruppen – lediglich der ODC-Wert im Karzinomgewebe der Langzeit-SK-Tiere lag über den Ergebnissen der PRD-Tiere. Signifikante Unterschiede wurden hier nicht beobachtet.

Neben den Lebergewebeproben von PRD-Tieren wiesen auch Lebergewebeproben von Tieren mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost plus DFMO vergleichsweise niedrige ODC-Aktivitäten auf. Die höchsten ODC-Werte wurden 10 Wochen nach NNM-Gabe in Lebergewebe von SK-Tieren und 14 Wochen nach NNM-Gabe in Lebergewebe von SK- und PAD-Tieren gemessen, ohne dass hierbei signifikante Unterschiede auftraten.

Die direkte Gegenüberstellung der Leberproben karzinomfreier und karzinomerkrankter Tiere, die aufgrund zu weniger Messergebnisse nicht in allen Versuchsgruppen möglich war, ließ keine maßgeblichen Unterschiede erkennen.

3.4.1.2 *S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC)*

Eine in Karzinomgewebe erhöhte SAM-DC-Aktivität trat insbesondere unter Standardkost und unter polyaminarmer, antibiotikahaltiger Diät auf (*Diagramm 18*). Größtenteils waren diese Aktivitätssteigerungen gegenüber nicht-karzinomatösem Lebergewebe signifikant (in Gruppe PAD 1: $4,06 \pm 0,52$ gegen $2,14 \pm 0,56$ nmol $^{14}\text{CO}_2/30$ min/mg DNA ($p < 0,05$); in Gruppe PAD 2: $4,37 \pm 1,82$ gegen $1,93 \pm 0,20$ nmol $^{14}\text{CO}_2/30$ min/mg DNA ($p < 0,05$); in Gruppe 2: $4,99 \pm 1,90$ gegen $2,37 \pm 0,5$ nmol $^{14}\text{CO}_2/30$ min/mg DNA ($p < 0,05$)). Im Vergleich der Karzinomproben wies Karzinomgewebe unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe die niedrigsten SAM-DC-Konzentrationen auf, ohne dass allerdings signifikante Unterschiede erreicht wurden.

Lebergewebe karzinomfreier Tiere und karzinombenachbartes Lebergewebe zeigten unter polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost plus DFMO 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe vergleichsweise erhöhte SAM-DC-Aktivitäten. Bei den Langzeittieren war dieser Unterschied in karzinombenachbartem Lebergewebe gegenüber entsprechenden Ergebnissen der PRD-Gruppe signifikant ($3,79 \pm 0,68$ gegen $1,73 \pm 0,79$ nmol $^{14}\text{CO}_2/30$ min/mg DNA ($p < 0,05$)).

Der Vergleich von unauffälligem Lebergewebe karzinomfreier Tiere mit dem karzinombefallener Tiere zeigte bezüglich des SAM-DC-Gehaltes keine signifikanten Auffälligkeiten.

3.4.1.3 Spermidin-/Spermin-N1-Acetyltransferase (SAT)

Eine tendenzielle Erhöhung der SAT-Aktivität in karzinomatösem Lebergewebe gegenüber nicht-karzinomatösem Lebergewebe zeichnete sich – soweit es die Auswertungen der erhobenen Daten zulassen – in allen Versuchsgruppen ab (*Diagramm 19*). Am deutlichsten trat dieser Unterschied 10 Wochen nach NNM-Gabe bei Tieren mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Diät auf, wobei jedoch bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,1$ allenfalls eine „tendenziell signifikante“ Differenz nachgewiesen werden konnte ($33,15 \pm 5,23$ gegen $12,19 \pm 3,09$ und gegen $14,21 \pm 3,35$ AcSpd./min/mg DNA ($p < 0,1$)).

In der Auswertung unveränderten Lebergewebes karzinomfreier und karzinomerkrankter Tiere wurden die höchsten SAT-Aktivitäten bei Kurzzeit- und Langzeittieren jeweils unter polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin gemessen, wogegen bei Tieren der PAD-Gruppe und der DFMO-Gruppe vergleichsweise niedrige SAT-Werte auftraten. Signifikante Unterschiede wurden hier nicht sichtbar.

Die Gegenüberstellung der SAT-Aktivitäten im Lebergewebe karzinomfreier und karzinombefallener Tiere ergab in keiner Versuchsgruppe signifikante Unterschiede.

3.4.1.4 Putrescin (PUT)

Die Messung des Polyamins Putrescin (*Diagramm 20*) gestaltete sich wegen der hohen Detektionsschwelle schwierig und aufgrund der wenigen gewonnenen Werte war eine Auswertung der Ergebnisse nur in den Gruppen SK 2, PAD 2, PRD 1 und PRD 2 möglich.

Das untersuchte Karzinomgewebe zeigte in allen auswertbaren Gruppen gegenüber den Messungen normalen Leberparenchyms karzinomfreier und karzinomerkrankter Tiere höhere Putrescinkonzentrationen. Bei den 14 Wochen nach NNM-Verabreichung getöteten Tieren mit Standardkost und den Tieren mit polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin waren die Differenzen zwischen Karzinomgewebe und dem Lebergewebe karzinombefallener Tiere sig-

nifikant und hochsignifikant ($89,58 \pm 35,11$ gegen $17,39 \pm 5,44$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$) in Gruppe SK 2 und $58,41 \pm 23,56$ gegen $22,65 \pm 10,29$ nmol/mg DNA ($p < 0,0025$) in Gruppe PRD 2). Der Vergleich zwischen Lebergewebe karzinomfreier Tiere und unauffälligem Lebergewebe karzinombefallener Tiere zeigte keine signifikanten Ergebnisse.

3.4.1.5 Spermidin (SPD)

Die Spermidinkonzentrationen (*Diagramm 21*) in Karzinomgewebe entsprachen bei fast allen Versuchsgruppen 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe etwa den Werten unauffälligen Lebergewebes oder lagen leicht darüber. Einzige Ausnahme bildeten die Kurzzeittiere unter polyaminreduzierter, antibiotikahaltiger Kost, bei denen der Spermidinwert im Karzinomgewebe gegenüber den Leberwerten karzinomfreier Tiere signifikant reduziert war ($147,88 \pm 47,44$ gegen $286,43 \pm 96,07$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$)). Die Spermidinwerte im Lebergewebe karzinomfreier und karzinomerkrankter Tiere zeigten sich in den Gruppen mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost ohne bzw. plus DFMO gegenüber den Ergebnissen unter Standardkost und unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin reduziert. Signifikant war diese Reduzierung 10 Wochen nach NNM-Gabe im Vergleich der Leberproben karzinomfreier Tiere der Gruppe PAD 1 gegen Gruppe SK 1 und gegen Gruppe PRD 1 ($286,43 \pm 96,07$ gegen $471,30 \pm 58,05$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$) und gegen $513,70 \pm 90,27$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$)) sowie im Vergleich der Leberproben karzinomfreier Tiere der Gruppe DFMO 1 gegen Gruppe PRD 1 ($311,77 \pm 101,14$ gegen $513,70 \pm 90,27$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$)). 14 Wochen nach NNM-Verabreichung war die Reduzierung der Spermidinkonzentration in den Gruppen PAD und DFMO ebenfalls erkennbar, eine signifikante Differenz konnte allerdings nur im Vergleich unauffälligen Lebergewebes karzinombefallener Tiere der PAD 2-Gruppe gegenüber den SK 2-Tieren nachgewiesen werden ($417,23 \pm 68,66$ gegen $657,80 \pm 170,36$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$)).

Der Vergleich zwischen Lebergewebe karzinomfreier und karzinomerkrankter Tiere zeigte in keiner Gruppe signifikante Unterschiede.

3.4.1.6 Spermin (SPM)

Die Sperminaktivität (*Diagramm 22*) zeigte in den untersuchten Lebergewebeproben keine maßgeblichen Unterschiede. In allen Gruppen entsprach die Konzentration des Polyamins im Karzinomgewebe etwa den Ergebnissen normalen Lebergewebes karzinomfreier und karzinombefallener Tiere. Eine Ausnahme bildete der Sperminwert im Karzinomgewebe der Kurzzeittiere mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Nahrung, der sowohl gegenüber den Leberproben karzinomfreier Tiere ($102,72 \pm 29,91$ gegen $340,65 \pm 96,83$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$)) als auch gegenüber dem Karzinomwert der PRD 1-Gruppe ($102,72 \pm 29,91$ gegen $554,67 \pm 281,05$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$)) signifikant erniedrigt war.

3.4.1.7 DNA und Proteine

Die Messung der DNA (*Diagramm 23*) zeigte – ebenso wie die Auswertung des Proteingehalts (*Diagramm 24*) – sowohl im Vergleich der einzelnen Ernährungsgruppen als auch in der Gegenüberstellung der verschiedenen Gewebeproben keine signifikanten Auffälligkeiten.

3.4.2 Niere

Das entnommene Nierengewebe wurde entsprechend den Untersuchungen der Lebergewebeproben bezüglich der Polyaminkonzentrationen und der Aktivitäten der am Polyaminstoffwechsel beteiligten Enzyme ausgewertet. Eine Unterscheidung zwischen dem Nierengewebe karzinomfreier Tiere und dem karzinomerkrankter Tiere gelang in den meisten Fällen. Als trophische Parameter wurden – ebenfalls entsprechend der Auswertung des Lebergewebes – DNA- und Proteingehalt bestimmt.

3.4.2.1 Ornithindecaboxylase (ODC)

Die Messungen der ODC-Aktivität im Nierengewebe (*Diagramm 25*) zeigten außerordentlich große Schwankungen. Die Werte reichten von $24,47$ pmol $^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg}$ DNA in Gruppe DFMO 2 bis $635,15$ pmol $^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg}$ DNA in Gruppe SK 1. Die niedrigsten Werte wurden sowohl 10 als auch 14 Wochen nach NNM-Gabe in den Gruppen mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Diät plus DFMO bzw. mit polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin erreicht. 10

ERGEBNISSE

Wochen nach NNM-Applikation war diese Reduzierung im Nierengewebe karzinomfreier Tiere mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost plus DFMO gegenüber den Ergebnissen der Standardkosttiere und der Tiere mit alleiniger polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost signifikant ($33,35 \pm 14,22$ gegen $421,20 \pm 146,17$ und gegen $503,96 \pm 223,47$ $\text{pmol}^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg DNA}$ ($p < 0,05$)). Die ODC-Reduzierung unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin war bei karzinomfreien Tieren 10 Wochen nach NNM-Gabe gegenüber entsprechenden Gewebeproben der Tiere mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost signifikant ($121,96 \pm 106,27$ gegen $503,96 \pm 223,47$ $\text{pmol}^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg DNA}$ ($p < 0,05$)).

Bei den Langzeittieren zeigte das Nierengewebe karzinomerkrankter PRD-Tiere signifikant erniedrigte ODC-Werte gegenüber karzinomerkrankten PAD-Tieren ($123,96 \pm 53,69$ gegen $311,55 \pm 76,57$ $\text{pmol}^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg DNA}$ ($p < 0,05$)).

Der Vergleich von Nierengewebe karzinomfreier Tiere mit dem karzinomerkrankter Tiere ergab keine signifikanten Unterschiede.

3.4.2.2 *S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC)*

10 und 14 Wochen nach NNM- Gabe war eine tendenzielle Erhöhung der SAM-DC-Aktivität unter polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost plus DFMO zu erkennen, wobei allerdings keine signifikanten Unterschiede erreicht wurden (*Diagramm 26*).

In der Kurzzeit-Standardkostgruppe, in der Langzeit-PRD-Gruppe sowie insbesondere bei Kurzzeit- und Langzeit-DFMO-Tieren zeigten karzinomerkrankte Tiere gegenüber karzinomfreien Tieren angedeutet erhöhte SAM-DC-Werte, wobei jedoch auch hier keine signifikanten Unterschiede vorlagen.

3.4.2.3 *Spermidin-/Spermin-N1-Acetyltransferase (SAT)*

Die Enzymaktivität der SAT (*Diagramm 27*) zeigte sich 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe bei Tieren mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost bzw. mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost und zusätzlich verabreichtem DFMO etwas erniedrigt, ohne dass signifikante Unterschiede auftraten. 14 Wochen nach NNM fielen im Nierengewebe der Standardkost-

gruppe vergleichsweise hohe SAT-Konzentrationen auf. Signifikante Differenzen wurden auch hier nicht erreicht. Unterschiede zwischen dem Nierengewebe karzinomfreier Tiere und dem Nierengewebe karzinomerkrankter Tiere ergaben sich nicht.

3.4.2.4 Putrescin (PUT)

Unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin wurden 10 und 14 Wochen nach NNM deutlich erhöhte Putrescinwerte gemessen (*Diagramm 28*). Im Nierengewebe karzinombefallener Tiere war diese Erhöhung 14 Wochen nach NNM-Gabe gegenüber entsprechenden Gewebeproben von SK-Tieren und PAD-Tieren signifikant bzw. hochsignifikant ($89,16 \pm 32,39$ gegen $19,04 \pm 3,46$ pmol AcSpd./min/mg DNA ($p < 0,0025$) und gegen $19,54 \pm 6,70$ pmol AcSpd./min/mg DNA ($p < 0,05$)).

Unter polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost plus DFMO ergaben die Putrescinmessungen bei karzinomerkrankten Tieren keine Ergebnisse. Zwischen Standardkosttieren und PAD-Tieren traten keine nennenswerten Differenzen auf. Ebenso nicht im Vergleich von karzinomfreien und karzinomerkrankten Tieren.

3.4.2.5 Spermidin (SPD)

Die höchsten Spermidinwerte (*Diagramm 29*) traten 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe in den Gruppen mit polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin auf. Bei den Kurzzeittieren war diese Spermidinerhöhung im Nierengewebe karzinomfreier PRD-Tiere gegenüber entsprechenden Gewebeproben von Standardkosttieren, PAD-Tieren und DFMO-Tieren signifikant ($573,11 \pm 117,11$ gegen $201,86 \pm 21,17$, gegen $216,55 \pm 64,57$ und gegen $140,88 \pm 87,65$ nmol/mg DNA (jeweils $p < 0,05$)). Die Spermidinerhöhung in Nierengewebe karzinombefallener Kurzzeit-PRD-Tiere erwies sich nur gegenüber entsprechenden Gewebeproben der Standardkosttiere als signifikant ($681,25 \pm 131,51$ gegen $248,78 \pm 60,39$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$)). Unter den Langzeittieren erreichte die unter polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin erhöhte Spermidinaktivität im Nierengewebe karzinombefallener PRD-Tiere gegenüber entsprechenden Gewebeproben von SK-Tieren und PAD-Tieren hochsignifikante Ausmaße ($637,56 \pm 100,03$ gegen $236,39 \pm 44,27$ und gegen $223,11 \pm 40,78$ nmol/mg DNA (jeweils $p < 0,0025$)).

Spermidinmessungen im Nierengewebe von DFMO-Tieren schienen – abgesehen von der teilweise signifikanten Differenz zu den Ergebnissen der PRD-Tiere – auch gegenüber den Ergebnissen unter Standardkost und polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost angedeutet erniedrigt, ohne dass hierbei allerdings statistisch relevante Unterschiede auftraten. Die Differenzierung zwischen Gewebe karzinomfreier und karzinombefallener Tiere zeigte keine signifikanten Unterschiede.

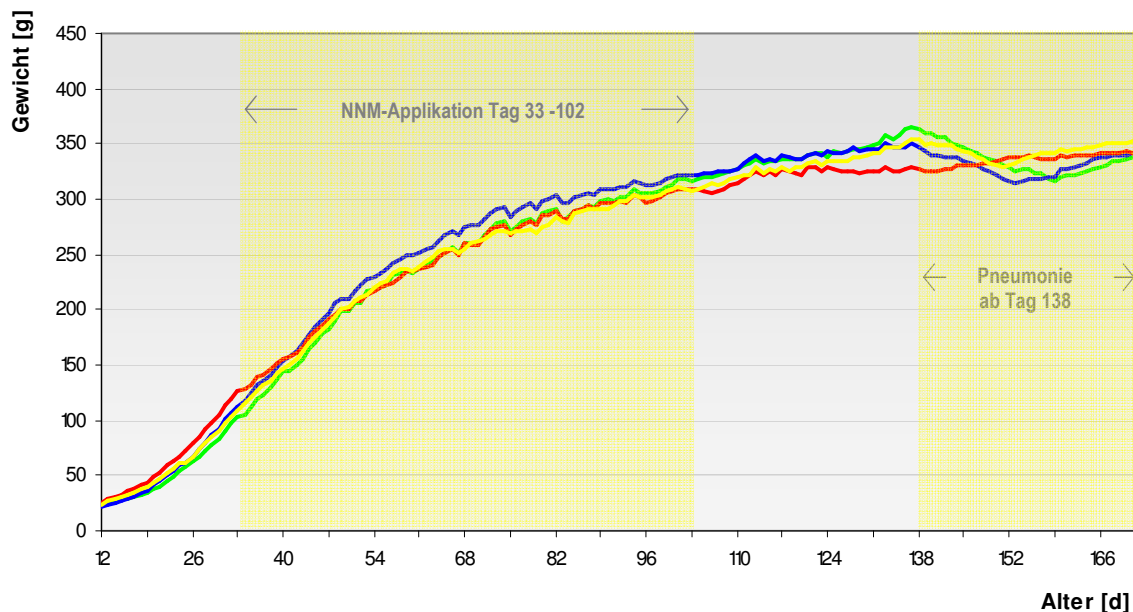
3.4.2.6 Spermin (SPM)

Die höchsten Sperminaktivitäten wurden in den Gruppen mit polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin gemessen (*Diagramm 30*). Signifikant war dieser Unterschied 10 Wochen nach NNM-Gabe im Vergleich karzinomfreier PRD-Tiere mit entsprechenden Gewebeproben der Tiere mit Standardkost und der Tiere mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Diät ($400,32 \pm 69,96$ gegen $227,27 \pm 17,22$ und gegen $272,18 \pm 60,64$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$)). 14 Wochen nach NNM-Gabe war die Sperminerhöhung in Nierengewebe karzinombefallener PRD-Tiere im Vergleich zu entsprechenden Gewebeproben von SK-Tieren und PAD-Tieren ebenfalls signifikant ($398,06 \pm 68,23$ gegen $292,64 \pm 92,05$ und gegen $277,82 \pm 65,24$ nmol/mg DNA ($p < 0,05$)). Mit Ausnahme der Gruppe DFMO 1 lagen die Sperminwerte im Nierengewebe karzinomerkrankter Tiere jeweils leicht über den entsprechenden Ergebnissen karzinomfreier Tiere. In Gruppe PAD 2 konnte ein diesbezüglicher Vergleich nicht erfolgen, da kein Messergebnis von karzinomfreien Tiere vorlag.

3.4.2.7 DNA und Proteine

Die Bestimmung des DNA-Gehalts (*Diagramm 31*) ergab relativ einheitliche Messwerte. Wie bereits in der Betrachtung der Lebergewebeproben (*Kap. 3.4.1.7*) lieferte weder der Vergleich der unterschiedlichen Ernährungsgruppen noch die Differenzierung in Nierengewebe karzinomfreier und karzinomerkrankter Tiere Auffälligkeiten. Der Proteingehalt (*Diagramm 32*) des untersuchten Gewebes lag zwischen $98,56$ mg/g Gewebe (karzinombefallene Tiere der Gruppe PAD 1) und $141,96$ mg/g Gewebe (karzinombefallene Tiere der Gruppe PRD 1) und auch hier zeigten die Ergebnisse keine signifikanten Besonderheiten.

Mittleres Gewicht Kurzzeitgruppen



Mittleres Gewicht Langzeitgruppen

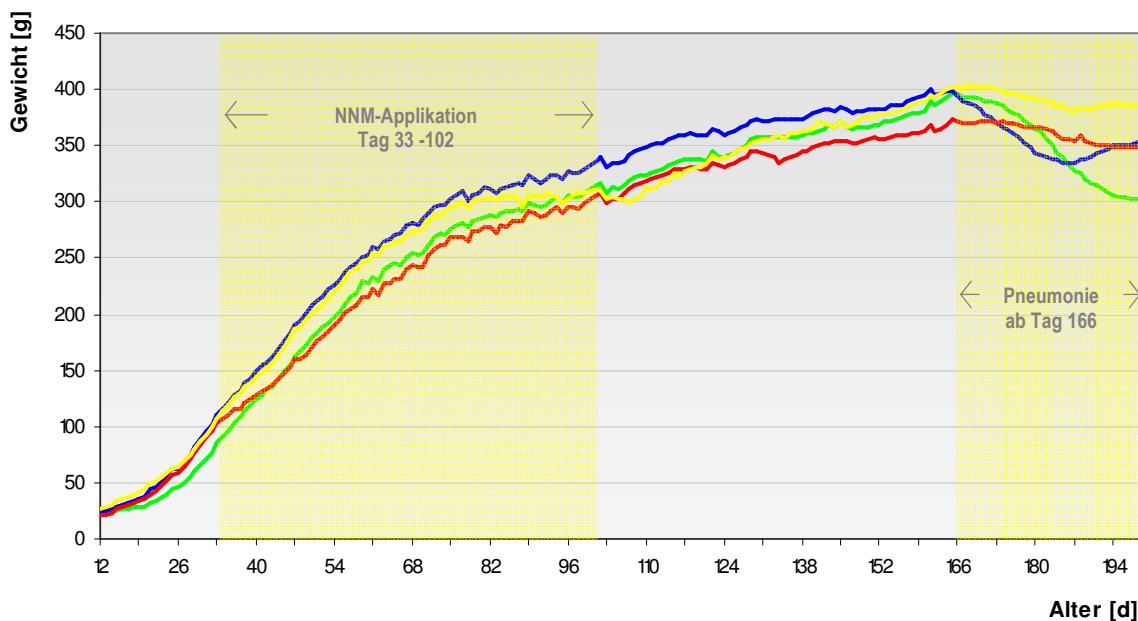


Diagramm 1 und 2: Mittleres Körpergewicht in den Kurzzeitgruppen (Tötung 10 Wochen nach NNM-Gabe) und in den Langzeitgruppen (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe) in Gramm

- Grün:** Kurzzeit-/Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- Blau:** Kurzzeit-/Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter)
- Rot:** Kurzzeit-/Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- Gelb:** Kurzzeit-/Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

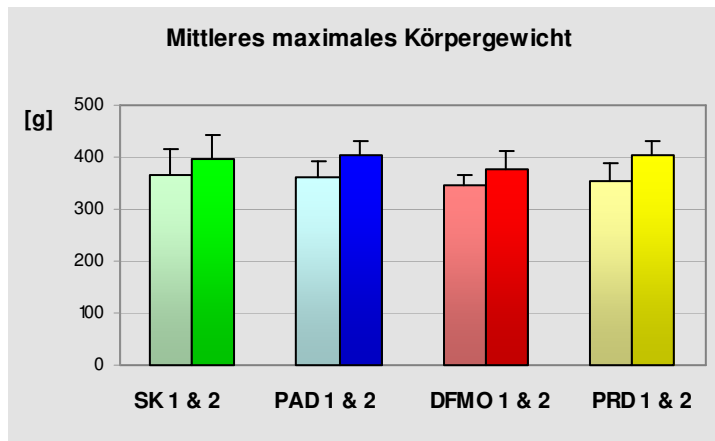


Diagramm 3 a: Mittleres maximales Körpergewicht der Kurzzeittiere (Tötung 10 Wochen nach NNM-Gabe/helle Farbgebung) und der Langzeittiere (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe/dunkle Farbgebung) in Gramm.

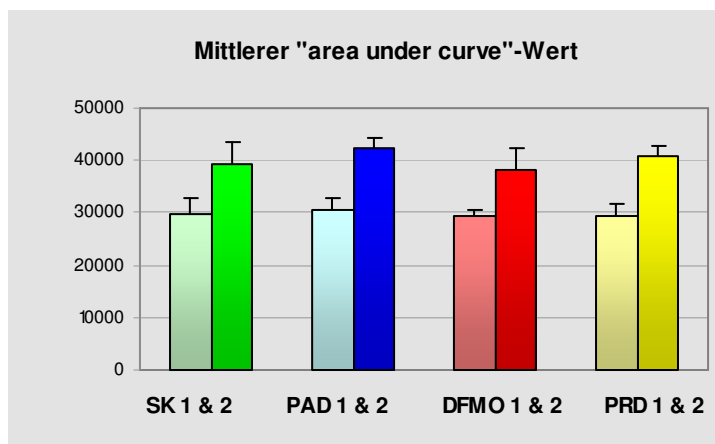


Diagramm 3 b: Mittlerer „area under curve/AUC“-Wert bei der Betrachtung der Gewichtsentwicklung von Kurzzeittieren (Tötung 10 Wochen nach NNM-Gabe/helle Farbgebung) und Langzeittieren (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe/dunkle Farbgebung).

Der in den Diagrammen betrachtete Zeitraum umfasst Tag 12 (Alter bei Lieferung der Tiere) bis jeweils 1 Tag vor Beginn der Pneumonieausbreitung (Tag 137 bei den Kurzzeittieren und Tag 165 bei den Langzeittieren).

- SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

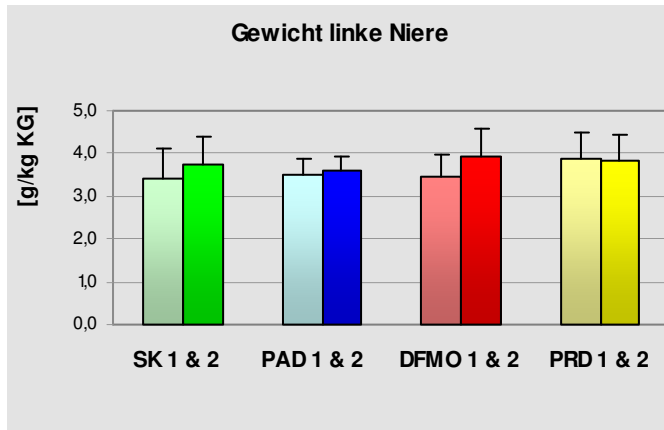


Diagramm 4: Mittleres Gewicht der linken Niere in Gramm/Kilogramm Körpergewicht bei Kurzzeittieren (Tötung 10 Wochen nach NNM-Gabe/helle Farbgebung) und Langzeittieren (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe/dunkle Farbgebung)

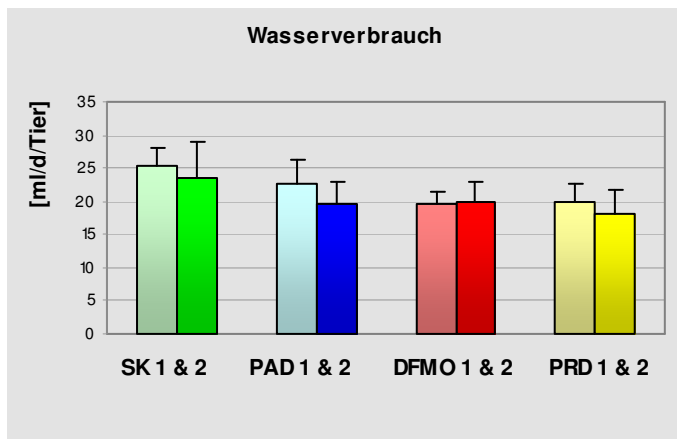


Diagramm 5: Mittlerer Wasserverbrauch in Milliliter/Tag/Tier bei Kurzzeittieren (Tötung 10 Wochen nach NNM-Gabe/helle Farbgebung) und Langzeittieren (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe/dunkle Farbgebung)

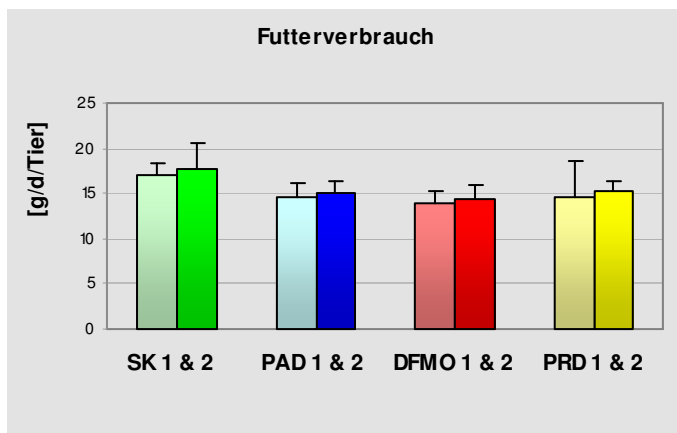


Diagramm 6: Mittlerer Futtermittelverbrauch in Gramm/Tag/Tier bei Kurzzeittieren (Tötung 10 Wochen nach NNM-Gabe/helle Farbgebung) und Langzeittieren (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe/dunkle Farbgebung)

SK 1 und 2:

Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + Standardkost

PAD 1 und 2:

Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter)

DFMO 1 und 2:

Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)

PRD 1 und 2:

Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

ERGEBNISSE

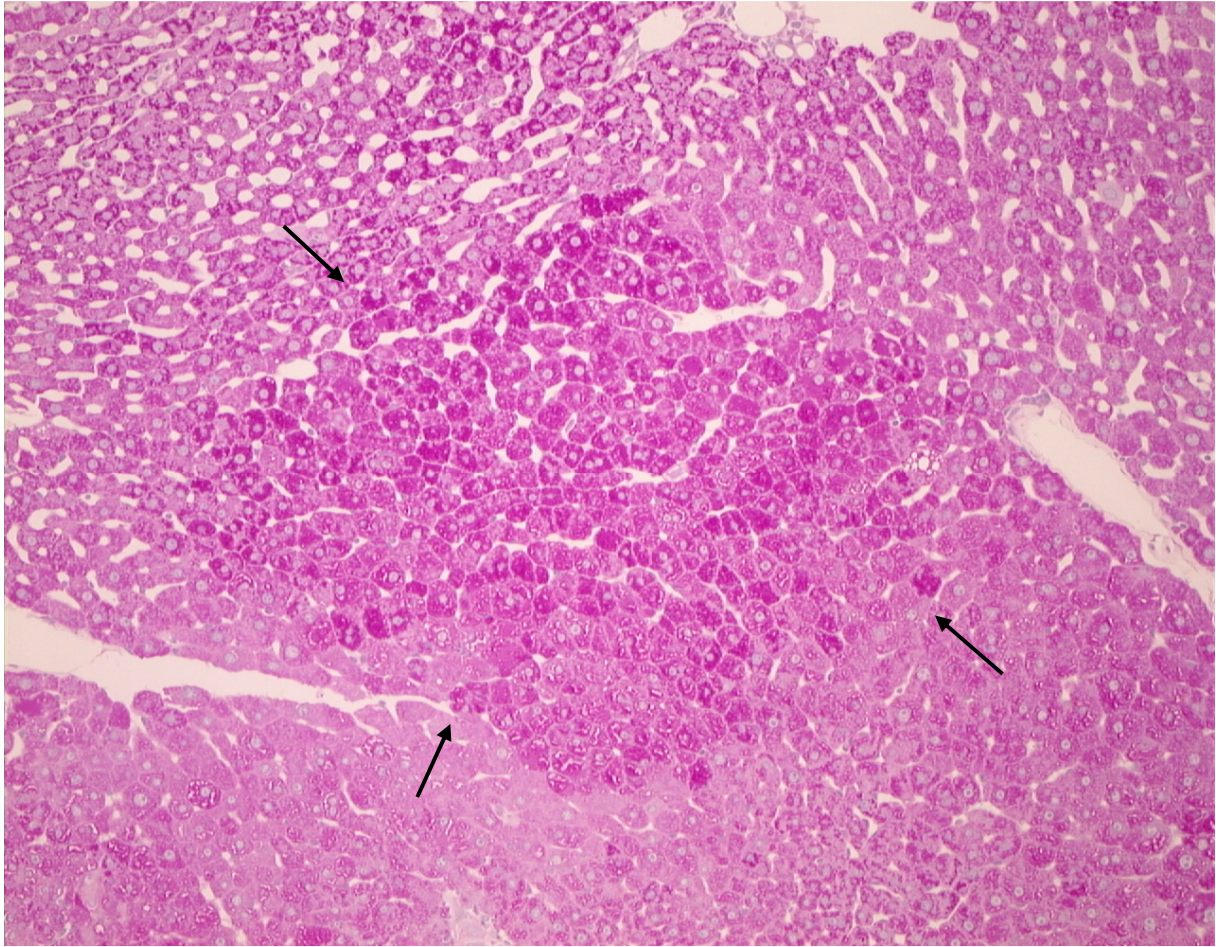


Abbildung 7: Histologischer Befund eines klarzelligen präneoplastischen Leberzellherdes; Perjodsäure-Schiff-Reaktion; Abbildungsmaßstab: 1:197

Leberschnitt eines Kurzzeittieres (Tötung 10 Wochen nach NNM-Gabe) mit polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d). Das gespeicherte Glykogen ist PAS-positiv. Die azinäre Grundgliederung ist erhalten. Es liegt noch kein verdrängendes Wachstum vor.



Abbildung 8: Makroskopischer Befund präneoplastischer Leberzellherde

Leber des gleichen Tieres nach Abtrennung des zur Enzymdiagnostik entnommenen Mittellappens und erfolgter Perfusionsfixation. Man erkennt als erste präneoplastische Veränderungen kleine flache, weißliche Rundherde mit multizentrischem Auftreten (*Pfeile*). Größtenteils ist allerdings bereits der Übergang in solide, erhabene Tumoren erfolgt.

ERGEBNISSE

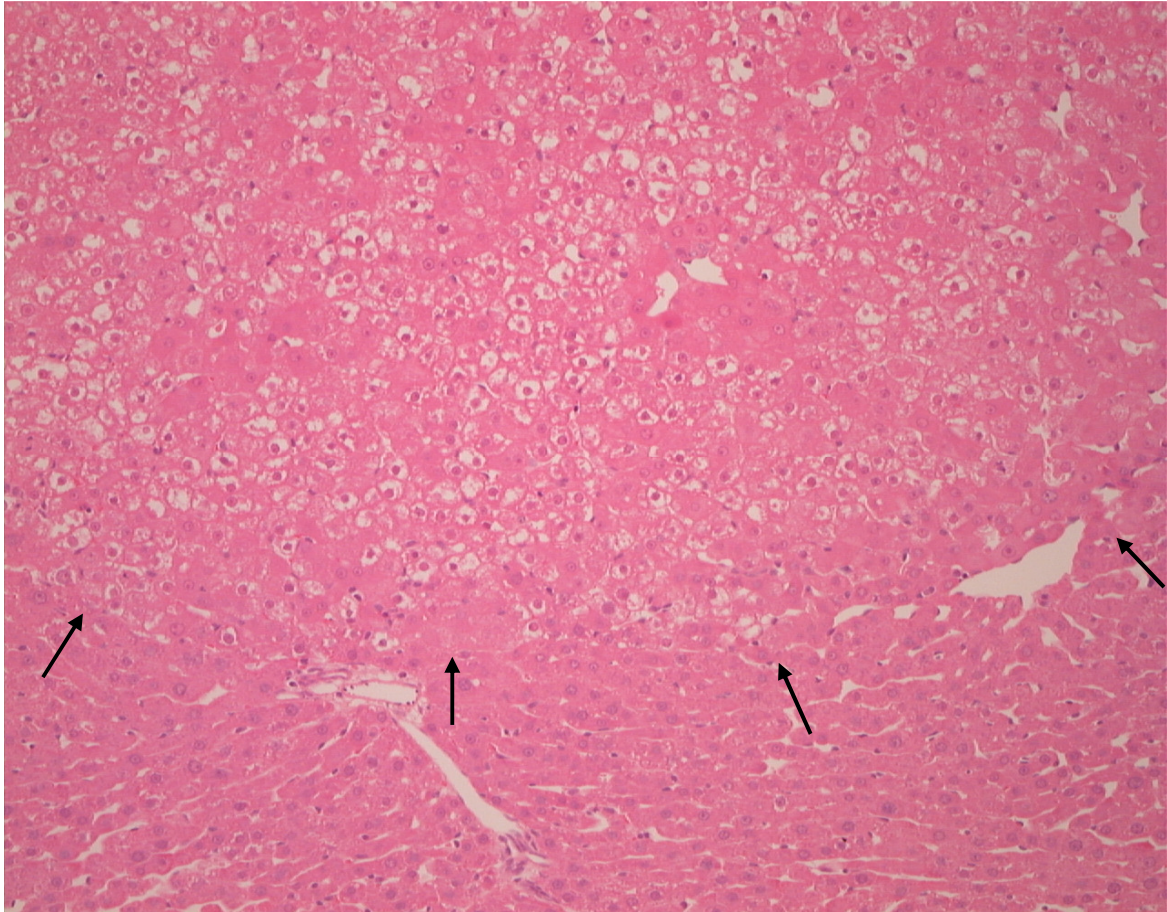


Abbildung 9: Histologischer Befund eines klarzelligen hepatozellulären Adenoms in den oberen 2/3 der Abbildung (Pfeile); Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Abbildungsmaßstab: 1:189

Schnitt aus einem kleinen Leberlappen eines Langzeittieres (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe) mit Standardkost. Die Läsion komprimiert das angrenzende Lebergewebe und zeigt keine azinäre Grundgliederung mehr.



Abbildung 10: Makroskopischer Befund eines klarzelligen hepatozellulären Adenoms

Perfusionsfixierte Leber des gleichen Tieres. Die Pfeile markieren das diagnostizierte Adenom.

ERGEBNISSE

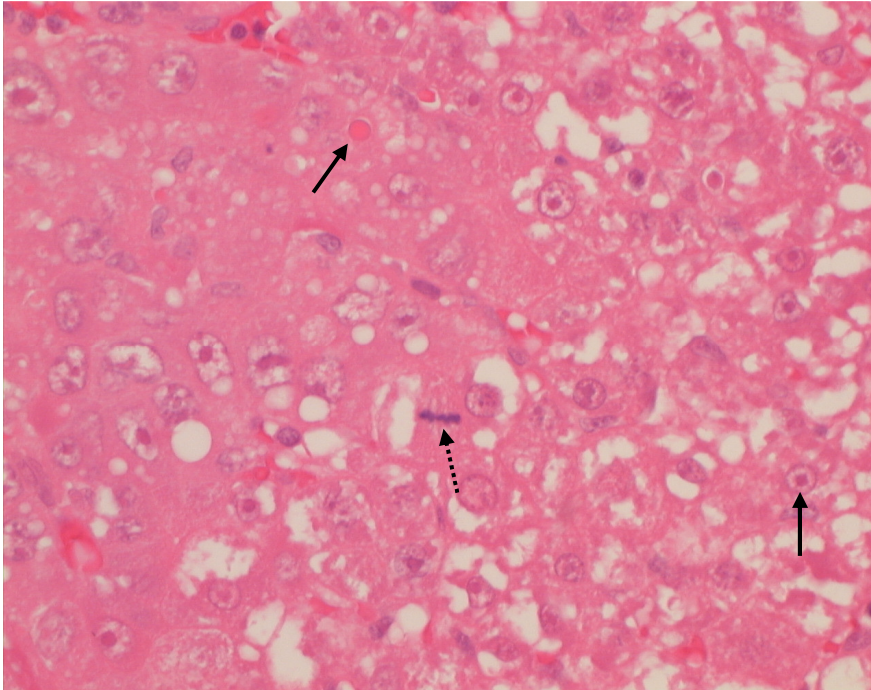


Abbildung 11: Histologischer Befund eines klarzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G1; Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Abbildungsmaßstab: 1:571

Schnitt aus dem rechten Leberlappen eines Kurzzeittieres (Tötung 10 Wochen nach NNM-Gabe) mit polyaminarmer Diät und Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter). Das Zytoplasma enthält viel Glykogen (Vakoulen). Als Kennzeichen maligner Prozesse sind leichte Zellkernatypien (Pfeile) sowie eine Mitose (unterbrochener Pfeil) erkennbar.

Abbildung 12: Makroskopischer Befund hepatozellulärer Karzinome des Malignitätsgrades G1

Perfusionsfixierte Leber des oben und auf der nächsten Seite aufgeführten Tieres. Die Pfeile markieren hepatozelluläre Karzinome des Malignitätsgrades G1.

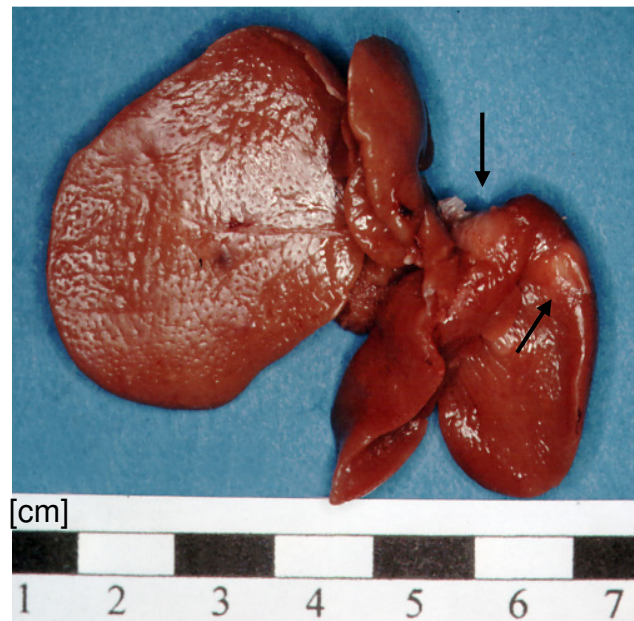
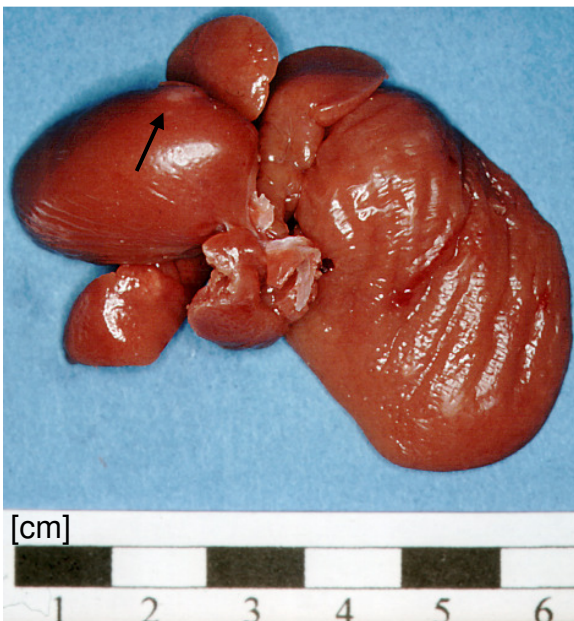


Abbildung 13: Histologischer Befund eines basophilzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G1; Perjodsäure-Schiff-Reaktion; Abbildungsmaßstab: 1:325

Schnitt aus dem rechten Leberlappen eines Kurzzeittieres (Tötung 10 Wochen nach NNM-Gabe) mit polyaminarmer Diät und Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter). Erkennbar ist ein starker Schwund des Glykogens und damit der PAS-Positivität. Das Tumorstromatum zeigt grobtrabekuläre Strukturen.

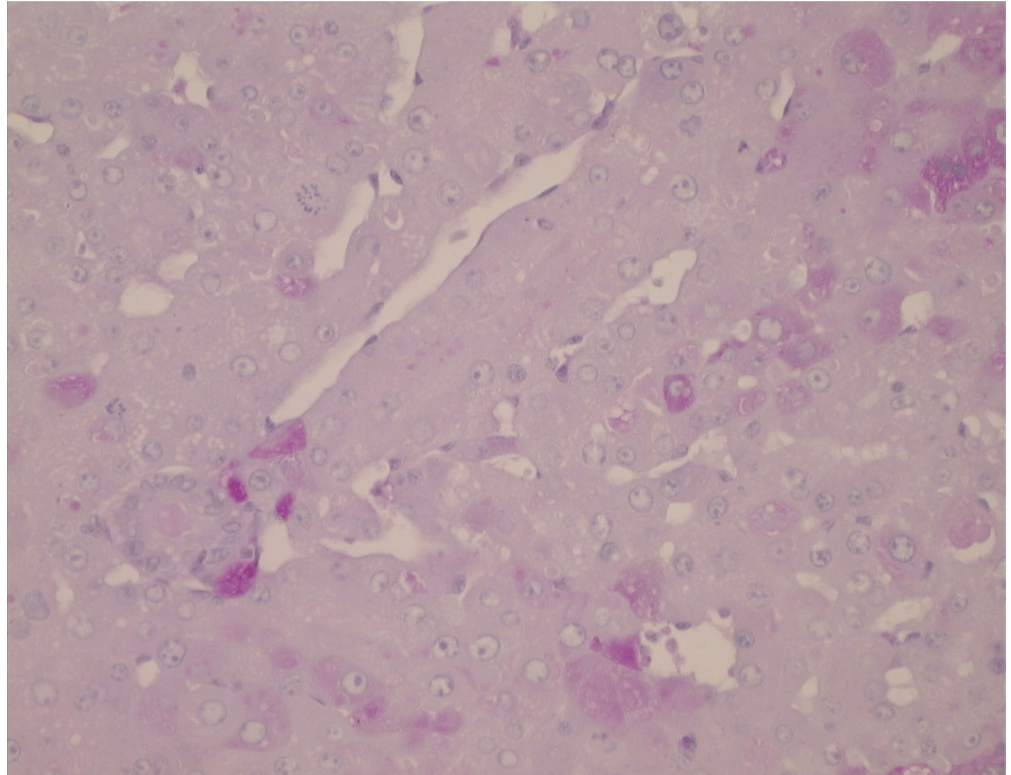
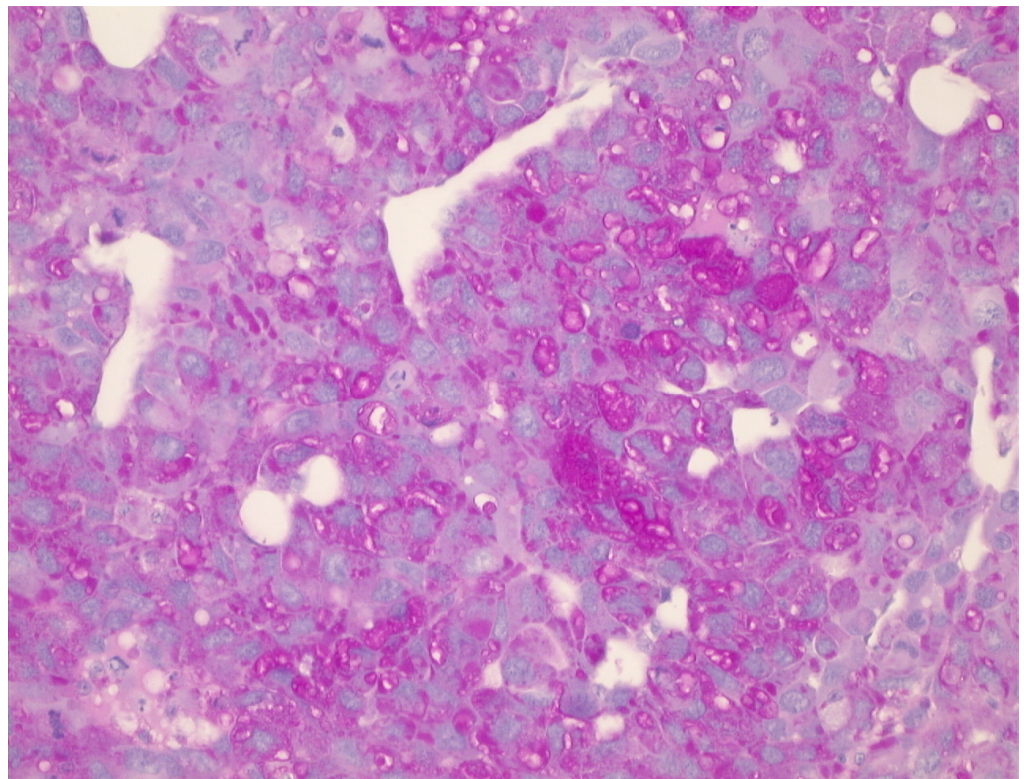


Abbildung 14: Klarzelliger Anteil in einem gemischtzelligen hepatozellulären Karzinom des Malignitätsgrades G2; Perjodsäure-Schiff-Reaktion; Abbildungsmaßstab: 1:328

Schnitt aus dem linken Leberlappen des gleichen Tieres. Die Läsion zeigt ebenfalls ein grobtrabekuläres Tumorstromatum. Es liegt eine kräftige PAS-Positivität als Ausdruck der Glykogenspeicherung vor. Insgesamt ist eine mäßiggradige Verschiebung der Kern-Plasma-Relation sichtbar.



ERGEBNISSE

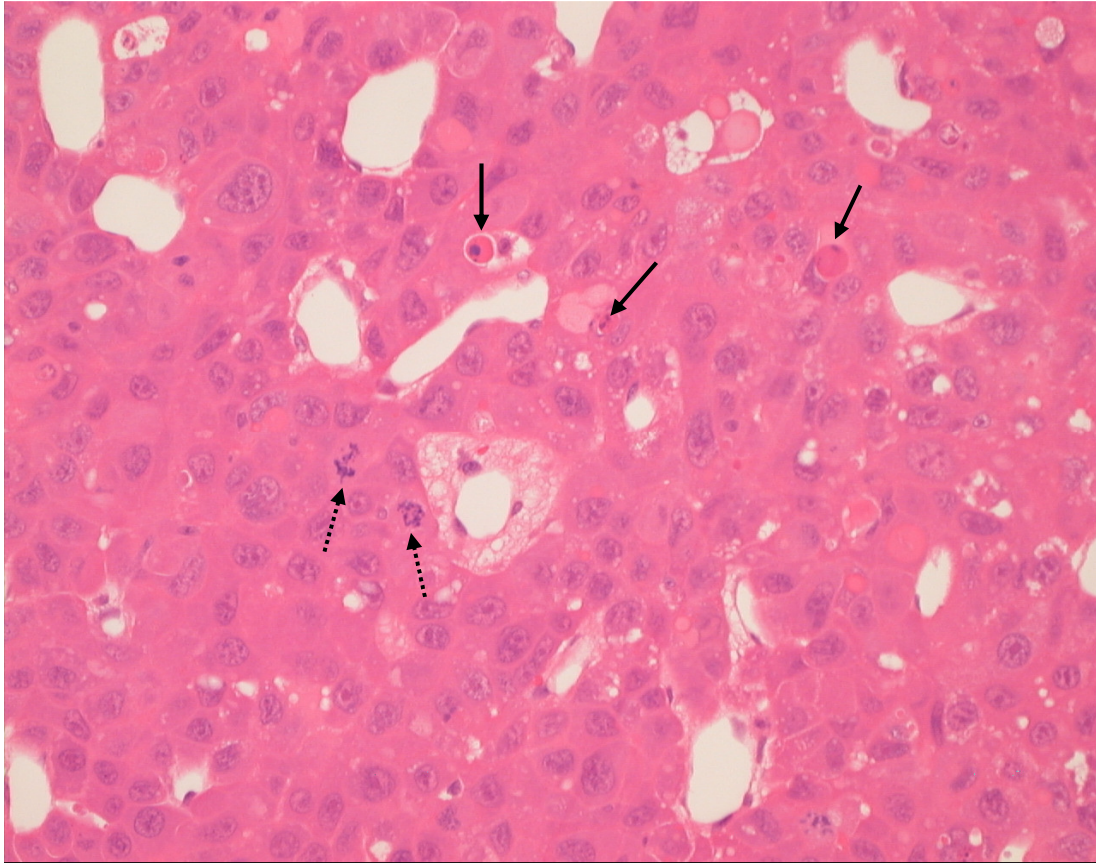


Abbildung 15: Histologischer Befund eines basophilzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G2; Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Abbildungsmaßstab: 1:357

Schnitt aus dem linken Leberlappen eines Langzeittieres (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe) mit polyaminreicher Diät plus Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d). Das Zytoplasma ist basophil und man sieht mehrere Mitosen (*unterbrochene Pfeile*) und Apoptosen (*Pfeile*).



Abbildung 16: Makroskopischer Befund eines basophilzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G2

Perfusionsfixierte Leber des gleichen Tieres mit deutlich karzinomatös veränderten Arealen im linken Leberlappen.

ERGEBNISSE

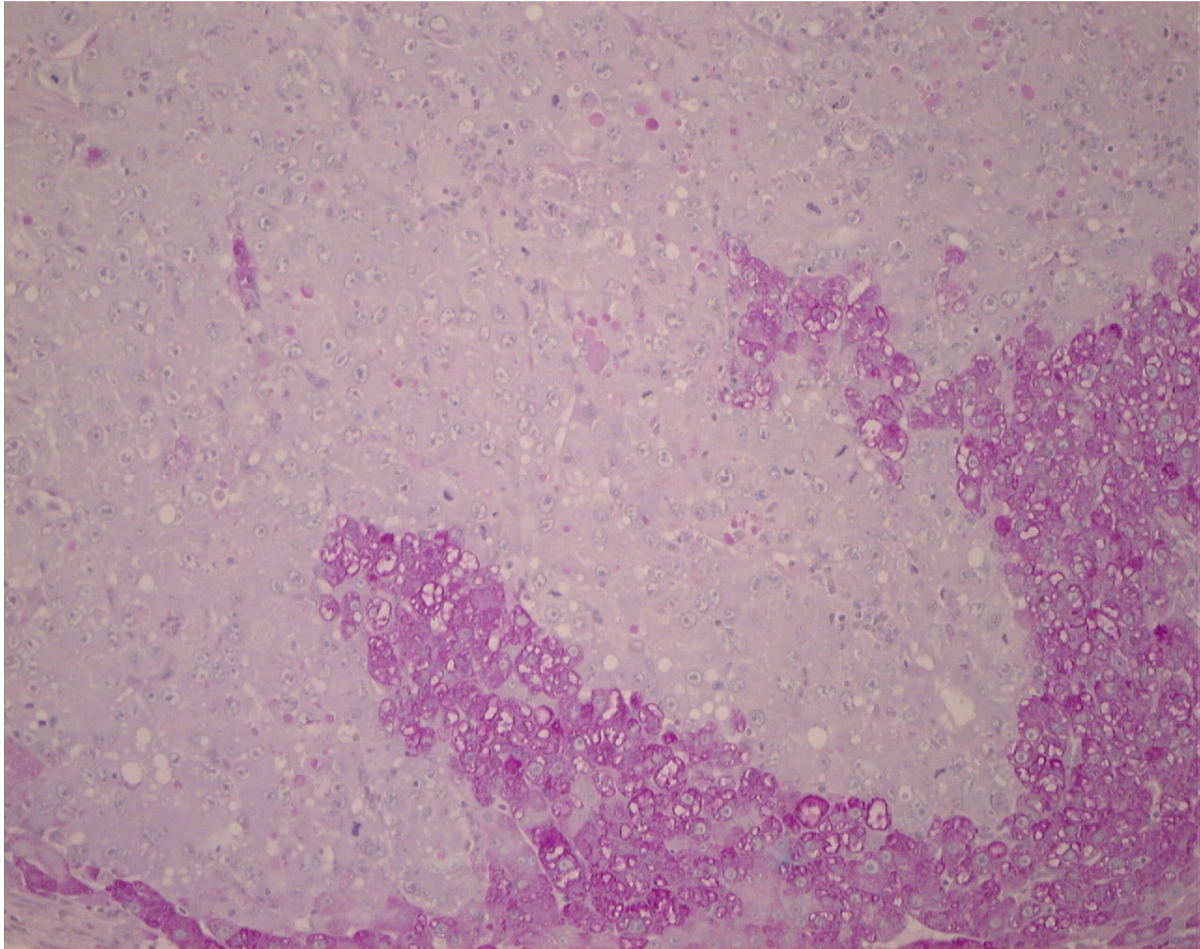


Abbildung 17: Histologischer Befund eines basophilzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G3 in den oberen und mittleren Abbildungsabschnitten; Perjodsäure-Schiff-Reaktion; Abbildungsmaßstab: 1:194

Schnitt aus dem linken Leberlappen eines Langzeittieres (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe) mit polyaminarmer Diät und Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter). Im Kontrast zum umliegenden Lebergewebe zeigt das Karzinomgewebe einen völligen Glykogenverlust.



Abbildung 18: Makroskopischer Befund eines basophilzelligen hepatozellulären Karzinoms des Malignitätsgrades G3

Perfusionsfixierte Leber des gleichen Tieres mit deutlich karzinomatös veränderten Arealen im linken Leberlappen.

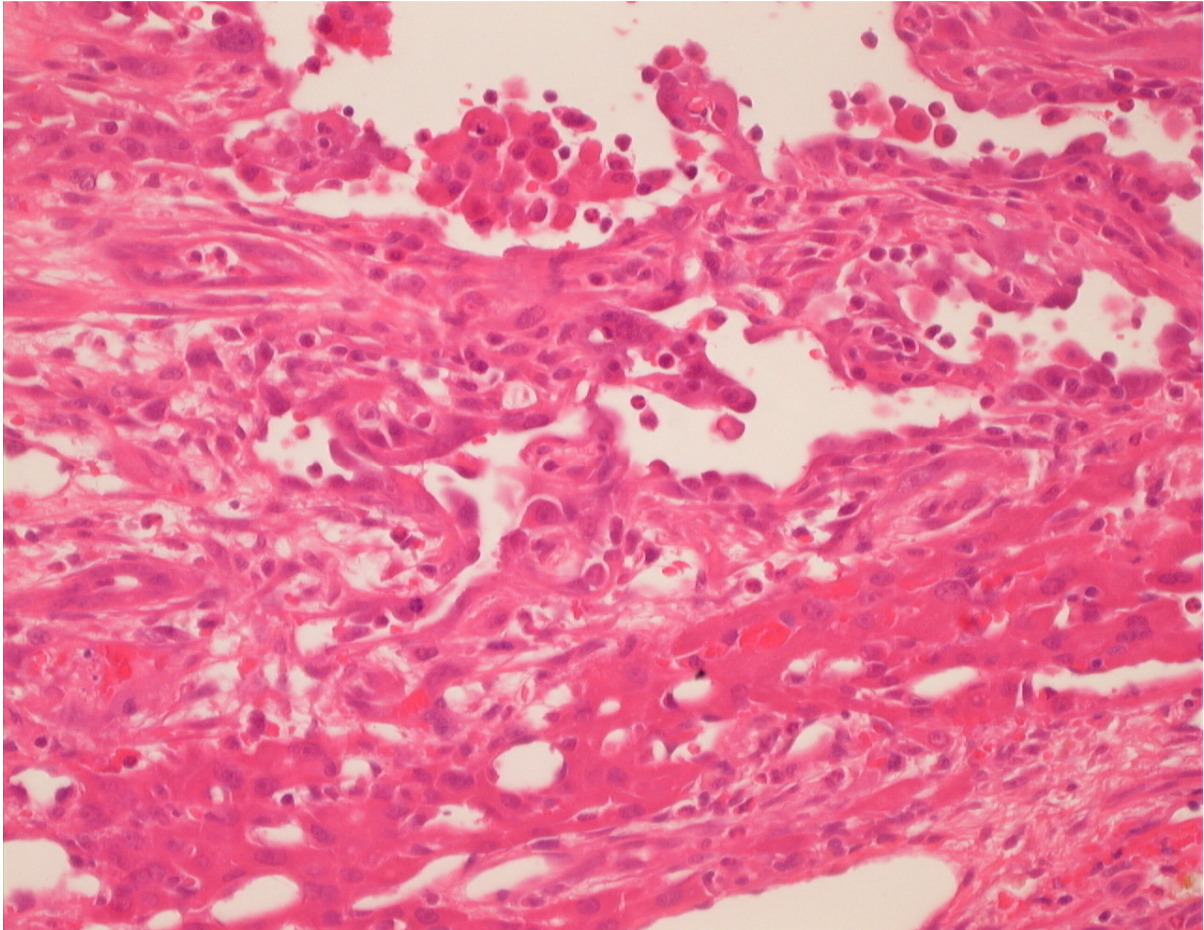


Abbildung 19: Histologischer Befund eines Angiosarkoms, Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Abbildungsmaßstab: 1:389

Schnitt aus dem linken Leberlappen eines Langzeittieres (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe) mit polyaminarmer Diät und Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter). Das Blut ist durch die Perfusionsfixation weitgehend herausgespült. Die Tumorzellen bilden atypische Blutgefäße. Unten und rechts ist angrenzendes Lebergewebe erkennbar.

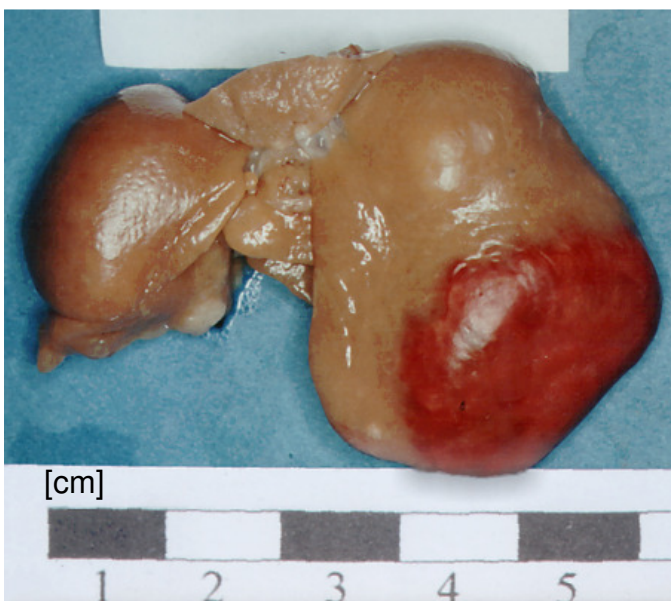
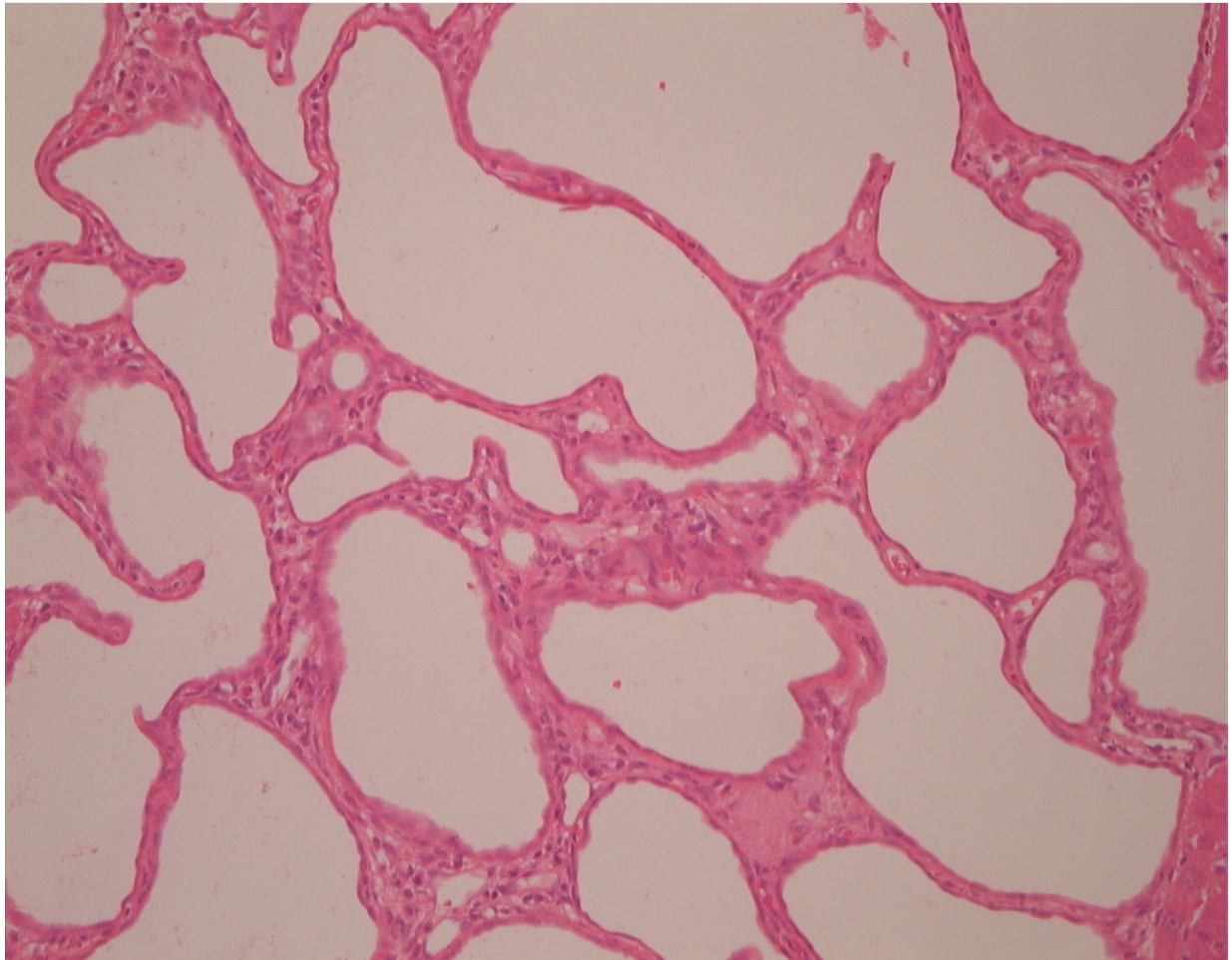


Abbildung 20: Makroskopischer Befund eines Angiosarkoms

Perfusionsfixierte Leber eines Langzeittieres (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe) mit polyaminreicher Kost und Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d).

ERGEBNISSE



*Abbildung 21: Histologischer Befund eines Gallengangadenoms, Hämatoxylin-Eosin-Färbung;
Abbildungsmaßstab: 1:199*

Schnitt aus dem linken Leberlappen eines Langzeittieres (Tötung 14 Wochen nach NNM-Gabe) mit polyaminarmer Diät und Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter). Es sind kleinzystische, von Epithelien ausgekleidete Hohlräume zu sehen.

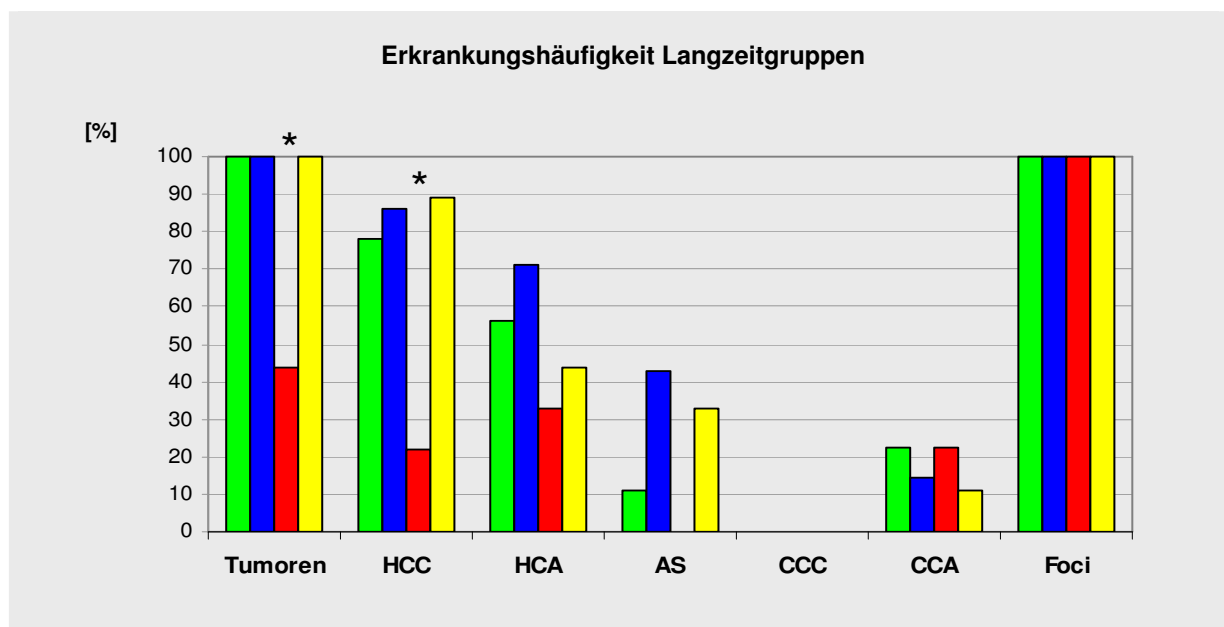
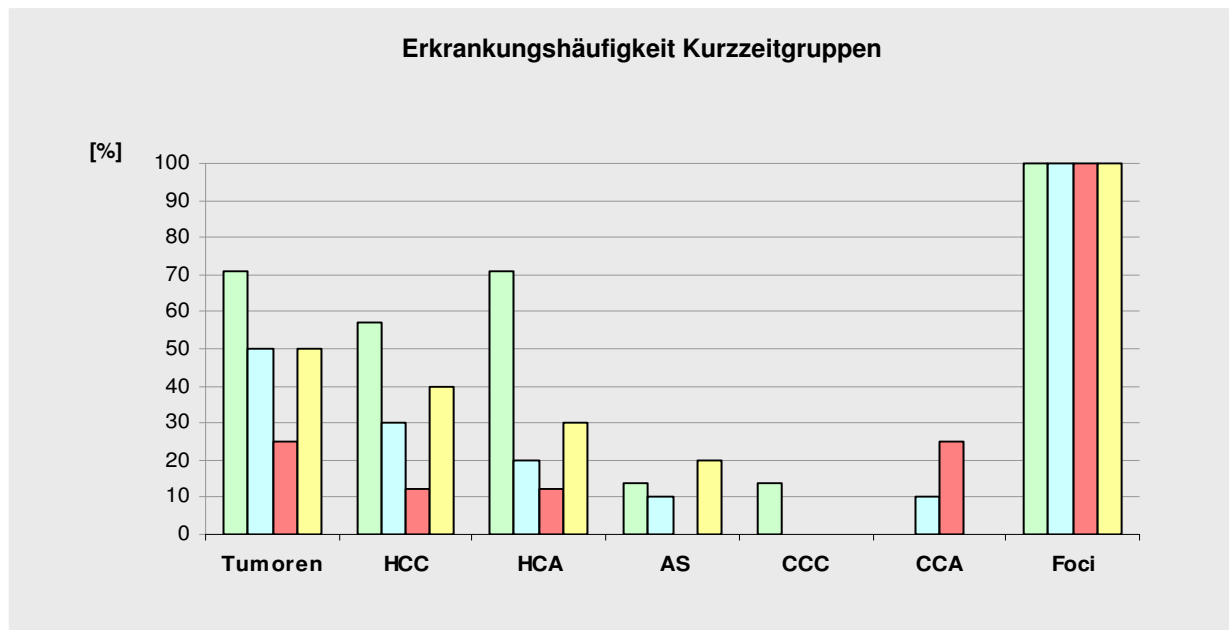


Diagramm 7 und 8: Prozentualer Anteil erkrankter Tiere in den Kurzzeitgruppen (10 Wochen nach NNM-Gabe) und in den Langzeitgruppen (14 Wochen nach NNM-Gabe). Die verschiedenen Tumorentitäten sind zusammengefasst (Tumoren) und im Einzelnen ausgewertet: hepatozelluläre Karzinome (HCC), hepatozelluläre Adenome (HCA), Angiosarkome (AS), cholangiozelluläre Karzinome (CCC), cholangiozelluläre Adenome (CCA). Ebenfalls dargestellt sind präneoplastische Leberzellherde (Foci).

** zeigt bei den Langzeitgruppen signifikante Differenzen bzgl. der allgemeinen Tumorfrequenz zwischen der Gruppe DFMO und den Gruppen SK, PAD und PRD (* jeweils $p < 0,05$) sowie bzgl. der Häufigkeit hepatozellulärer Karzinome zwischen der Gruppe DFMO und den Gruppen PAD und PRD (* jeweils $p < 0,05$)*

Hell-/Dunkelgrün: Kurzzeit-/Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + Standardkost

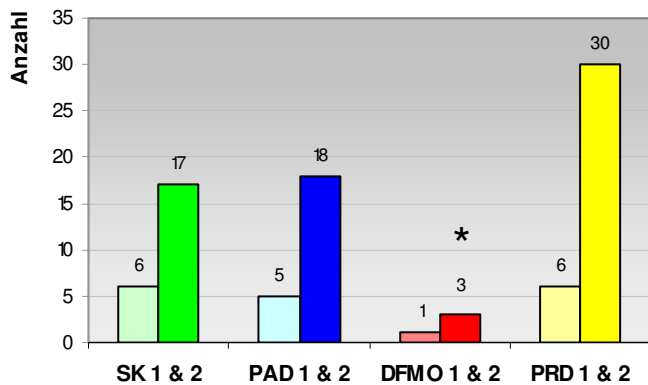
Hell-/Dunkelblau: Kurzzeit-/Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter)

Hell-/Dunkelrot: Kurzzeit-/Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)

Hell-/Dunkelgelb: Kurzzeit-/Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

ERGEBNISSE

Gesamtzahl HCC



Gesamtzahl HCA

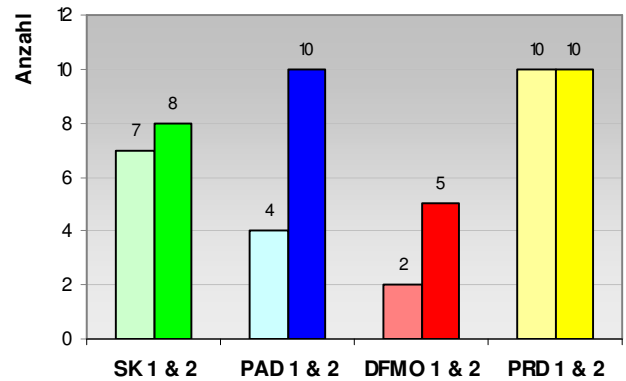
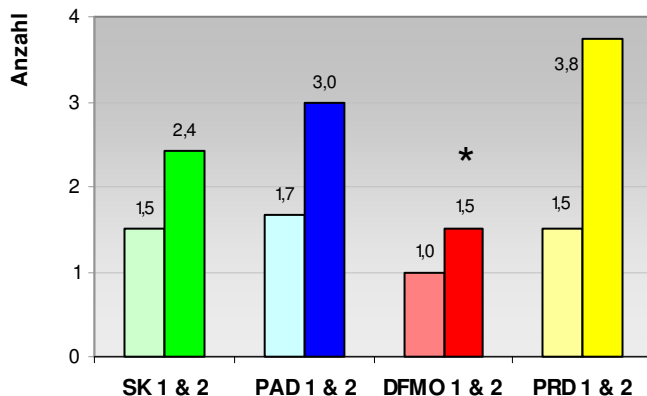


Diagramm 9 und 10: Gesamtzahl hepatozellulärer Karzinome (HCC) und Adenome (HCA) bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe/helle Farbgebung) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe/dunkle Farbgebung)

HCC / Tier



HCA / Tier

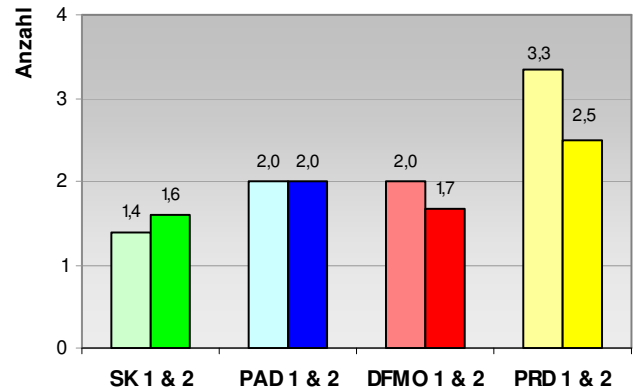


Diagramm 11 und 12: Durchschnittliche Anzahl hepatozellulärer Karzinome (HCC) und Adenome (HCA) pro Tier bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe/helle Farbgebung) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe/dunkle Farbgebung)

* zeigt signifikante Differenzen bzgl. der Gesamtzahl hepatozellulärer Karzinome bzw. der Anzahl hepatozellulärer Karzinome/Tier zwischen Gruppe DFMO 2 und Gruppe PRD 2 (* $p < 0,05$)

- SK 1 und 2:** Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2:** Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2:** Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2 g/kg Futter und Metronidazol 34mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2:** Kurzzeittiere und Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

ERGEBNISSE

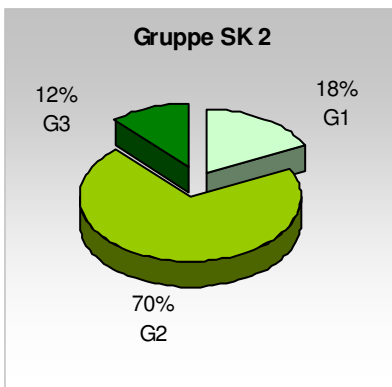
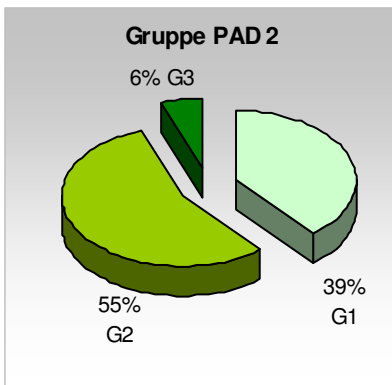


Diagramm 13: Malignitätsgrad (G1 bis G3) der hepatozellulären Karzinome bei Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

Hellgrün: G1 (Tumorzellen ähneln normalen Hepatozyten mit trabekulärer Wachstumsstruktur)

Grün: G2 (größere und prominentere Zellkerne, gelegentlich glanduläre Wachstumsstruktur)

Dunkelgrün: G3 (solide Wachstumsstruktur mit deutlich verändertem Kern/Zytoplasma-Verhältnis, basophilem Zytoplasma und sehr häufig auftretenden Mitosen)

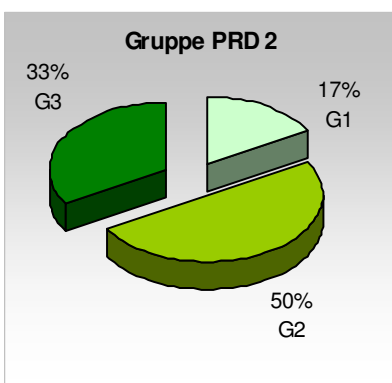
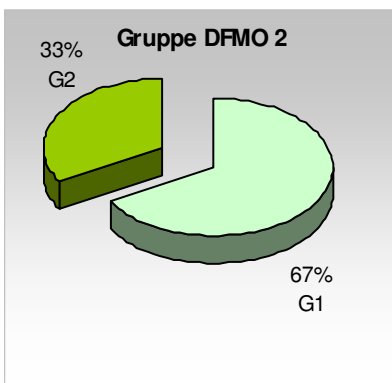


Gruppe SK 2: Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost

Gruppe PAD 2: Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)

Gruppe DFMO 2: Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)

Gruppe PRD 2: Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)



Karzinomgröße in den Langzeitgruppen

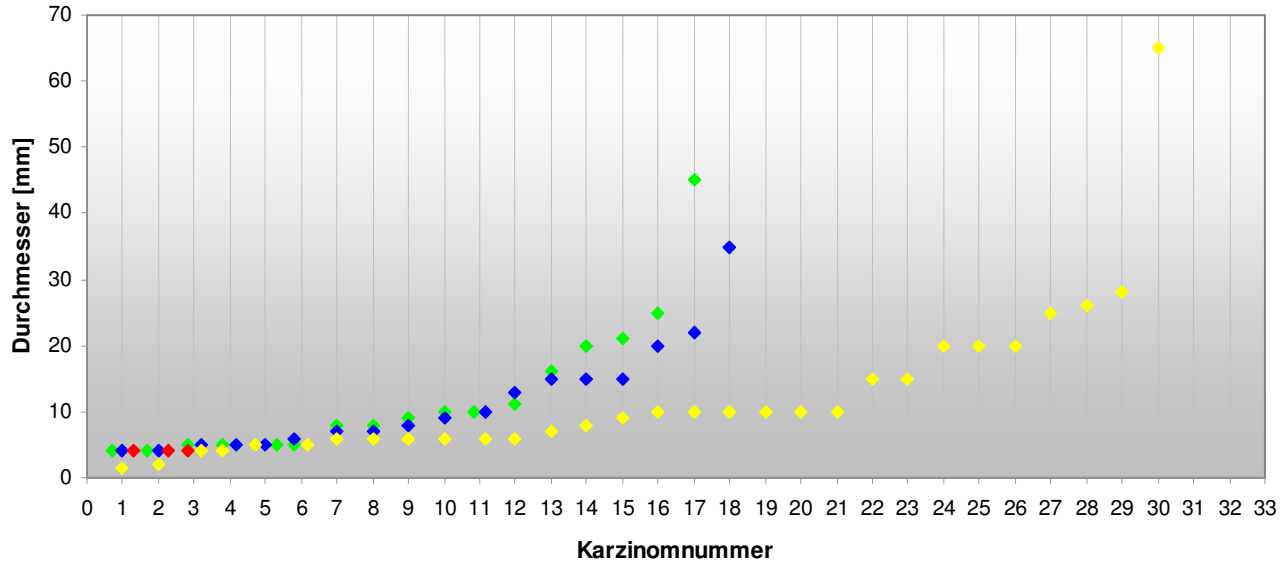


Diagramm 14: Anzahl und Größe der hepatozellulären Karzinome bei Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

- Grün (SK 2): Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- Blau (PAD 2): Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)
- Rot (DFMO 2): Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- Gelb (PRD 2): Langzeittiere mit N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

ERGEBNISSE

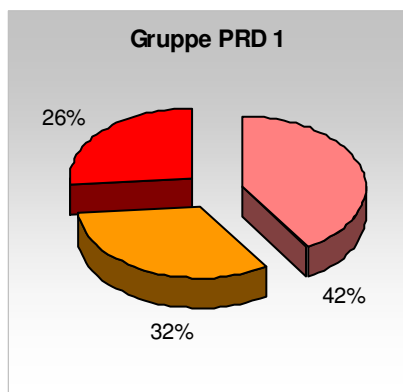
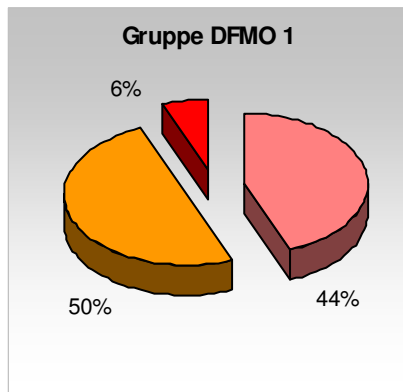
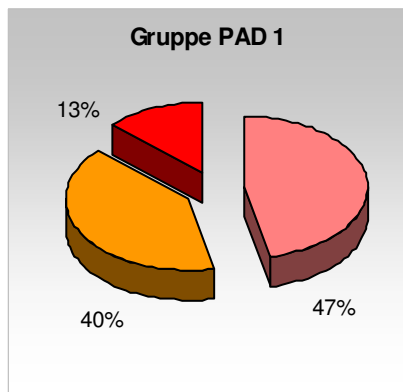
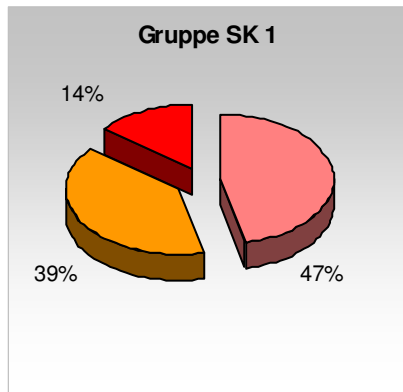
	lfd. Nr. Tier	AmCF	ACF	CCF	MCF	BCF		lfd. Nr. Tier	AmCF	ACF	CCF	MCF	BCF
SK 1	1	x		xx	xxx	x		SK 2	1	x	x	xx	x
Kurzzeittiere mit	2	x	x	xx	xx	x		Langzeittiere mit	2			xx	x
N-Nitrosomorpholin	3			xxx	xx	x		N-Nitrosomorpholin	3	xx	xx	xx	xxx
(12 mg/kg KG/d)	4			xx	xx			(12 mg/kg KG/d)	4		x	xxx	xx
+ Standardkost	5	x	x	xxx	xx	x		+ Standardkost	5	x	xx	xx	xxx
	6	x	x	xxx	xx	xx			6			xx	xx
	7		x	xx	xx	x			7			xxx	xx
									8	x	xx	xx	xx
									9		xx	xx	xxx
PAD 1	1			x	xx			PAD 2	1		x	xxx	xx
Kurzzeittiere mit	2	x		xx	xx	x		Langzeittiere mit	2			xx	x
N-Nitrosomorpholin	3	x	x	xx	xx	x		N-Nitrosomorpholin	3		x	xxx	xx
(12 mg/kg KG/d)	4		xx	xxx	xx	x		(12 mg/kg KG/d)	4			xxx	xx
+ polyaminarme Diät	5			xx				+ polyaminarme Diät	5			xx	xx
mit Antibiotikazusatz	6			xxx	xx			mit Antibiotikazusatz	6		x	xx	xxx
(Neomycin 2 g/kg	7	x	xx	xx	xx	x		(Neomycin 2 g/kg	7	x	x	xxx	xx
Futter und Metronida-	8			xxx				Futter und Metronida-	8				
zol 34mg/kg Futter)	9		x	xx	x			zol 34mg/kg Futter)	9				
	10		x	xxx	xx			+ α-Difluoromethyl-	1			x	x
								Langzeittiere mit	2			xx	x
								N-Nitrosomorpholin	3		x	x	
DFMO 1	1			x				(12 mg/kg KG/d)	4		x	xx	
Kurzzeittiere mit	2			xx				+ polyaminarme Diät	5			xx	x
N-Nitrosomorpholin	3			xx				mit Antibiotikazusatz	6			x	xx
(12 mg/kg KG/d)	4		x	xx	x			(Neomycin 2 g/kg	7	x		xx	xx
+ polyaminarme Diät	5		x	xxx	x			Futter und Metronida-	8	x		xxx	x
mit Antibiotikazusatz	6		xx	xx	xx			zol 34mg/kg Futter)	9	x		xx	
(Neomycin 2 g/kg	7		x	xx				+ α-Difluoromethyl-	1			x	x
Futter und Metronida-	8		x	xx				Langzeittiere mit	2			xx	x
zol 34mg/kg Futter)	9							N-Nitrosomorpholin	3	x	x	x	xx
+ α-Difluoromethyl-	10							(12 mg/kg KG/d)	4		x	xx	x
ornithin (2%ig im								+ polyaminreiche Diät	5		xx	x	x
Trinkwasser)								+ Aminoguanidin	6	x	xx	x	xx
								(50 mg/kg KG/d)	7			xx	xxx
									8			xxx	xxx
									9	x		xx	xxx
													xx
PRD 1	1			xx	x	xx		PRD 2	1		x	xxx	xx
Kurzzeittiere mit	2	x	x	xxx	xx	x		Langzeittiere mit	2		x	xxx	xx
N-Nitrosomorpholin	3	x	x	xxx	xxx	xx		N-Nitrosomorpholin	3	x	x	x	x
(12 mg/kg KG/d)	4		x	xxx	xx	x		(12 mg/kg KG/d)	4		x	xx	x
+ polyaminreiche Diät	5			xxx	xx			+ polyaminreiche Diät	5		xx	x	x
+ Aminoguanidin	6	x	xx	xxx	xxx	x		+ Aminoguanidin	6	x	xx	x	xx
(50 mg/kg KG/d)	7			xx	xx	x		(50 mg/kg KG/d)	7		x	xx	xxx
	8			xxx	xx	x			8			xxx	xxx
	9			xx	x				9	x		xx	xxx
	10			xxx	x								xx

Tabelle 6: Häufigkeit und histologische Klassifizierung präneoplastischer Leberzellherde (Foci)

AmCF: amphophilzellige präneoplastische Leberzellherde (Foci)
ACF: azidophilzellige präneoplastische Leberzellherde (Foci)
CCF: klarzellige präneoplastische Leberzellherde (Foci)
MCF: gemischtzellige präneoplastische Leberzellherde (Foci)
BCF: basophilzellige präneoplastische Leberzellherde (Foci)

x : wenige Foci
 xx : mehrere Foci
 xxx : multiple Foci

Kurzzeittiere



Langzeittiere

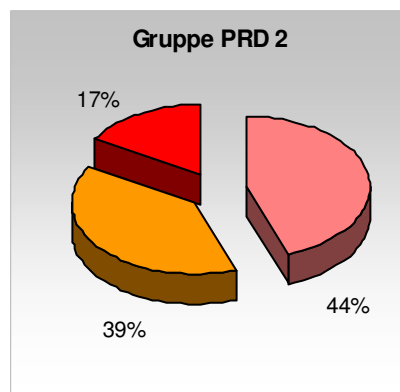
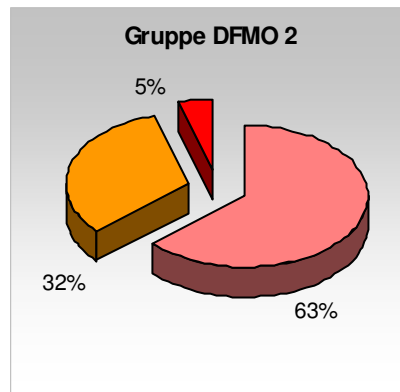
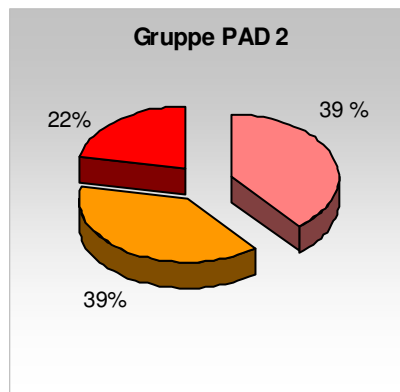
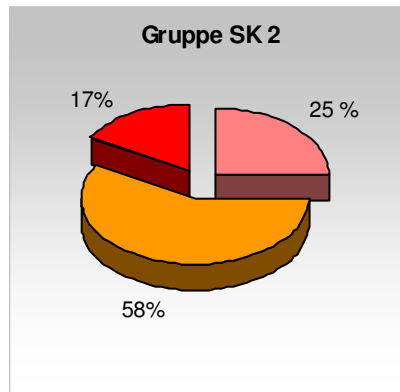


Diagramm 15: Häufigkeit präneoplastischer Leberzellherde (Foci) bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

Rosa: wenige Foci

Orange: mehrere Foci

Rot: multiple Foci

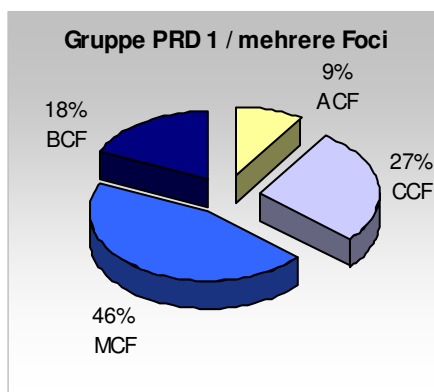
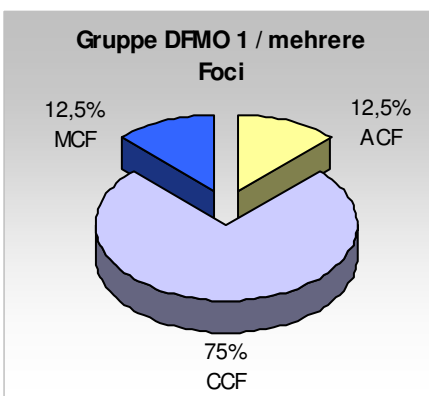
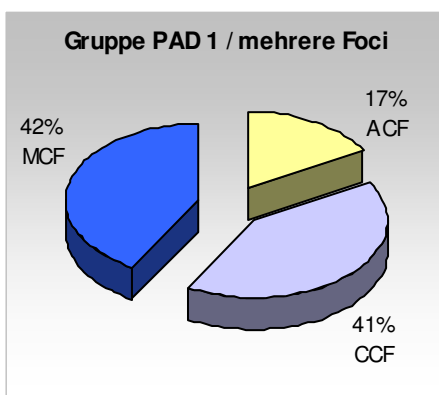
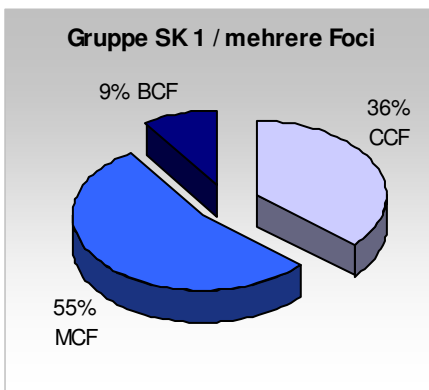
Gruppe SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost

Gruppe PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)

Gruppe DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)

Gruppe PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

Kurzzeittiere



Langzeittiere

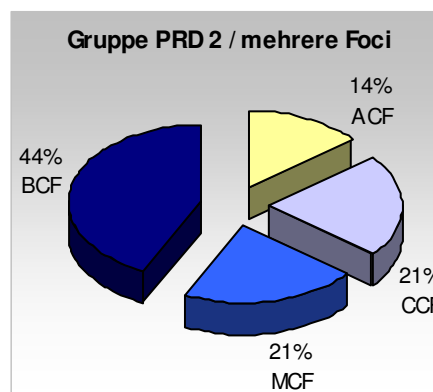
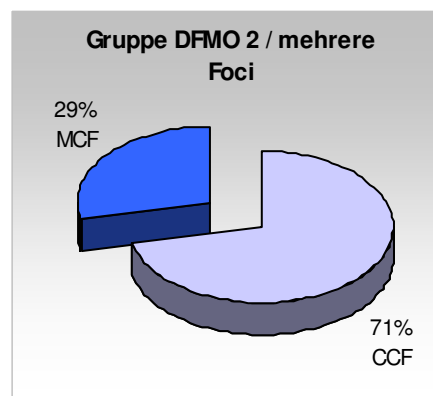
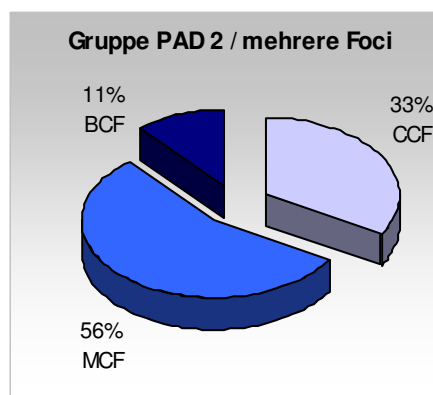
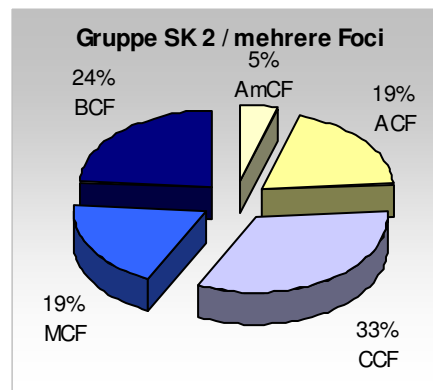


Diagramm 16: Histologische Klassifizierung der mit einer mittleren Häufigkeit auftretenden präneoplastischen Leberzellherde (Foci) bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

Hellgelb: amphophilzellig (AmCF)
Gelb: azidophilzellig (ACF)
Hellblau: klarzellig (CCF)
Blau: gemischtzellig (MCF)
Dunkelblau: basophilzellig (BCF)

Gruppe SK 1 und 2:
 Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost

Gruppe PAD 1 und 2:
 Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)

Gruppe DFMO 1 und 2:
 Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)

Gruppe PRD 1 und 2:
 Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

ODC

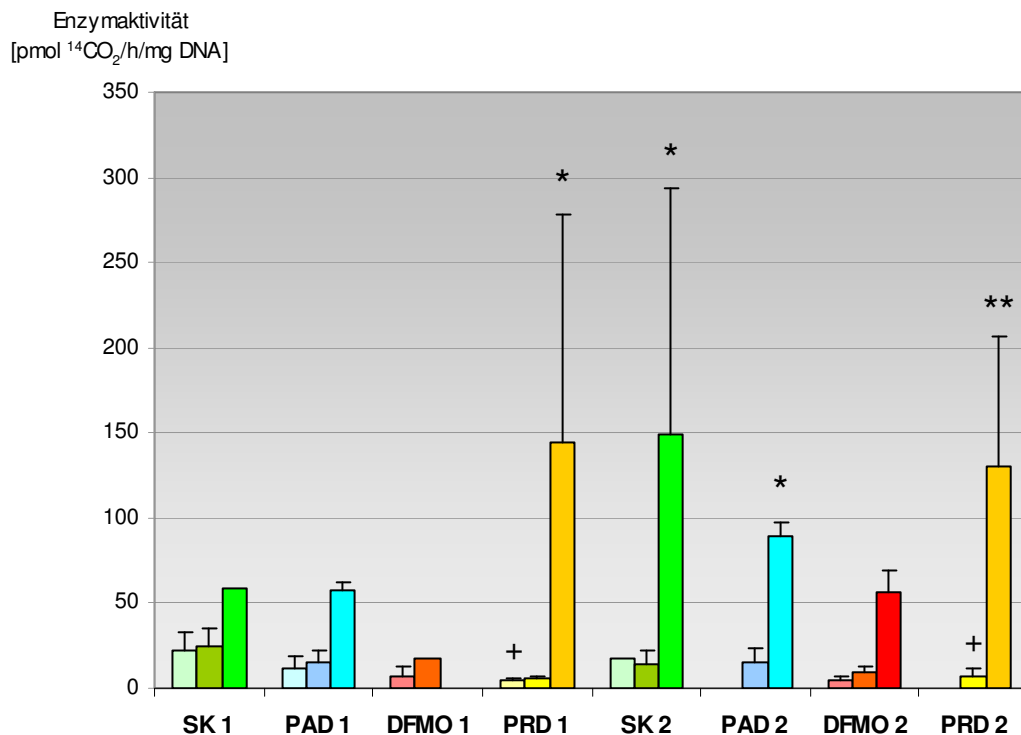


Diagramm 17: Aktivität der Ornithindecaboxylase (ODC) im Lebergewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

* zeigt signifikante Differenzen zwischen Karzinomgewebe und karzinombenachbartem Lebergewebe innerhalb der Gruppen SK 2 und PAD 2 sowie zwischen Karzinomgewebe und Lebergewebe karzinomfreier Tiere bzw. karzinombenachbartem Lebergewebe innerhalb der Gruppe PRD 1 (* jeweils $p < 0,05$)

** zeigen hochsignifikante Differenzen zwischen Karzinomgewebe und karzinombenachbartem Lebergewebe innerhalb der Gruppe PRD 2 (** $p < 0,0025$)

+ zeigt signifikante Differenzen zwischen Lebergewebe karzinomfreier Tiere der Gruppe PRD 1 und entsprechendem Gewebe der Gruppen SK 1 und PAD 1 sowie zwischen karzinombenachbartem Lebergewebe der Gruppe PRD 2 und entsprechendem Gewebe der Gruppe PAD 2 (+ jeweils $p < 0,05$)

heller Farbton: Lebergewebe karzinomfreier Tiere, mittlerer Farbton: karzinombenachbartes, makroskopisch nicht befallenes Lebergewebe, dunkler Farbton: Leberkarzinomgewebe

*/**: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Gewebeproben innerhalb einer Behandlungsgruppe, +/++: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Kurzzeitbehandlungsgruppen bzw. im Vergleich der Langzeitbehandlungsgruppen

SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost

PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)

DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)

PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

SAM-DC

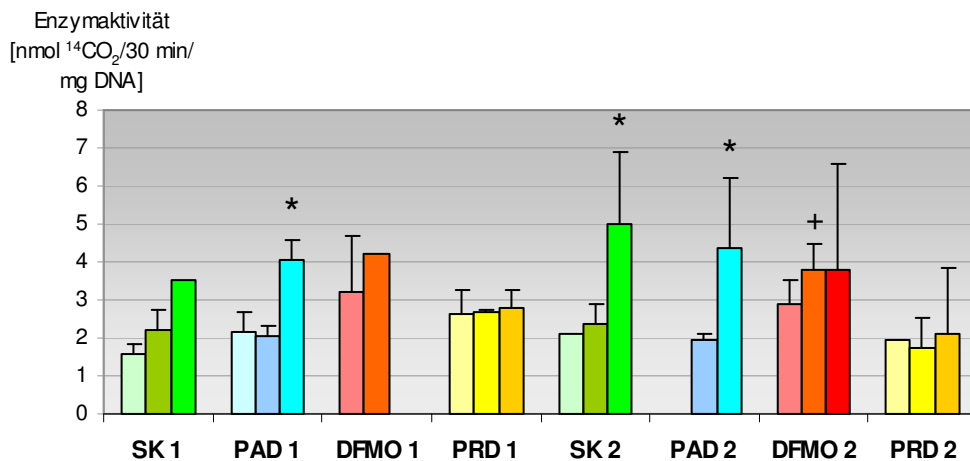


Diagramm 18: Aktivität der S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC) im Lebergewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

* zeigt signifikante Differenzen zwischen Karzinomgewebe und Lebergewebe karzinomfreier Tiere innerhalb der Gruppe PAD 1 sowie zwischen Karzinomgewebe und karzinombenachbartem Lebergewebe innerhalb der Gruppen SK 2 und PAD 2 (* jeweils $p < 0,05$)

+ zeigt signifikante Differenzen zwischen karzinombenachbartem Lebergewebe der Gruppe DFMO 2 und entsprechendem Gewebe der Gruppe PRD 2 (+ $p < 0,05$)

heller Farbton: Lebergewebe karzinomfreier Tiere, mittlerer Farbton: karzinombenachbartes, makroskopisch nicht befallenes Lebergewebe, dunkler Farbton: Leberkarzinomgewebe

*/**: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Gewebeproben innerhalb einer Behandlungsgruppe, +/++: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Kurzzeitbehandlungsgruppen bzw. im Vergleich der Langzeitbehandlungsgruppen

SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost

PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)

DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)

PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

SAT

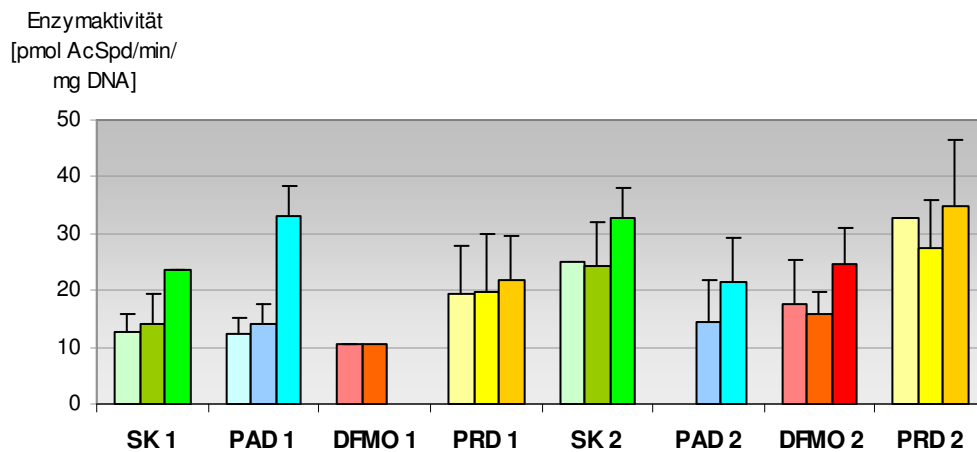


Diagramm 19: Aktivität der Spermidin-/Spermin-N₁-Acetyltransferase (SAT) im Lebergewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

heller Farbton: Lebergewebe karzinomfreier Tiere, mittlerer Farbton: karzinombenachbartes, makroskopisch nicht befallenes Lebergewebe, dunkler Farbton: Leberkarzinomgewebe

- SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)+ α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

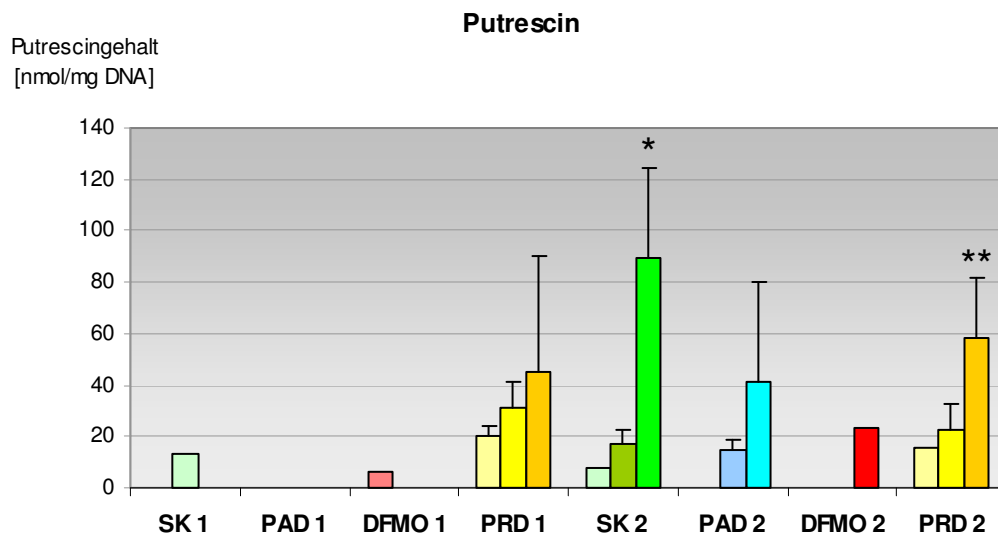


Diagramm 20: Putrescinkonzentration im Lebergewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

* zeigt signifikante Differenzen zwischen Karzinomgewebe und karzinombenachbartem Lebergewebe innerhalb der Gruppe SK 2 (* $p < 0,05$)

** zeigen hochsignifikante Differenzen zwischen Karzinomgewebe und karzinombenachbartem Lebergewebe innerhalb der Gruppe PRD 2 (** $p < 0,0025$)

heller Farbton: Lebergewebe karzinomfreier Tiere, mittlerer Farbton: karzinombenachbartes, makroskopisch nicht befallenes Lebergewebe, dunkler Farbton: Leberkarzinomgewebe

*/**: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Gewebeproben innerhalb einer Behandlungsgruppe, +/+: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Kurzzeitbehandlungsgruppen bzw. im Vergleich der Langzeitbehandlungsgruppen

SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost

PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)

DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)

PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

Spermidin

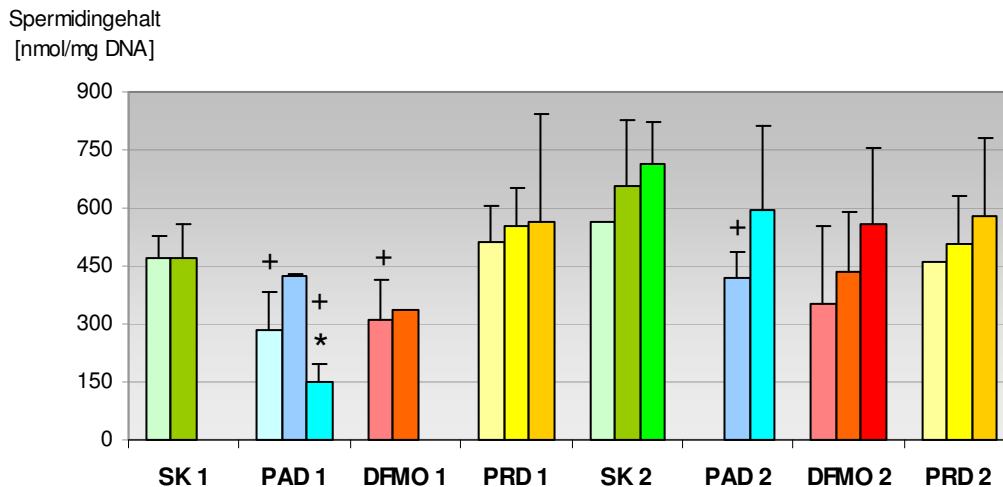


Diagramm 21: Spermidinkonzentration im Lebergewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

* zeigt signifikante Differenzen zwischen Karzinomgewebe und Lebergewebe karzinomfreier Tiere innerhalb der Gruppe PAD 1 (* $p < 0,05$)

+ zeigt signifikante Differenzen zwischen Lebergewebe karzinomfreier Tiere der Gruppe PAD 1 und entsprechendem Gewebe der Gruppe SK 1 bzw. entsprechendem Gewebe der Gruppe PRD 1, zwischen Karzinomgewebe der Gruppe PAD 1 und Karzinomgewebe der Gruppe PRD 1, zwischen Lebergewebe karzinomfreier Tiere der Gruppe DFMO 1 und entsprechendem Gewebe der Gruppe PRD 1 sowie zwischen karzinombenachbartem Lebergewebe der Gruppe PAD 2 und entsprechendem Gewebe der Gruppe SK 2 (+ jeweils $p < 0,05$)

heller Farbton: Lebergewebe karzinomfreier Tiere, mittlerer Farbton: karzinombenachbartes, makroskopisch nicht befallenes Lebergewebe, dunkler Farbton: Leberkarzinomgewebe

*/**: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Gewebeproben innerhalb einer Behandlungsgruppe, +/+: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Kurzzeitbehandlungsgruppen bzw. im Vergleich der Langzeitbehandlungsgruppen

SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost

PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)

DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)

PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

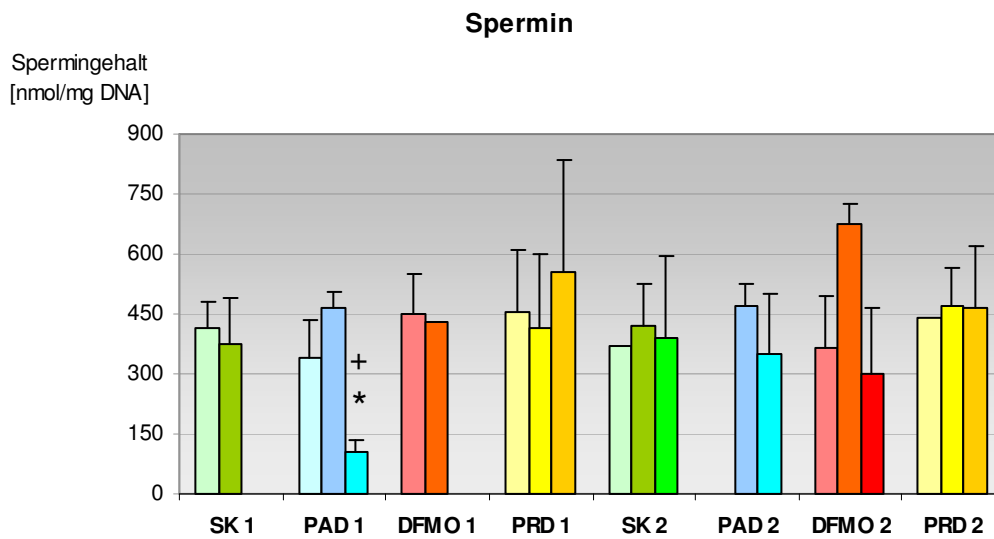


Diagramm 22: Sperminkonzentration im Lebergewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

* zeigt signifikante Differenzen zwischen Karzinomgewebe und Lebergewebe karzinomfreier Tiere innerhalb der Gruppe PAD 1 (* $p < 0,05$)

+ zeigt signifikante Differenzen zwischen Karzinomgewebe der Gruppe PAD 1 und Karzinomgewebe der Gruppe PRD 1 (+ $p < 0,05$)

heller Farbton: Lebergewebe karzinomfreier Tiere, mittlerer Farbton: karzinombenachbartes, makroskopisch nicht befallenes Lebergewebe, dunkler Farbton: Leberkarzinomgewebe

*/**: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Gewebeproben innerhalb einer Behandlungsgruppe, +/++: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Kurzzeitbehandlungsgruppen bzw. im Vergleich der Langzeitbehandlungsgruppen

SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost

PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)

DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)

PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

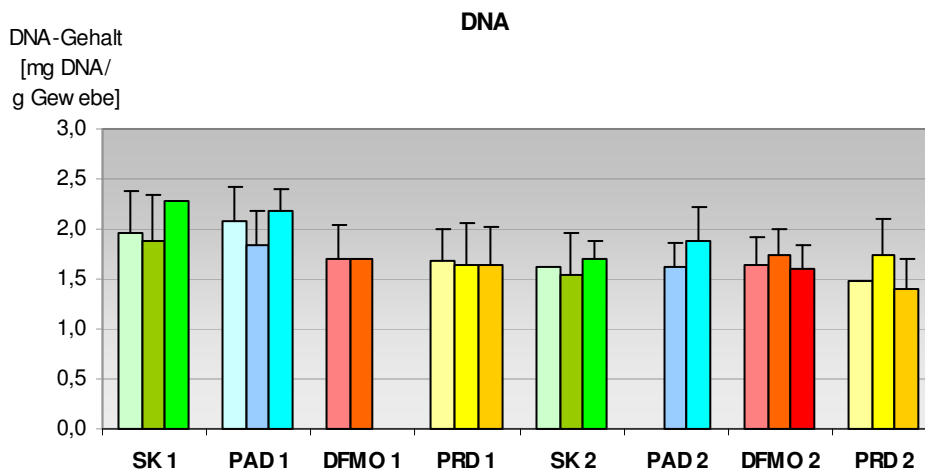


Diagramm 23: DNA-Gehalt im Lebergewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

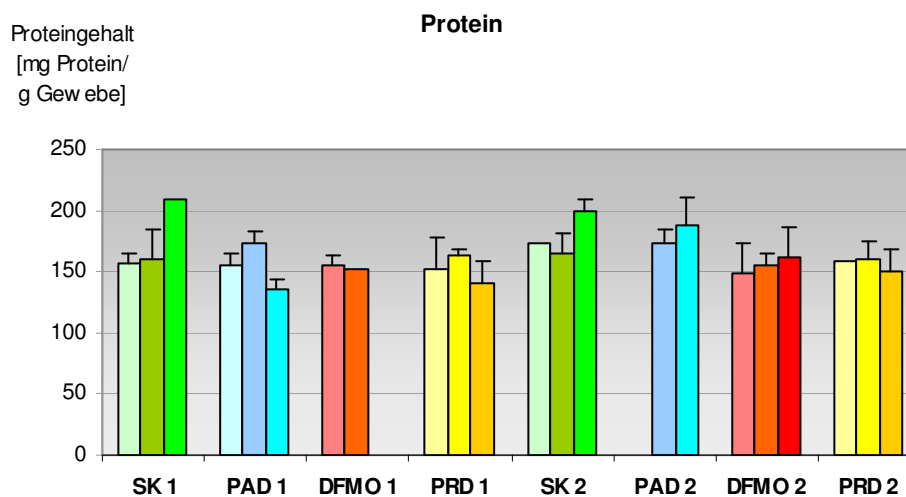


Diagramm 24: Proteingehalt im Lebergewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

heller Farbton: Lebergewebe karzinomfreier Tiere, mittlerer Farbton: karzinombenachbartes, makroskopisch nicht befallenes Lebergewebe, dunkler Farbton: Leberkarzinomgewebe

- SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)+ α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

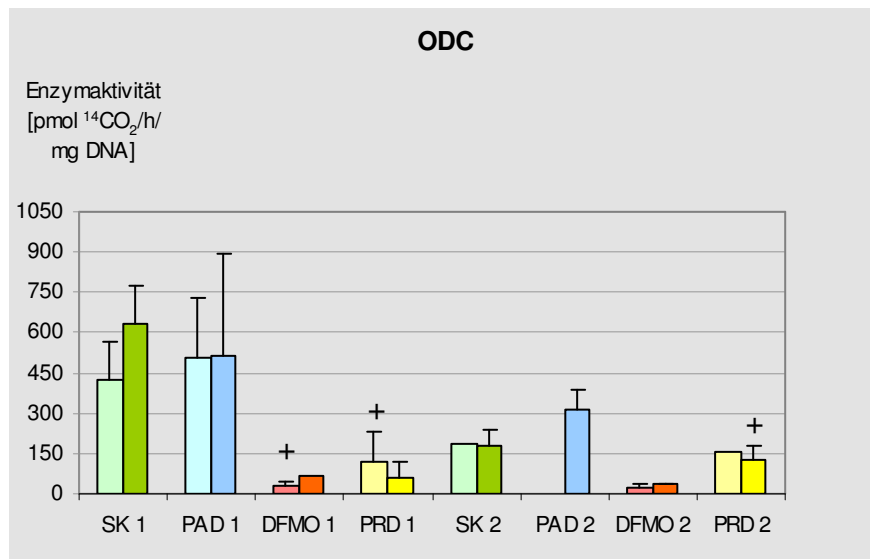


Diagramm 25: Aktivität der Ornithindecaboxylase (ODC) im Nierengewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

+ zeigt signifikante Differenzen zwischen Nierengewebe karzinomfreier Tiere der Gruppe DFMO 1 und entsprechendem Gewebe der Gruppe SK 1 bzw. entsprechendem Gewebe der Gruppe PAD 1, zwischen Nierengewebe karzinomfreier Tiere der Gruppe PRD 1 und entsprechendem Gewebe der Gruppe PAD 1 sowie zwischen Nierengewebe karzinombefallener Tiere der Gruppe PRD 2 und entsprechendem Gewebe der Gruppe PAD 2 (+ jeweils $p < 0,05$)

heller Farbton: Nierengewebe karzinomfreier Tiere, dunkler Farbton: Nierengewebe karzinombefallener Tiere

+ / ++: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Kurzzeitbehandlungsgruppen bzw. im Vergleich der Langzeitbehandlungsgruppen

- SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

ERGEBNISSE

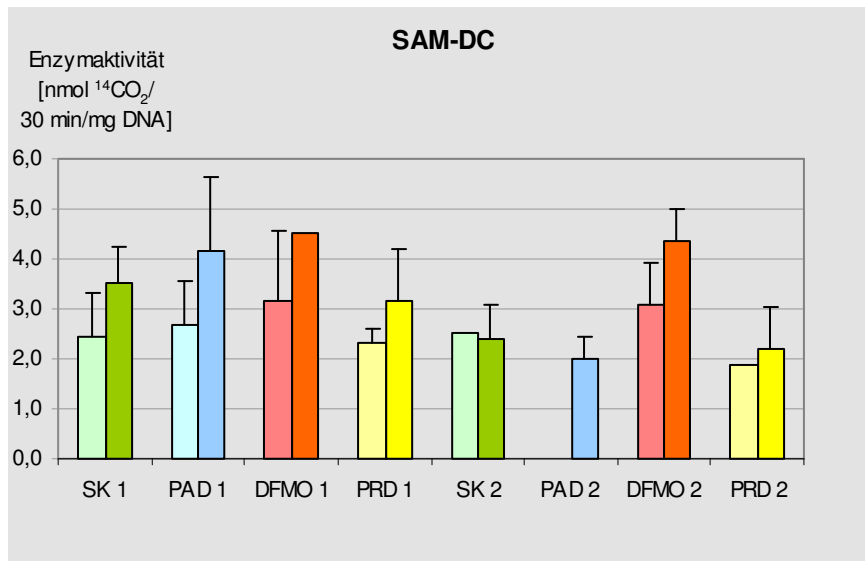


Diagramm 26: Aktivität der S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAM-DC) im Nierengewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

heller Farbton: Nierengewebe karzinomfreier Tiere, dunkler Farbton: Nierengewebe karzinombefallener Tiere

- SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

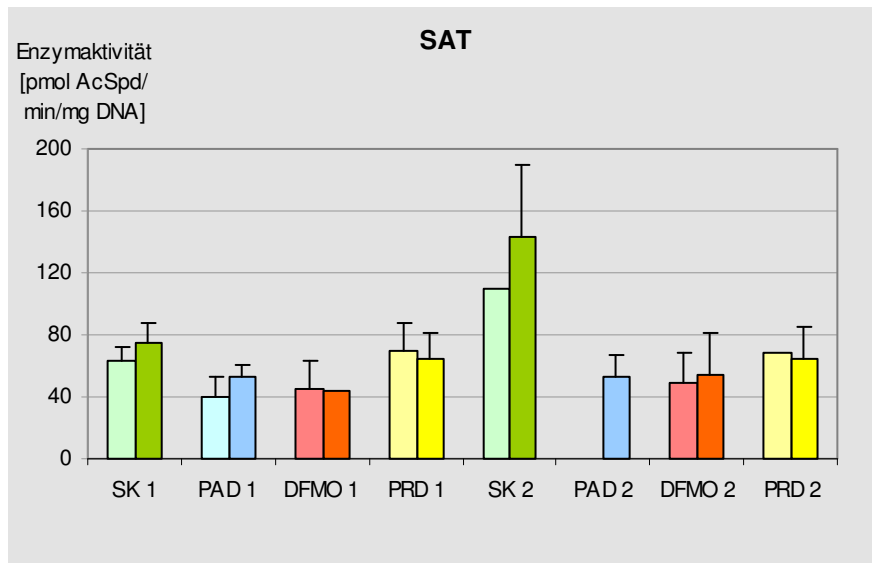


Diagramm 27: Aktivität der Spermidin-/Spermin-N₁-Acetyltransferase (SAT) im Nierengewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

heller Farbton: Nierengewebe karzinomfreier Tiere, dunkler Farbton: Nierengewebe karzinombefallener Tiere

- SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

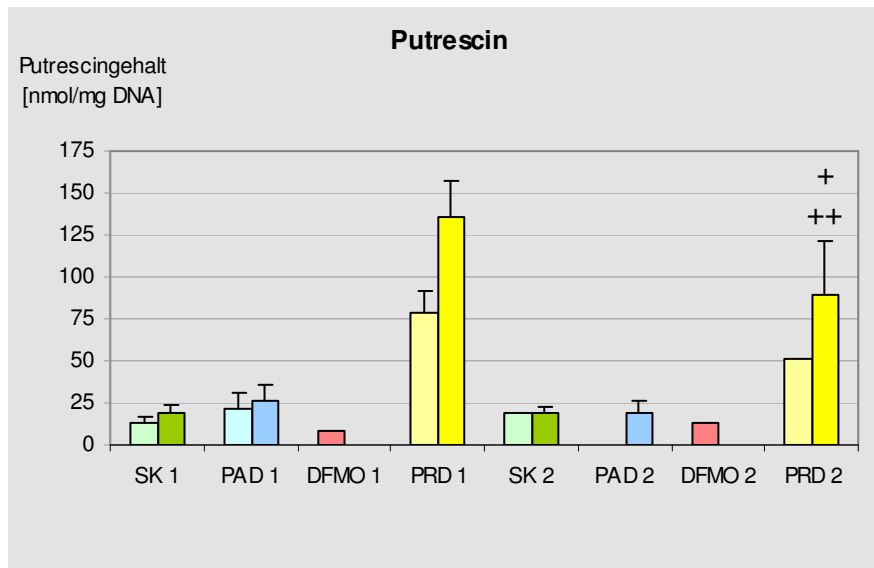


Diagramm 28: Konzentration von Putrescin im Nierengewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

+ zeigt signifikante Differenzen zwischen Nierengewebe karzinombefallener Tiere der Gruppen PRD 2 und entsprechendem Gewebe der Gruppe PAD 2 (+ $p < 0,05$)

++ zeigen hochsignifikante Differenzen zwischen Nierengewebe karzinombefallener Tiere der Gruppe PRD 2 und entsprechendem Gewebe der Gruppe SK 2 (+ $p < 0,0025$)

heller Farbton: Nierengewebe karzinomfreier Tiere, dunkler Farbton: Nierengewebe karzinombefallener Tiere

+ / ++: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Kurzzeitbehandlungsgruppen bzw. im Vergleich der Langzeitbehandlungsgruppen

- SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

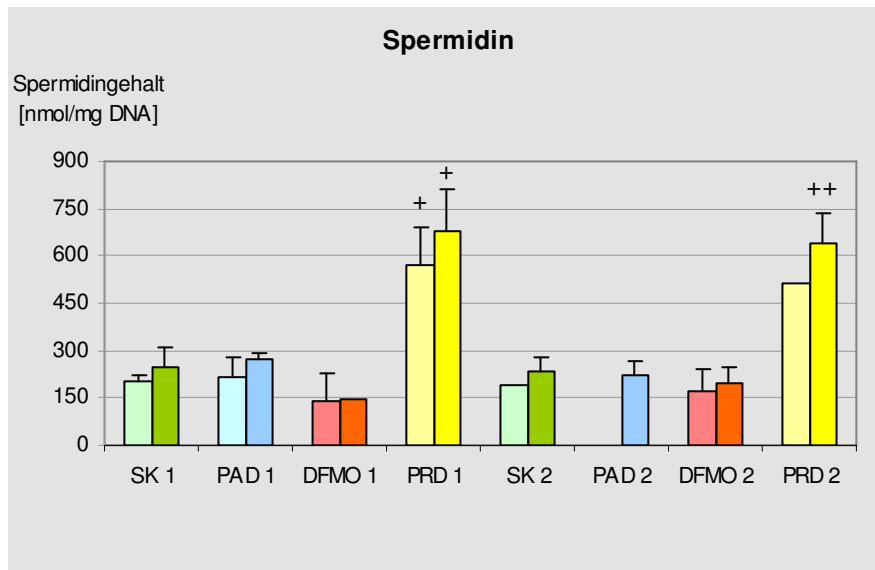


Diagramm 29: Konzentration von Spermidin im Nierengewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

+ zeigt signifikante Differenzen zwischen Nierengewebe karzinomfreier Tiere der Gruppe PRD 1 und entsprechendem Gewebe der Gruppen SK 1, PAD 1 und DFMO 1 sowie zwischen Nierengewebe karzinombefallener Tiere der Gruppe PRD 1 und entsprechendem Gewebe der Gruppe SK 1 (+ jeweils $p < 0,05$)

++ zeigen hochsignifikante Differenzen zwischen Nierengewebe karzinombefallener Tiere der Gruppe PRD 2 und entsprechendem Gewebe der Gruppen SK 2 und PAD 2 (++ $p < 0,0025$)

heller Farbton: Nierengewebe karzinomfreier Tiere, dunkler Farbton: Nierengewebe karzinombefallener Tiere

+ / ++: signifikante/hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Kurzzeitbehandlungsgruppen bzw. im Vergleich der Langzeitbehandlungsgruppen

- SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

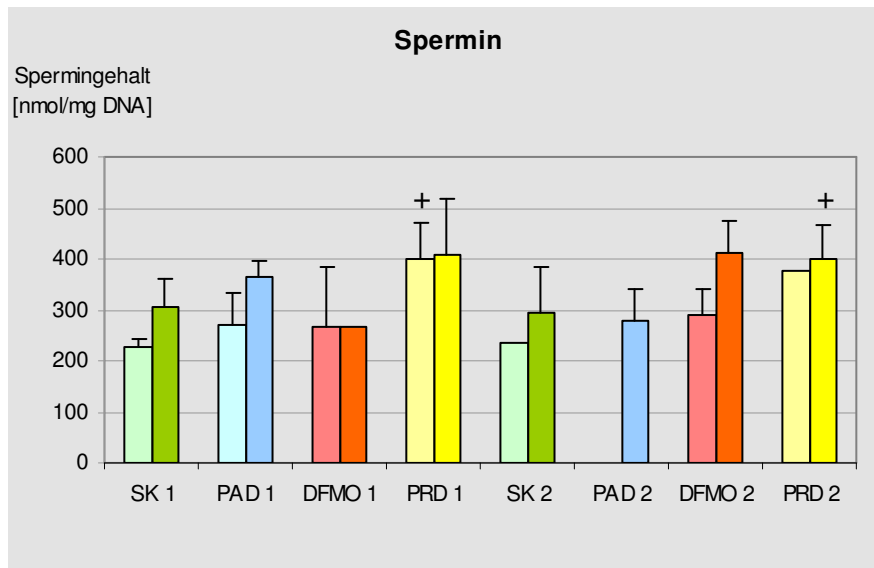


Diagramm 30: Konzentration von Spermin im Nierengewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

+ zeigt signifikante Differenzen zwischen Nierengewebe karzinomfreier Tiere der Gruppe PRD 1 und entsprechendem Gewebe der Gruppen SK 1 und PAD 1 sowie zwischen Nierengewebe karzinombefallener Tiere der Gruppe PRD 2 und entsprechendem Gewebe der Gruppen SK 2 und PAD 2 (+ jeweils $p < 0,05$)

heller Farbton: Nierengewebe karzinomfreier Tiere, dunkler Farbton: Nierengewebe karzinombefallener Tiere

+ / ++: signifikante / hochsignifikante Differenzen im Vergleich der Kurzzeitbehandlungsgruppen bzw. im Vergleich der Langzeitbehandlungsgruppen

- SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

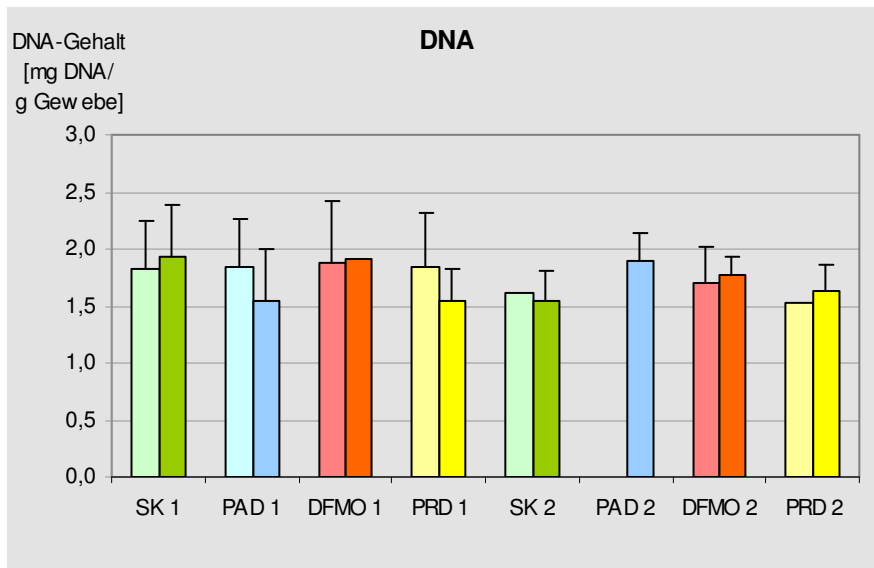


Diagramm 31: DNA-Gehalt im Nierengewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

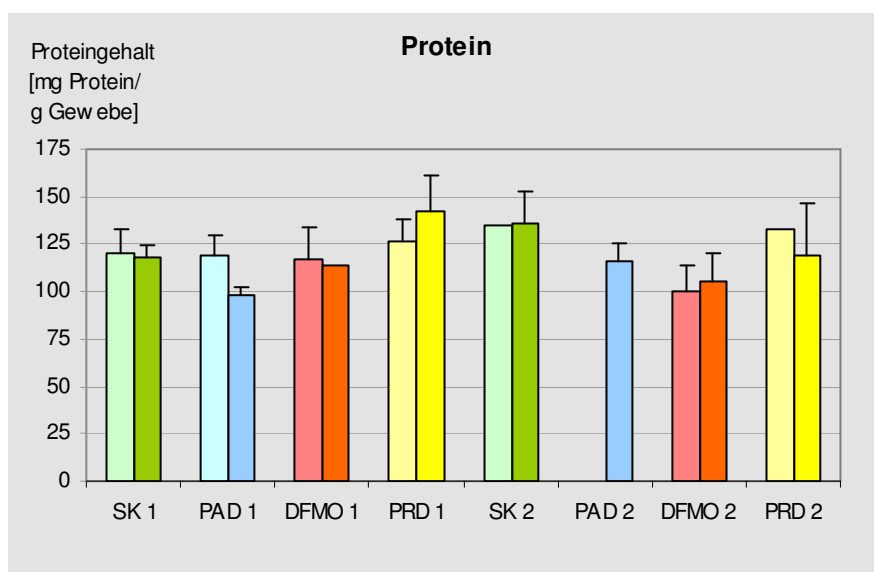


Diagramm 32: Proteingehalt im Nierengewebe bei Kurzzeittieren (10 Wochen nach NNM-Gabe) und Langzeittieren (14 Wochen nach NNM-Gabe)

heller Farbton: Nierengewebe karzinomfreier Tiere, dunkler Farbton: Nierengewebe karzinombefallener Tiere

- SK 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + Standardkost
- PAD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter)
- DFMO 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminarme Diät mit Antibiotikazusatz (Neomycin 2g/kg Futter und Metronidazol 34 mg/kg Futter) + α -Difluoromethylornithin (2%ig im Trinkwasser)
- PRD 1 und 2: Kurzzeittiere und Langzeittiere mit NNM (12 mg/kg KG/d) + polyaminreiche Diät + Aminoguanidin (50 mg/kg KG/d)

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Auswirkungen einer durch Inhibition des intra- sowie des extrazellulären Polyaminstoffwechsels hervorgerufenen Polyaminreduktion bzw. einer vermehrten exogenen enteralen Polyaminzufuhr auf die Entstehung N-Nitrosomorpholin-induzierter Lebertumoren. Neben der quantitativen und histologischen Auswertung der entstandenen präneoplastischen und neoplastischen Leberveränderungen wurden auch die Auswirkungen auf den intrazellulären Polyaminstoffwechsel untersucht.

In entsprechenden Langzeit-Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Modulationen des Polyamingehalts keine toxischen Effekte bewirken und von den Versuchstieren gut toleriert werden. Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme wurden in den vorliegenden Untersuchungen durch unterschiedliche Polyaminkonzentrationen in der Nahrung nicht maßgeblich beeinflusst (*Diagramm 5 und 6*).

Im zeitlichen Verlauf der Gewichtsentwicklung und im Vergleich des maximalen durchschnittlichen Körpergewichts bzw. der Flächen unter den Gewichtsverlaufskurven („area under curve“/AUC) fiel bei den Tieren mit polyaminarmer, antibiotikahaltiger Kost und zusätzlich verabreichten DFMO (Gruppen DFMO 1 und DFMO 2) gegenüber den anderen Versuchsgruppen eine tendenziell reduzierte Entwicklung des Körpergewichts auf (*Diagramm 1 bis 3 a und 3 b*), ohne dass allerdings signifikante Unterschiede nachgewiesen wurden. Die inhibitorische Wirkung von α -Difluoromethylornithin auf Wachstum und Entwicklung von spezifischem Organ- oder Tumorgewebe ist bekannt und in der Literatur vielfach belegt (*Kingsnorth et al., 1983; Luk et al., 1989; Pegg und Mc Cann, 1992; Löser et al., 1998*). Eine gleichzeitige Verzögerung der Körpergewichtsentwicklung der Versuchstiere wurde dabei nur teilweise und vor allem bei neugeborenen Tieren beobachtet (*Sparapani et al., 1996*), was am ehesten auf Unterschiede in Dauer und Dosierung von DFMO sowie Art und Alter der Versuchstiere zurückzuführen ist. Sehr deutlich wirkt sich die DFMO-vermittelte Wachstumsver-

zögerung dagegen auf die fetale und embryonale Entwicklung in der Schwangerschaft aus (O`Toole et al., 1989; Lopéz-García et al., 2008).

Dass Tiere unter der alleinigen Reduzierung der enteralen Polyamine mittels einer antibiotikahaltigen und polyaminreduzierten Kost im Vergleich zu Standardkosttieren keine Beeinflussung des Körpergewichts zeigten, steht im Einklang mit den Ergebnissen von Löser et al., wonach infolge einer polyaminreduzierten Kost mit und auch ohne Antibiotikazusatz zwar eine signifikante Hypotrophie von Dünn- und Dickdarm eintrat, eine gleichzeitige Verringerung des Körpergewichts allerdings nicht auffiel (Löser et al., 1998; Löser et al. 1997 b).

Der in allen Versuchsgruppen gleichermaßen auftretende Wachstumsrückgang während der letzten 3 Wochen unter NNM-Medikation ist vermutlich auf die toxische Komponente, und nicht auf die karzinogene Wirkung des Nitrosamins zurückzuführen. Gewichtsverluste und auch Todesfälle infolge toxischer Auswirkungen vor allem unter hohen NNM-Dosierungen sind aus der Literatur bekannt (Bannasch et al., 1979). Das in den Langzeitgruppen nach dem Absetzen des Karzinogens erneute Ansteigen der täglichen Wachstumsrate kann angesichts dieser Vermutung als Erholungsphase interpretiert werden. Die etwa 35 Tage vor Versuchsende beginnende Gewichtsabnahme bei Langzeit- und Kurzzeittieren markiert das Auftreten der ersten Pneumoniefälle und erklärt sich aus dem infektionsbedingt zunehmend schlechten Allgemeinzustand der Tiere. Daher waren alle Gruppen zeitgleich, und nicht entsprechend des zeitlich versetzten Versuchsbeginns betroffen. Wie die Sektionen der vor Versuchsende infolge der Pneumonie verstorbenen Tiere zeigten, wies die Leber in den meisten Fällen bereits makroskopisch erkennbare tumoröse Veränderungen auf. Ausbreitung und Auswirkung der Pneumonie wurden also höchstwahrscheinlich durch die zu diesem Zeitpunkt schon fortgeschrittene Tumorerkrankung und die damit verbundene Immunschwächung begünstigt.

4.1 Auswirkungen eines veränderten Polyaminhaushalts auf Tumorgenese und Tumorstadium in der Leber

Zur Beurteilung eventueller Unterschiede in den Karzinogenese Prozessen wurden bei den Tieren der verschiedenen Versuchsgruppen Zeitpunkt des Auftretens sowie Anzahl und Histologie der Leberveränderungen ausgewertet und mit den entsprechenden Ergebnissen unter Standardkostbedingungen verglichen. Die detaillierte Auswertung der erkrankten Tiere

schloss alle diagnostizierten NNM-induzierten Gewebeveränderungen ein, wozu präneoplastische Leberzellherde (Foci), hepatozelluläre Karzinome (HCC) und hepatozelluläre Adenome (HCA), cholangiozelluläre Karzinome (CCC) und cholangiozelluläre Adenome (CCA) sowie Angiosarkome (AS) zählten (*Lijinski et al., 1988; Bannasch und Zerban, 1986*). Die histologische Klassifizierung der präneoplastischen Leberzellherde (Foci) erfolgte anhand der Unterscheidung in amphophilzellige, azidophilzellige, klarzellige, gemischtzellige und basophilzellige Merkmale. Die hepatozellulären Karzinome wurden entsprechend des Malignitätsgrades den zunehmend malignen Graduierungen G1 bis G3 zugeordnet.

4.1.1 Reduzierung der exogenen enteralen Polyamine

Löser et al. konnten mit der alleinigen Fütterung einer polyaminarmen und – um die Abtötung polyaminproduzierender Darmbakterien zu bewirken – antibiotikahaltigen Diät zur Reduzierung der luminalen Polyamine eine hochsignifikante Hemmung der DMH-induzierten Kolonkarzinogenese erzielen (*Löser et al., 1998*). Inwieweit diese eindrucksvollen Resultate auf die Karzinogenese nicht-intestinaler Organgewebe übertragbar sind, die im Gegensatz zur Darmmukosa den luminalen Polyaminen nicht direkt ausgesetzt sind, sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden.

Bezogen auf die prozentualen Anteile erkrankter Tiere 10 Wochen nach Beendigung der NNM-Applikation war die Ausbildung eines Lebertumors unter polyaminreduzierter und antibiotikahaltiger Kost gegenüber der Standardkostgruppe tendenziell aber nicht signifikant erniedrigt (*Diagramm 7*). Entsprechend ergab auch die differenzierte Auswertung hepatozellulärer Karzinome und Adenome nach 10 Wochen ein bei PAD-Tieren gegenüber SK-Tieren reduziertes Erkrankungsrisiko. 14 Wochen nach NNM-Stopp wiesen dagegen sowohl unter polyaminreduzierter und antibiotikahaltiger Kost als auch unter Standardkost jeweils 100% der Tiere einen Tumorbefall auf und auch die Betrachtung der einzelnen Tumorentitäten zeigte nach 14 Wochen im Vergleich dieser Gruppen keine relevanten Unterschiede (*Diagramm 8*). Die verminderte Zufuhr exogener enteraler Polyamine scheint demnach auf die NNM-induzierte Tumorgenese zwar möglicherweise verzögernd aber nicht letztendlich reduzierend zu wirken. In der Auswertung der HCC- bzw. HCA-Gesamtzahlen und pro-Kopf-Zahlen (*Diagramm 9 bis 12*) ließ die Gesamtzahl hepatozellulärer Adenome unter PAD-Tieren ebenfalls eine solche initiale Verzögerung erkennen (*Diagramm 10*): Eine im Ver-

DISKUSSION

gleich zur Standardkostgruppe erniedrigte Adenomzahl trat nur 10 Wochen nach NNM-Applikation auf; das 14-Wochen-Ergebnis zeigt keine nachhaltige Beeinflussung.

Die pro-Kopf-Zahl der Adenome sowie Gesamtzahl und pro-Kopf-Zahl hepatozellulärer Karzinome wiesen unter polyaminarmer und antibiotikahaltiger Kost gegenüber den Standardkosttieren keine maßgeblichen Unterschiede auf (*Diagramm 9, 11 und 12*). Dass sich in diesen Fällen keine Hinweise auf eine initial verzögerte Tumorgenese fanden, ist möglicherweise auf die niedrigen Fallzahlen zurückzuführen.

Ebenso ergab die Größe der nach 14 Wochen ausgewerteten hepatozellulären Karzinome im Vergleich zwischen SK- und PAD-Tieren keine wesentlichen Unterschiede (*Diagramm 14*). In der histologischen Graduierung der Leberzellkarzinome zeichnete sich allerdings innerhalb der PAD-Gruppe ein gegenüber Standardkosttieren erkennbar verlangsamtes Fortschreiten des Karzinogeneseverlaufs ab, was sich in einem vergleichsweise hohen Anteil niedrigmaligner G1-Stadien und einem gegenüber den Standardkosttieren reduzierten Auftreten hochmaligner G3-Karzinome äußerte (*Diagramm 13*).

Über einen Einfluss auf die Entstehung präneoplastischer Leberzellherde kann anhand der prozentualen Erkrankungshäufigkeit keine Aussage getroffen werden, da bereits 10 Wochen nach letztmaliger NNM-Medikation ein Stadium der Tumorgenese erfasst wurde, in dem in allen Ernährungsgruppen 100% der Tiere diese initialen Leberzellveränderungen ausgebildet hatten (*Diagramm 7*). Angesichts des bewusst gewählten sehr effizienten Tumormodells wären zur Auswertung der präneoplastischen Befunde frühere Untersuchungen nötig, die in diesem Versuchsansatz nicht vorgesehen waren.

Die Häufigkeit und auch die histologische Klassifizierung der präneoplastischen Leberzellherde zeigten dagegen durchaus eine Beeinflussung unter polyaminreduzierter, antibiotikahaltiger Nahrung. 14 Wochen nach NNM-Gabe traten in der PAD-Gruppe mehr Foci mit einer geringen Häufigkeit auf, als dies unter Standardkost der Fall war (*Diagramm 15*), was für eine zeitlich verzögerte Durchsetzung des Lebergewebes mit präneoplastischen Herden spricht. In der exemplarischen Betrachtung der mit einer mittleren Häufigkeit auftretenden präneoplastischen Herde wies 10 Wochen nach NNM-Gabe bei den PAD-Tieren ein weitaus größerer Anteil der Foci noch initiale klarzellige oder azidophilzellige Eigenschaften auf, als unter Standardkost (*Diagramm 16*). Späte basophilzellige Foci, die unter Standardkost zu diesem Zeitpunkt bereits einen Anteil von 9 % einnahmen, traten überhaupt nicht auf. Erst 14 Wochen

DISKUSSION

nach NNM-Gabe zeigten die präneoplastischen Herde der PAD-Gruppe eine Verteilung der histologischen Eigenschaften, wie sie unter Standardkost bereits nach 10 Wochen zu beobachten war. Demzufolge ist neben der Ausbreitung möglicherweise auch die histologische Progrezienz der Foci unter polyaminreduzierter, antibiotikahaltiger Kost verzögert.

Der nach 10 Wochen im Vergleich zur Standardkostgruppe unauffällige Anteil an einem Angiosarkom erkrankter Tiere stieg unter polyaminreduzierter und antibiotikahaltiger Kost 14 Wochen nach NNM-Gabe auf den im Gruppenvergleich höchsten Wert an (*Diagramm 7 und 8*). Eine statistisch signifikante Differenz wurde allerdings nicht ermittelt, sodass es sich hierbei – vor allem auch angesichts der aus der Literatur bekannten tumorinhibierenden Wirkung einer polyaminreduzierten und antibiotikahaltigen Kost – vermutlich um ein aufgrund der niedrigen Fallzahlen fälschlicherweise entstandenes Ergebnis hält.

Cholangiozelluläre Adenome traten 10 Wochen nach Absetzen des Karzinogens ausschließlich bei Tieren der PAD-Gruppe und der DFMO-Gruppe auf, während Standardkosttiere und PRD-Tiere erst nach 14 Wochen Adenome der Gallengänge ausbildeten (*Diagramm 7 und 8*). Eine Erklärung hierfür kann diese Arbeit mit insgesamt nur sehr wenigen diagnostizierten cholangiozellulären Veränderungen nicht bieten – zumal nach 14 Wochen gegenüber den anderen Versuchsgruppen in der Erkrankungsrate kein nennenswerter Unterschied mehr zu erkennen war. Hinsichtlich der Entstehung cholangiozellulärer Karzinome können gleichfalls keine Aussagen getroffen werden, da dieser Befund insgesamt nur bei einem einzigen Tier diagnostiziert wurde. Vermutlich müssten zur Klärung einer Einflussnahme auf die Gallengangskarzinomentstehung spätere Untersuchungszeitpunkte gewählt werden.

Bezogen auf die Fragestellung einer Tumoringhibition durch die Reduzierung der enteralen Polyaminaufnahme lässt sich zusammenfassen, dass die Entstehung der adenomatösen und karzinomatösen hepatozellulären Veränderungen initial verzögert werden konnte. Mit fortschreitender Tumorgenese ließ sich dieser Effekt zwar anhand der quantitativen Tumorauswertung nicht mehr nachvollziehen, die histologische Auswertung präneoplastischer und karzinomatöser Prozesse zeigte allerdings in Form von vergleichsweise weniger weit fortgeschrittenen Zellstadien bzw. niedrigeren Malignitätsgraden weiterhin einen unter PAD abgeschwächten Karzinogeneseverlauf.

Die von Löser et al. unter polyaminreduzierter und antibiotikahaltiger Kost beobachtete hochsignifikante Hemmung der DMH-induzierten Kolonkarzinogenese (*Löser et al., 1998*) findet

sich damit in der Auswertung der Leberveränderungen allenfalls in Tendenzen wieder. Folglich spielen die luminalen Polyamine, die als lokaler Faktor direkten Kontakt zur Mukosazelle haben, in der Kolonkarzinogenese eine wesentlich bedeutendere Rolle, als bei Karzinogenese-prozessen des nicht-intestinalen Lebergewebes, dem langfristig der effektive Ausgleich des exogenen enteralen Polyamindefizits zu gelingen scheint. Die maßgebliche Funktion der luminalen Polyamine als lokaler wachstumsinduzierender Faktor wurde von Löser et al. bereits 1999 beschrieben. Während in diesen Versuchen mit der 6monatigen Verabreichung einer polyaminreduzierten und antibiotikahaltigen Diät in Dünndarm und Kolon eine signifikante Abnahme des Organgewichts erzielt werden konnte, zeigte das Gewicht der Leber keine Beeinflussung (Löser et al., 1999). Exemplarisch für ein weiteres nicht-intestinales Gewebe bestätigen in der vorliegenden Arbeit die unter polyaminarmer und antibiotikahaltiger Kost nicht unterschiedlichen Organgewichte der Nieren diese Beobachtung (Diagramm 4).

4.1.2 Reduzierung der exogenen enteralen Polyamine unter gleichzeitig inhibierter intrazellulärer Polyamin de novo-Synthese

Die selektive Inhibition der intrazellulären Polyamin de novo-Synthese durch α -Difluoromethylornithin (DFMO) führte in der Literatur bereits in mehreren Tumormodellen zu einer hocheffektiven Inhibition der Tumorgenese (Kingsnorth et al., 1983; Luk et al., 1989). In der vorliegenden Studie wurde am Modell von NNM-induzierten Lebertumoren der spezifische ODC-Inhibitor mit einer polyaminreduzierten und antibiotikahaltigen Kost kombiniert, um eine experimentell bestmögliche Polyaminreduktion zu erreichen.

Wie die prozentualen Anteile der erkrankten Kurzzeit- und Langzeittiere zeigen (Diagramm 7 und 8), war das allgemeine Risiko einer Tumorausbildung unter polyaminreduzierter, antibiotikahaltiger Kost mit zusätzlich verabreichtem DFMO gegenüber der Standardkostgruppe (wie auch der PAD-Gruppe und der PRD-Gruppe) deutlich und nach 14 Wochen sogar signifikant reduziert ($p < 0,05$). Die differenzierte Betrachtung hepatozellulärer Karzinome und Adenome bestätigten dieses Ergebnis in der Auswertung sowohl der prozentualen Anteile betroffener Tiere (Diagramm 7 und 8) als auch der Gesamtzahlen und der pro-Kopf-Zahlen (Diagramm 9 bis 12). Signifikant war die reduzierende Wirkung von DFMO dabei bzgl. des prozentualen Auftretens von an einem hepatozellulären Karzinom erkrankten Tieren 14 Wochen nach NNM-Gabe gegenüber PAD-Tieren und PRD-Tieren ($p < 0,05$) (Diagramm 8). Gegenüber den Standardkosttieren konnte die HCC-Inzidenz „tendenziell signifikant“ gesenkt

DISKUSSION

werden ($p < 0,1$). Ebenfalls signifikant reduziert waren 14 Wochen nach NNM-Gabe im Vergleich von DFMO-Tieren und PRD-Tieren die Gesamtzahl und die pro-Kopf-Zahl hepatozellulärer Karzinome ($p < 0,05$) (*Diagramm 9 und 11*), wobei die reduzierte Anzahl der hepatozellulären Karzinome pro Tier auf eine inhibierte intrahepatische Metastasierung der malignen Veränderungen hinweist.

Weitere Befunde wie der Malignitätsgrad und der Größenvergleich der hepatozellulären Karzinome oder auch die Häufigkeit und histologische Auswertung der präneoplastischen Zellherde liefern zusätzliche Hinweise auf eine wachstums- und entwicklungsverzögernde Potenz der NNM-induzierten Leberkarzinogenese unter ODC-Inhibitor. Unter PAD plus DFMO entstehende hepatozelluläre Karzinome waren nach 14 Wochen überwiegend niedrig malignen G1-Karzinomen zuzuordnen. Es traten nur wenige G2-Karzinome auf und entgegen allen anderen Ernährungsgruppen wurde kein einziger hochmaligner G3-Tumor ausgebildet (*Diagramm 13*). Die im Vergleich der Standardkost-, PAD- und PRD-Tiere etwa gleich ausfallende Größe der Leberzellkarzinome lag unter der zusätzlichen Verabreichung von DFMO deutlich unter dem Durchschnittswert (*Diagramm 14*), was ebenfalls auf eine wachstumsverzögernde Wirkung einer Reduktion des luminalen Polyaminpools hinweist.

Die präneoplastischen Leberzellherde wurden nach 10 und 14 Wochen bereits in einem recht späten Entwicklungsstadium erfasst, was unter anderem daran erkennbar ist, dass ausnahmslos alle Versuchstiere – selbst unter DFMO – diese initialen Leberzellveränderungen aufwiesen (*Diagramm 7 und 8*). Als Ausdruck einer verzögerten Ausbreitung war der Anteil multipel auftretender Foci unter PAD plus DFMO sowohl nach 10 als auch nach 14 Wochen gegenüber den anderen Versuchsgruppen deutlich reduziert (*Diagramm 15*). Gleichzeitig lag unter PAD plus DFMO nach 14 Wochen noch der höchste Anteil an mit einer geringen Häufigkeit auftretenden Foci vor.

Im Vergleich der mit einer mittleren Häufigkeit auftretenden Foci zeigte sich unter zusätzlich verabreichtem DFMO eine noch deutlicher verzögerte histologische Progredienz, als unter der alleinigen Reduzierung exogener enteraler Polyamine (*Diagramm 16*). Späte basophilzellige Foci traten bei DFMO-Tieren zu keinem der untersuchten Zeitpunkte auf und auch 14 Wochen nach NNM-Gabe wies ein gegenüber den anderen Versuchsgruppen deutlich überwiegender Teil der präneoplastischen Herde noch initiale klarzellige Eigenschaften auf.

DISKUSSION

Angiosarkome wurden im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen weder bei den Kurzzeit- noch bei den Langzeit-DFMO-Tieren diagnostiziert (*Diagramm 7 und 8*). Demzufolge scheint DFMO die Ausbildung von Angiosarkomen zumindest 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe komplett, und damit noch effektiver zu inhibieren, als die Entstehung hepatozellulärer Veränderungen. Die Ursache einer solchen verschieden stark ausgeprägten DFMO-Wirkung könnte in den unterschiedlichen Ausgangsgewebearten (Gefäßendothelzellen und Leberzellen) mit einer jeweils spezifischen intrazellulären DFMO-Akkumulation oder -Sensitivität liegen. Inwieweit allerdings die Ausbildung von Angiosarkomen tatsächlich komplett inhibiert oder aber nur verzögert wurde, ist anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht hinreichend belegt. Möglicherweise sind die Untersuchungszeitpunkte 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe in Bezug auf eine Angiosarkomentstehung unter DFMO lediglich zu früh gewählt. Darüber hinaus würden zuverlässige Aussagen über eine DFMO-vermittelte Beeinflussung der Angiosarkomkarzinogenese größere Fallzahlen erfordern.

Zusammengefasst führte die Kombination eines reduzierten luminal enteralen Polyaminvorkommens mit der DFMO-induzierten Inhibition der intrazellulären Polyaminproduktion zu einer deutlichen und teilweise signifikanten Reduzierung der Tumorentstehung und Entwicklung. Hierbei waren in der Leberzellkarzinombetrachtung nicht nur das Erkrankungsrisiko und die Tendenz zur intrahepatischen Metastasierung teilweise signifikant gesenkt, die entstehenden Karzinome wiesen auch kleinere Durchmesser und vergleichsweise geringgradig maligne Zellveränderungen auf. Die Ausbildung hepatozellulärer Adenome und das Auftreten prä-neoplastischer Leberzellherde zeigten sich ebenfalls deutlich, wenn auch nicht signifikant, vermindert. Darüber hinaus waren die prä-neoplastischen Leberzellherde in ihren histologischen Eigenschaften weniger weit fortgeschritten. Diese Effekte wurden durch die alleinige Reduzierung der exogenen enteralen Polyamine zum Teil nur initial und ohne signifikante Veränderungen erzielt. Die intrahepatische Metastasierung und der Durchmesser der Leberzellkarzinome zeigten bei den PAD-Tieren überdies gar keine Beeinflussung. Zwar lässt diese Arbeit keine Aussage darüber zu, inwieweit die Ergebnisse der mit einer polyaminreduzierten und antibiotikahaltigen Kost kombinierten DFMO-Medikation auch durch die alleinige Verabreichung des ODC-Inhibitors erzielt worden wären, da eine Kontrollgruppe mit alleiniger DFMO-Medikation hier nicht untersucht wurde, Ergebnisse aus der Literatur legen allerdings die Annahme nahe, dass sich die Kombination der beiden Methoden zur Polyaminreduzierung

DISKUSSION

effektiver auf die Tumorentstehung auswirkt (Sarhan et al., 1989; Moulinoux et al., 1991; Löser et al., 1998).

Offensichtlich ist der luminal enterale Polyaminpool bei der Entstehung von Darmtumoren von erheblich größerer Relevanz. Für die Leberkarzinogenese scheint die Hemmung der Polyamin de novo-Synthese einen weit wichtigeren Effekt auf die Entstehung von Tumoren zu haben, was aus dem Vergleich der beiden Versuchsgruppen PAD und DFMO ersichtlich wurde. Wie bereits ausgeführt hat die alleinige Gabe einer polyaminreduzierten, antibiotikahaltigen Kost nur einen geringen bzw. eher verzögernden Einfluss auf die Ausbildung von NNM-induzierten Lebertumoren, während die gleichzeitige Hemmung der intrazellulären Polyamin de novo-Synthese durch DFMO zusätzlich erhebliche und messbar signifikante inhibierende Effekte aufweist.

Während luminal enterale Polyamine für die Leberkarzinogenese also nur eine unscheinbare Rolle zu spielen scheinen, kommt der intrazellulären de novo-Synthese bzw. der nachhaltigen Hemmung von ODC und intrazellulären Putrescin- und Spermidinkonzentrationen eine wichtige Rolle zu.

4.1.3 Erhöhte Zufuhr nahrungsgebundener Polyamine unter inhibierter oxidativer Degradation von intrazellulären Polyaminen

Eine induzierte Erhöhung des enteralen Polyaminangebots sollte klären, inwieweit der beobachtete tumorverzögernde Effekt unter Polyaminreduktion den Umkehrschluss auf eine karzinogenesefördernde Eigenschaft der durch die Nahrung zugeführten Polyamine zulässt. Dazu wurde einerseits die exogene enterale Polyaminzufuhr in Form eines polyaminangereicherten Futters erhöht und andererseits auf zellulärer Ebene mittels Aminoguanidin der Polyamin- bzw. insbesondere der Putrescinabbau als Kompensationsmöglichkeit bei erhöhten intrazellulären Polyaminkonzentrationen gehemmt. Tatsächlich war unter polyaminreicher Kost der Anteil der an einem Leberzellkarzinom erkrankten Tiere 14 Wochen nach Absetzen des Karzinogens gegenüber den Standardkosttieren tendenziell erhöht (Diagramm 8). Gegenüber den Tieren der DFMO-Gruppe war diese Erhöhung signifikant ($p < 0,05$). Der Anteil der PRD-Tiere mit ausgebildetem Leberzelladenom lag nach 14 Wochen allerdings unter den Ergebnissen der Standardkostgruppe und sogar unter den Werten der Tiere mit polyaminarmer Kost. Vor dem Hintergrund der hohen Karzinomzahlen ist dies am ehesten als Ausdruck eines mög-

DISKUSSION

licherweise durch Polyamine beschleunigten Übergangs von adenomatösen in karzinomatöse Veränderungen zu interpretieren.

Die Auswertung der Gesamtzahlen und der pro-Kopf-Zahlen entstehender Karzinome und Adenome bestätigte die Annahme eines tumorfördernden Einflusses des erhöhten Polyaminangebots. 14 Wochen nach NNM erreichten die Tiere mit polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin nach einem gegenüber den anderen Versuchsgruppen beschleunigten Anstieg der insgesamt sowie der pro Tier diagnostizierten hepatozellulären Karzinome jeweils die höchsten gemessenen Ergebnisse (*Diagramm 9 und 11*). Gegenüber den DFMO-Tieren war diese Steigerung signifikant ($p < 0,05$). Pro-Kopf-Zahl und Gesamtzahl der hepatozellulären Adenome lagen bei den Tieren der PRD-Gruppe bereits nach 10 Wochen deutlich über den entsprechenden Werten der anderen Versuchsgruppen (*Diagramm 10 und 12*). Zwischen der 10. und 14. Woche erfolgte kein weiterer Anstieg der Adenomhäufigkeit. Auch hier ist vermutlich eine vermehrte Entwicklung von prämaligen adenomatösen in maligne karzinomatöse Prozesse als ursächlich zu betrachten.

In der histologischen Auswertung der hepatozellulären Karzinome war ebenfalls eine progredienzfördernde Beeinflussung durch das erhöhte Polyaminangebot erkennbar (*Diagramm 13*). Der Anteil hochmaligner G3-Karzinome überstieg unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin deutlich die Ergebnisse der anderen Versuchsgruppen, was eine beschleunigende Wirkung auf den Übergang in höher maligne Befunde nahe legt. Dagegen zeigte sich – abgesehen von dem einmalig diagnostizierten Karzinomdurchmesser von 6,5 cm – die Größe der ausgebildeten Leberzellkarzinome im Vergleich zu den Standardkosttieren und PAD-Tieren nicht beeinflusst (*Diagramm 14*).

Wie in allen anderen Versuchsgruppen wiesen 10 und 14 Wochen nach NNM auch unter polyaminreicher Kost jeweils 100% der Tiere präneoplastische Hepatozytenherde auf (*Diagramm 7 und 8*). Die Ausbreitung der präneoplastischen Herde stellte sich hier allerdings gegenüber den anderen Versuchsgruppen leicht beschleunigt dar, was der 10 Wochen nach NNM-Gabe vergleichsweise hohe Anteil an multipel auftretenden Foci verdeutlichte (*Diagramm 15*). Der Rückgang der multipel auftretenden Foci zwischen der 10. und 14. Woche, der in diesem deutlichen Ausmaß nur bei PRD-Tieren beobachtet wurde, könnte auf einen gegenüber den anderen Gruppen vorzeitig erfolgten Übergang der Foci in höhermaligne, adenomatöse Prozesse zurückgeführt werden. Die histologische Auswertung der mit einer middle-

DISKUSSION

ren Häufigkeit auftretenden Foci bestätigte die Vermutung einer beschleunigten Progredienz. 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe überstieg der Anteil später basophilzelliger Veränderungen deutlich die Ergebnisse der anderen Versuchsgruppen (*Diagramm 16*).

Angiosarkome zeigten in der Versuchsgruppe mit polyaminreicher Kost und Aminoguanidin 10 und 14 Wochen nach NNM gegenüber den Standardkosttieren ein vermehrtes Auftreten (*Diagramm 7 und 8*). Allerdings wurde dieses Ergebnis 14 Wochen nach NNM von den PAD-Tieren mit polyaminreduzierter, antibiotikahaltiger Kost noch übertroffen. Hierfür bietet die Annahme einer Tumorförderung unter polyaminreicher und einer Tumorinhibition unter polyaminarmer Kost keine Erklärung, wobei die insgesamt sehr niedrigen Fallzahlen diagnostizierter Angiosarkome und die damit reduzierte statistische Aussagekraft berücksichtigt werden müssen.

Unter den PRD-Tieren wurden zu keinem Zeitpunkt des Versuchs cholangiozelluläre Karzinome diagnostiziert (*Diagramm 7 und 8*). Das einzige Gallengangskarzinom trat 10 Wochen nach NNM bei einem Standardkosttier auf. Die Ausbildung cholangiozellulärer Adenome wurde durch die vermehrte exogene enterale Polyaminzufuhr ebenfalls nicht erkennbar gefördert. Allerdings sind auch hier die sehr niedrigen Fallzahlen zu berücksichtigen.

Zusammengefasst sprechen das vermehrte und höhermaligne Auftreten hepatozellulärer Karzinome sowie die beschleunigte Ausbreitung und histologische Progredienz präneoplastischer Leberzellherde für eine tumorfördernde Potenz der polyaminangereicherten Nahrung bei zeitgleicher Reduktion der oxidativen Degradation intrazellulärer Polyamine. Dabei stellt sich die Frage, welche Bedeutung dem erhöhten Angebot an exogenen enteralen Nahrungspolyaminen einerseits bzw. der teilweisen Reduktion des zelleigenen Kompensationsmechanismus zur Konstanthaltung der intrazellulären Polyaminkonzentration andererseits zukommt, was aufgrund der hier gewählten Gruppeneinteilungen nicht beurteilt werden kann. Hieraus könnten sich nicht zuletzt für ernährungswissenschaftliche Ansätze in der Tumorprävention und -therapie interessante Aspekte ergeben (*Linsalata und Russo, 2008*).

4.2 Auswirkungen eines veränderten Polyaminhaushalts auf intrazelluläre Regulationsmechanismen

Welche maßgeblichen Faktoren dem Einfluss des Polyaminhaushalts auf Initiierung und Wachstum von Tumoren zugrunde liegen, wurde vielfach untersucht und diskutiert. Biochemische Gewebeanalysen im Rahmen verschiedener Tumormodelle ergaben, dass die an der Tumorinduktion entscheidend beteiligten Faktoren in der intrazellulären Aktivierung der Ornithindecarboxylase (ODC) und der konsekutiv vermehrten intrazellulären Bildung von Putrescin bestehen (*Pegg und Mc Cann, 1982; Löser et al., 1995*). Beispielsweise stellten Ball et al. nach Gabe des Kolonkarzinogens 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) eine karzinogenstimulierte ODC-Erhöhung in der Kolonmukosa fest. Desgleichen führte das leberspezifische Karzinogen Acetylaminofluoron zu einer gesteigerten ODC-Aktivität im Lebergewebe (*Ball et al., 1976*). Neben einer verstärkten Polyamin de novo-Synthese kommt es im Verlauf der Tumorgenese auch zu einer Induktion der SAT-Aktivität und damit zu einer Aktivierung des Interkonversionsstoffwechsels. Matsui und Pegg beobachteten diesen Mechanismus im Lebergewebe von Ratten nach Applikation der Leberkarzinogene Dimethylnitrosamin und Diethylnitrosamin (*Matsui und Pegg 1982*). Dass die karzinogenvermittelte Beeinflussung des Polyaminstoffwechsels in verschiedenen Organen über unterschiedliche Mechanismen erfolgen kann, wiesen Löser et al. nach, indem sie Gewebeproben von proximalem und distalem Kolon, Dünndarm, Leber und Pancreas nach DMH-Applikation analysierten (*Löser et al., 1996*).

Inwieweit sich Eingriffe in den Polyaminhaushalt – nämlich eine Reduktion des exogenen enteralen bzw. des intrazellulären Polyaminpools oder aber eine vermehrte exogene enterale Polyaminzufuhr – auf einzelne Parameter des Polyaminstoffwechsels und damit auch auf die am Karzinogeneseprozess beteiligten Faktoren auswirken, soll im folgenden Kapitel diskutiert werden.

4.2.1 Reduzierung der exogenen enteralen Polyamine

Mit der Verabreichung einer polyaminreduzierten und antibiotikahaltigen Diät konnten Löser et al. am DMH-Modell den Polyaminhaushalt der Versuchstiere so maßgeblich beeinflussen, dass sie eine ebenso hochsignifikante Hemmung der Kolonkarzinogenese erzielten wie unter der DFMO-vermittelten Reduzierung der Polyamin de novo-Synthese (*Löser et al., 1998*).

DISKUSSION

Durch Übertragung dieser Methode eines verminderten enteralen Polyaminangebotes auf das Modell der NNM-induzierten Leberkarzinogenese sollte untersucht werden, ob sich die alleinige Reduzierung der enteral aufgenommenen Polyamine auf den Polyaminstoffwechsel des Hepatozyten bzw. der Nierenzelle, die keinen unmittelbaren Kontakt zu den Nahrungspolyaminen haben und nicht auch direkt von luminal versorgt werden, ebenso nachhaltig auswirkt. Diese Arbeit zeigt, dass als einziger signifikanter Effekt der polyaminarmen und antibiotikahaltigen Diät eine Absenkung des intrazellulären Spermidinspiegels in Hepatozyten zu beobachten war (*Diagramm 21*). Die Konzentrationen von Spermin und Putrescin wurden dagegen nicht relevant verändert. In der Niere ergaben sich für den intrazellulären Polyaminhaushalt im Vergleich zu den Ergebnissen unter Standardkost überhaupt keine maßgeblichen Veränderungen.

Als Folge der verminderten enteralen Polyaminzufuhr ist möglicherweise eine reflektorische Aktivierung der intrazellulären Polyamin de novo-Synthese zu erwarten. Dies würde sich in einem Anstieg der Ornithindecaboxylase äußern, wie er allerdings in nicht-karzinomatösem Lebergewebe weder 10 noch 14 Wochen nach NNM-Gabe auftrat (*Diagramm 17*). Vielmehr zeigte sich der ODC-Wert nach 10 Wochen in normalem Lebergewebe gesunder und karzinomerkrankter Tiere gegenüber den Standardkostergebnissen sogar etwas erniedrigt. Eine Putrescinkonzentration war zu diesem Zeitpunkt nicht messbar (*Diagramm 20*). 14 Wochen nach NNM-Gabe ergaben sich im Vergleich von PAD- und SK-Tieren bzgl. ODC und Putrescin keine Unterschiede mehr, sodass zu diesem Zeitpunkt scheinbar ein ODC-vermittelter Ausgleich des verringerten Putrescinspiegels stattgefunden hatte. Diese Beobachtungen basieren auf einer geringen Anzahl verwertbarer ODC- und Putrescin-Messungen und sind nicht signifikant, sie stehen aber im Einklang mit den Ergebnissen der Tumorauswertung. Hier wurde nach 10 Wochen eine tumorhemmende Wirkung der polyaminarmen und antibiotikahaltigen Kost festgestellt, die 14 Wochen nach NNM-Gabe nicht mehr erkennbar war.

Die S-Adenosyl-Methionindecaboxylase (SAM-DC) zeigte unter polyaminarmer, antibiotikahaltiger Nahrung in unauffälligem Lebergewebe gesunder und karzinomerkrankter Tiere gegenüber der Standardkostgruppe 10 und 14 Wochen nach NNM keine relevanten Veränderungen (*Diagramm 18*). Das unter Aktivierung der SAM-DC entstehende und maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Zellwachstums beteiligte Polyamin Spermidin (*Kramer et al., 1989; Regenass et al., 1994; Löser et al., 1997 a und c*) war allerdings sowohl 10 als auch 14 Wochen nach NNM gegenüber den Standardkosttieren teilweise signifikant reduziert (*Dia-*

DISKUSSION

gramm 21), wogegen die Sperminmessungen im Vergleich zur Standardkost keine Unterschiede aufwiesen (Diagramm 22). Eine angesichts des reduzierten Spermidinwertes zu erwartende relevante SAM-DC-Aktivierung konnte nicht nachgewiesen werden (Diagramm 18). Vielmehr zeigte sich die SAM-DC-Konzentration nicht verändert. Einen Erklärungsansatz bieten eventuell die Studien von Halline et al. Sie stellten eine unterschiedliche Induzierbarkeit der SAM-DC in verschiedenen Organgeweben fest. Nach der Verabreichung von DFMO beobachteten sie ausschließlich in der Dünndarmmukosa einen signifikanten Anstieg der SAM-DC, wogegen eine SAM-DC-Erhöhung in den Zellen der Kolonschleimhaut ausblieb. Hieraus folgerten sie das Vorliegen der SAM-DC in Form verschiedener organspezifischer Isoenzyme mit abweichenden Eigenschaften (Halline et al., 1989 a). Zwar lag den Ergebnissen von Halline et al. eine DFMO-induzierte Inhibierung des intrazellulären Polyaminstoffwechsels zugrunde, unterschiedliche isoenzymspezifische Reaktionen auf eine Reduktion des exogenen enteralen Polyaminangebots sind aber sicher ebenso denkbar.

Unabhängig von diesem Erklärungsansatz ist zu berücksichtigen, dass die hier vorliegenden Enzymmessungen eine Einzeitpunktanalyse 10 bzw. 14 Wochen nach Beenden der 10wöchigen Karzinogenexposition darstellen. Die verschiedenen Schritte der schnellen und sehr komplexen Enzymregulation können zu diesem einzelnen Zeitpunkt nicht alle erfasst werden und waren möglicherweise zu früheren Zeitpunkten vorhanden. Löser et al. stellten beispielsweise nach 6monatiger Verabreichung einer polyaminreduzierten Kost mit und auch ohne Antibiotikazusatz überhaupt keine signifikanten Veränderungen der intrazellulären Enzym- und Polyaminkonzentrationen in der Leber fest (Löser et al., 1999).

Neben einer verstärkten SAM-DC Aktivität besteht zum Ausgleich eines reduzierten Spermidinspiegels auch die Möglichkeit, in der Zelle vorhandenes Spermin dem Interkonversionsstoffwechsel zuzuführen und in Spermidin umzusetzen (Bolkenius und Seiler, 1987). Katalysierendes Enzym ist hierbei die Spermidin-/Spermin-N₁-Acetyltransferase (SAT), die in den vorliegenden Ergebnissen allerdings ebenfalls keine Anzeichen einer verstärkten Aktivierung zeigte – 14 Wochen nach NNM war sie sogar gegenüber dem nicht-karzinomatösen Lebergewebe der Standardkosttiere erniedrigt (Diagramm 19). Aus welchem Grund zum Zeitpunkt der Untersuchung trotz des nachweislich signifikant verringerten Spermidinspiegels und einer jedenfalls zu diesem Zeitpunkt ausbleibenden SAM-DC-Induktion keine Spermidinproduktion über den Interkonversionsstoffwechsel beobachtet werden konnte, bleibt unklar. Allerdings sind organspezifisch uneinheitliche Reaktionen der SAT-Aktivität und des Interkonversions-

DISKUSSION

stoffwechsels infolge einer Hemmung der Putrescin de novo-Synthese aus der Literatur bekannt (*Manni et al., 1995*).

Die Putrescinkonzentrationen im Nierengewebe ließen unter polyaminarmer und antibiotikahaltiger Kost zu keinem Zeitpunkt gegenüber den Standardkostwerten eine Reduzierung erkennen (*Diagramm 28*). Diesem offensichtlich stattgefundenen Ausgleich der Reduktion des luminal enteralen Putrescinpools konnte 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe allenfalls eine teilweise angedeutete ODC-Erhöhung zugeordnet werden (*Diagramm 25*). Der Putrescinausgleich in den Nierenzellen ließ sich damit 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe nicht auf eine maßgeblich verstärkte intrazelluläre de novo-Synthese zurückführen.

Gleiches gilt für die Polyamine Spermidin und Spermin, die trotz nicht erhöhter SAM-DC-Aktivität den Standardkostergebnissen entsprachen (*Diagramm 26, 29 und 30*). Auffälligerweise trat der in nicht-karzinomatösem Lebergewebe diagnostizierte reduzierte Spermidin Spiegel in der Niere nicht auf. Angesichts der gegenüber Standardkostbedingungen eher erniedrigten SAT-Aktivität (*Diagramm 27*) scheint eine zu den Untersuchungszeitpunkten verstärkte Aktivierung des Interkonversionsstoffwechsels als Ursache des Spermidin-ausgleichs fraglich. Eventuell fand die SAT-Erhöhung vor dem Zeitpunkt der Enzymanalyse statt. Eine weitere Erklärung bietet die 2002 durch Niiranen et al. beschriebene Sperminoxidase (SMO), die in embryonalen Stammzellen eine nicht SAT-vermittelte Konversion von Spermin in Spermidin katalysiert (*Niiranen et al., 2002*). Für den Ausgleich des Spermidindefizits könnte demnach in der Nierenzelle unter Umgehung des SAT-vermittelten Interkonversionsstoffwechsels ein SMO-vermittelter Sperminumbau verantwortlich sein.

Die Auswertung der hepatozellulären Karzinome ergab unter PAD eine gegenüber unauffälligem Lebergewebe 14 Wochen nach NNM-Gabe sogar signifikante ODC-Erhöhung, die auch in den karzinomatösen Gewebeproben der anderen Versuchsgruppen teilweise signifikant vorlag (*Diagramm 17*). Sie ist am ehesten auf die induzierten Wachstumsvorgänge zurückzuführen und damit auch unter einer reduzierten exogenen enteralen Polyaminzufuhr nicht als reflektorischer Anstieg zu betrachten. Dementsprechend ergab auch der Vergleich mit den Karzinomergebnissen unter Standardkost keine signifikanten Unterschiede. Erwartungsgemäß war infolge der gesteigerten ODC-Aktivität nach 14 Wochen in Karzinomgewebe unter PAD wie auch unter Standardkost eine im Vergleich zu unauffälligem Lebergewebe erkennbare Erhöhung der Putrescinkonzentration messbar, die innerhalb der Standardkostgruppe und der

PRD-Gruppe signifikant ausfiel (*Diagramm 20*). Eine gesteigerte ODC-Aktivität und hohe Putrescinwerte sind aus der Literatur als typische Veränderungen des Polyaminhaushalts in karzinomatösem Gewebe bekannt (*Rozhin et al., 1984; La Muraglia et al., 1986*). Weniger einheitlich sind dagegen die Literaturangaben bezüglich der SAM-DC-Aktivität in neoplastischen Zellen. Verschiedene Autoren konnten bei Patienten mit Kolonkarzinomen erhöhte SAM-DC-Werte nachweisen (*Porter et al., 1987; Herrera-Ornelas et al., 1987*) und auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich die Aktivität der SAM-DC in hepatozellulären Karzinomen der PAD-Tiere und der SK-Tiere gegenüber unverändertem Lebergewebe signifikant gesteigert (*Diagramm 18*). Der Vergleich zwischen Standardkost- und PAD-Tieren ergab keine Auffälligkeiten, sodass entsprechend der ODC-Erhöhung entkoppelte karzinomatöse Wachstumsvorgänge als ursächlich angenommen werden können.

Spermidin und Spermin waren im Karzinomgewebe der PAD-Tiere 10 Wochen nach NNM-Gabe gegenüber unverändertem Leberparenchym signifikant reduziert (*Diagramm 21 und 22*). Nach 14 Wochen zeigten sich diese Unterschiede ausgeglichen. Neben der bereits erwähnten SAM-DC-Erhöhung ist hierfür vermutlich auch ein aktivierter Interkonversionsstoffwechsel verantwortlich, der einhergehend mit malignen Wachstumsprozessen Ausdruck eines erhöhten Zellumsatzes ist und auf den die 10 Wochen nach NNM deutlich erhöhte SAT-Aktivität hinweisen könnte (*Diagramm 19*). Bestätigt wird diese Annahme durch Claverie et al. Sie hemmten die intrazelluläre Polyamin de novo-Synthese in Tumorzellen und stellten fest, dass das so entstandene Polyamindefizit durch im Interkonversionsstoffwechsel gebildete Polyamine ausgeglichen wurde (*Claverie et al., 1987*).

4.2.2 Reduzierung der exogenen enteralen Polyamine unter gleichzeitig inhibierter intrazellulärer Polyamin de novo-Synthese

In früheren Studien führte die Applikation von α -Difluoromethylornithin (DFMO) zu einer Reduktion der intrazellulären ODC-, Putrescin- und Spermidinkonzentration, während die Sperminkonzentration erhöht wurde oder unbeeinflusst blieb (*Kingsnorth et al., 1983; Dorhout et al., 1995 b*). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Beobachtungen. Infolge der DFMO-vermittelten Inhibition war die ODC-Aktivität in gesundem Leber- und Nierengewebe gegenüber den Ergebnissen unter Standardkost sowie unter polyaminreduzierter, antibiotikahaltiger Diät vermindert, wobei allerdings nur in der Niere signifikante Unterschiede erfasst werden konnten (*Diagramm 17 und 25*). Eventuell erfolgten Aufnahme und Anreiche-

DISKUSSION

rung des ODC-Inhibitors in Nierenzellen besser als in Leberzellen, was eine gewebeabhängig unterschiedlich starke Wirksamkeit erklären könnte. Entsprechend der niedrigen ODC-Aktivität und der verminderten Polyaminzufuhr lagen auch die Putrescinwerte bis auf wenige Einzelmessungen sowohl 10 als auch 14 Wochen nach NNM in Leber und Niere unterhalb der Nachweisgrenze (*Diagramm 20 und 28*).

Die Aktivität der SAM-DC lag in normalen Leber- und Nierenzellen über den Ergebnissen der SK- und PAD-Gruppen (*Diagramm 18 und 26*), wobei allerdings keine signifikanten Unterschiede erreicht wurden. Eine Aktivierung der SAM-DC als Reaktion auf eine DFMO-verursachte ODC-Inhibition ist aus der Literatur bekannt und wird im Sinne eines Kompensationsmechanismus der Zelle interpretiert (*Pegg und Mc Cann, 1982; Tabor und Tabor, 1984*).

Spermidin- und Sperminkonzentrationen verhielten sich mit zusätzlich verabreichtem DFMO in Leber- und Nierengewebe entsprechend den Ergebnissen unter einer alleinigen Reduktion der exogenen enteralen Polyamine. Bei normalen bis angedeutet erhöhten Sperminspiegeln zeigten sich die Spermidinkonzentrationen im Vergleich zur Standardkostgruppe tendenziell reduziert (*Diagramm 21 und 22 bzw. 29 und 30*). Wie bereits in der PAD-Gruppe fand auch hier angesichts des reduzierten Spermidinspiegels 10 und 14 Wochen nach NNM-Gabe keine Aktivierung des Interkonversionsstoffwechsels statt, was die unauffälligen bzw. tendenziell reduzierten SAT-Messungen zeigten (*Diagramm 19 und 27*). Der unter DFMO nur leicht reduzierte und somit offensichtlich teilweise ausgeglichene Spermidinspiegel könnte eventuell – wie bereits in Kapitel 4.1.1 erläutert – unter Umgehung der SAT auf die Aktivierung der Sperminoxidase zurückzuführen sein.

Die biochemischen Gewebeanalysen karzinomatös veränderter Leberzellen sind in der Gruppe der DFMO-Tiere unter dem Aspekt zu betrachten, dass sich aufgrund der nur wenigen und sehr kleinen makroskopisch als karzinomatös eingestuften Befunde die Isolierung rein karzinomatösen Gewebes als schwierig erwies. Gleichzeitig ist davon auszugehen, dass in den sehr weit fortgeschrittenen Karzinomen der Vergleichsgruppen SK und PRD teilweise nekrotische Gewebeabschnitte vorlagen, weshalb diese Ergebnisse eine große Streuung aufwiesen. Die hieraus resultierenden hohen Standardabweichungen erschweren die statistische Auswertung und den Nachweis von signifikanten Unterschieden.

Die ODC-Aktivität in den karzinomatösen Gewebeproben der Langzeit-DFMO-Tiere lag, wie bereits in Kapitel 4.2.1 ausgeführt, auch unter DFMO-vermittelter Inhibition deutlich über

dem Niveau gesunder Gewebeproben (*Diagramm 17*). Im Vergleich zu den Karzinomergebnissen der SK- und PAD-Gruppe war der ODC-Spiegel allerdings tendenziell erniedrigt. Ein Putrescinspiegel war infolge der ODC-Inhibition 14 Wochen nach NNM-Gabe nur in einer einzigen Karzinomprobe messbar (*Diagramm 20*).

Die SAM-DC-Konzentration entsprach in Karzinomen der DFMO-Gruppe den Werten von normalem Leberparenchym (*Diagramm 18*), was sowohl angesichts der gesteigerten SAM-DC-Aktivität bei PAD-Tieren, als auch im Hinblick auf die bereits beschriebene reflektorische SAM-DC-Aktivierung unter DFMO-induzierter ODC-Inhibition verwundert. Eventuell liegt die Begründung hierfür in der erwähnten Problematik der Isolierung reinen Karzinomgewebes.

14 Wochen nach NNM zeigten sich bei einer nicht erhöhten Sperminkonzentration die Konzentrationen von Spermidin und SAT in Karzinomen der DFMO-Tiere tendenziell gegenüber unverändertem Lebergewebe erhöht, was die Beobachtung des unter polyaminreduzierter und antibiotikahaltiger Kost in karzinomatösem Gewebe gesteigerten Interkonversionsstoffwechsels unterstützt (*Diagramm 19, 21 und 22*). Auch hier dienen die Untersuchungen von Claverie et al. der Bestätigung, in denen Tumorzellen einen durch ODC-Inhibition reduzierten Polyaminpool mithilfe des Interkonversionsstoffwechsels ausgleichen konnten (*Claverie et al., 1987*).

4.2.3 Erhöhte Zufuhr nahrungsgebundener Polyamine unter inhibierter oxidativer Degradation von intrazellulären Polyaminen

In der Niere ließen sich infolge des vermehrten Angebots an enteralen Polyaminen deutlich angehobene Polyaminspiegel nachweisen, wobei vor allem Putrescin und Spermidin gegenüber den Ergebnissen der Standardkosttiere teilweise signifikant und hochsignifikant erhöht waren (*Diagramm 28, 29 und 30*). Die hohen Putrescinwerte führten über einen negativen feedback-Mechanismus zu einer gegenüber SK-Tieren deutlich und gegenüber PAD-Tieren signifikant verminderten ODC-Aktivität (*Diagramm 25*). Messungen der SAM-DC-Aktivität ergaben in der Niere im Vergleich zur Standardkostgruppe angedeutet erniedrigte Ergebnisse (*Diagramm 26*). Einer putrescinvermittelten Aktivierung des Enzyms im Sinne einer Substratinduktion, wie sie teilweise aus vorangegangenen Studien bekannt ist (*Pegg et al., 1992*),

DISKUSSION

wirkte hier eventuell der über negative feedback-Mechanismen inhibierende Effekt der erhöhten Spermidin- und Sperminwerte entgegen.

Im Gegensatz zur Niere zeigten die Spermidin- und Sperminbestimmungen in gesunden Leberzellen weder 10 noch 14 Wochen nach NNM-Gabe einen signifikanten Anstieg (*Diagramm 21 und 22*), was im Zusammenhang mit der hier tendenziell erhöhten SAT-Aktivität (*Diagramm 19*) auf einen gesteigerten Interkonversionsstoffwechsel hinweisen könnte. Bestätigung findet diese Beobachtung in den Ergebnissen von Pegg und Erwin (*Pegg und Erwin, 1985*). Sie untersuchten bei Ratten die Auswirkungen einer vermehrten Zufuhr exogener enteraler Polyamine auf Leber-, Nieren- und Lungengewebe. Hierbei ermittelten sie insbesondere im Lebergewebe eine hochsignifikante SAT-Induktion und sahen darin einen zelleigenen Mechanismus zur Reduzierung eines Polyaminüberschusses.

Trotz dieses vermuteten verstärkten Interkonversionsstoffwechsels und des durch Aminoguanidin inhibierten Putrescinabbaus wies der Putrescinspiegel im Lebergewebe gesunder und karzinomerkrankter PRD-Tiere 14 Wochen nach NNM-Gabe gegenüber den Standardkosttieren allenfalls eine angedeutete Erhöhung auf (*Diagramm 20*). 10 Wochen nach NNM-Gabe konnte unter Standardkostbedingungen nur ein einzelner Putrescinwert gemessen werden, sodass ein zuverlässiger Vergleich hier nicht möglich war. Aus welchen Gründen die Putrescinerhöhung in unverändertem Lebergewebe so gering ausfiel, bleibt offen. Die ODC-Aktivität im Lebergewebe der PRD-Tiere war unter der vermehrten Polyaminzufuhr gegenüber der Standardkostgruppe und auch der PAD-Gruppe signifikant reduziert (*Diagramm 17*), was angesichts der relativ diskret erhöhten Polyaminmessungen und des daher erwartungsgemäß eher schwach ausgeprägten negativen feedback-Mechanismus verwundert. Wie jedoch bereits erwähnt wurde, ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den Messungen um recht späte Einzelzeitpunktanalysen handelt. Maßgeblich veränderte Enzym- und Polyaminkonzentrationen hatten sich zu diesen Zeitpunkten in der Leber eventuell wieder normalisiert und wurden so nicht erfasst.

Dass Leber- und Nierengewebe unterschiedlich auf das erhöhte Angebot exogener enteraler Polyamine reagieren, könnte auf eine verschieden stark ausgeprägte Akkumulationsfähigkeit des Diaminoxidaseinhibitors Aminoguanidin hinweisen. Eine dadurch in der Leber weniger stark gehemmte oxidative Degradation als Reaktion auf ansteigende Polyaminspiegel würde den vergleichsweise unauffälligen Putrescinwert in Hepatozyten erklären. Daneben spielen in

DISKUSSION

der äußerst komplexen Regulierung des Polyaminstoffwechsels natürlich zahlreiche Faktoren eine Rolle, die in den Auswertungen dieser Arbeit nicht erfasst werden konnten. Organspezifische Unterschiede in der Fähigkeit zum zellulären Polyaminuptake oder in der Induzierbarkeit weiterer regulatorischer Enzyme wie beispielsweise das Antizym (AZ), das ODC-Aktivität und zelluläre Polyaminaufnahme inhibiert (*Mitchell et al., 1994; Suzuki et al., 1994; Sakata et al., 2000*), sind als Ursachen von in der Leber effektiveren Polyaminhomöostasemechanismen denkbar.

Das karzinomatöse Lebergewebe der PRD-Tiere zeigte – wie aus der Literatur bekannt und entsprechend den Ergebnissen aller anderen Versuchsgruppen – gegenüber unverändertem Lebergewebe signifikant und hochsignifikant erhöhte ODC- und Putrescinwerte (*Diagramm 17 und 20*), wobei allerdings entsprechende Karzinomergebnisse der Standardkostgruppe nicht überschritten wurden. Ein karzinomatös veränderter und damit sehr stoffwechselaktiver Hepatozyt weist demnach bereits unter normalem Polyaminangebot einen deutlich erhöhten Putrescinspiegel auf, der auch bei einem vermehrten enteralen Polyaminangebot nicht weiter ansteigt. Eine mit malignen Veränderungen assoziierte Aktivierung der SAM-DC, wie sie in Karzinomzellen der Standardkost- und der PAD-Tiere auftrat, erfolgte in den Karzinomzellen der PRD-Tiere nicht (*Diagramm 18*). Im Unterschied zu Putrescin waren die Spermidin- und Sperminspiegel gegenüber unverändertem Lebergewebe gesunder und karzinomerkrankter Tiere nicht maßgeblich verändert (*Diagramm 21 und 22*). Eventuell erfolgte hier – entsprechend der Karzinomergebnisse der PAD-Tiere und der DFMO-Tiere, allerdings ohne induzierte Reduktion der luminalen Polyamine – der verstärkte Abbau der beiden Polyamine über den Interkonversionsstoffwechsel zugunsten einer maximalen intrazellulären Putrescinanreicherung. Auch unter Standardkost lassen die erhöhten Putrescinwerte bei unauffälligen Spermidin- und Sperminwerten einen in karzinomatösem Gewebe trotz ausreichender Polyaminzufuhr aktivierten Interkonversionsstoffwechsel vermuten. Eine solche Beteiligung des Interkonversionsstoffwechsels an malignen Transformationsprozessen wurde in der Literatur bereits durch Halline et al. am Modell der DMH-induzierten Kolonkarzinogenese beobachtet (*Halline et al., 1989 b*).

Dass karzinomatöse Gewebeveränderungen in keiner der 4 Versuchsgruppen mit einer signifikanten Erhöhung der Polyamine Spermidin und Spermin assoziiert sind, entspricht den Ergebnissen von Löser et al. Sie stellten beim Menschen in 4 verschiedenen Karzinomen des Gastrointestinaltraktes (Magen- und Ösophaguskarzinome, Pankreaskarzinome und kolorekta-

le Karzinome) erwartungsgemäß signifikant erhöhte ODC- und Putrescinspiegel fest, wogegen sich Spermidin- und Sperminkonzentrationen nahezu unauffällig verhielten (*Löser et al., 1989; 1990 a, b und c*). Tamori et al. beobachteten beim Menschen in Leberzellkarzinomen gegenüber unverändertem, karzinombenachbartem Lebergewebe ebenfalls erhöhte ODC- und Putrescinwerte, hier lagen allerdings auch Spermidin und Spermin in vergleichsweise hohen Konzentrationen vor (*Tamori et al., 1994*). Halline et al. beschrieben in DMH-induzierten Kolontumoren signifikant erhöhte Spermidinkonzentrationen bei unveränderten Sperminwerten (*Halline et al., 1989 b*). In tendenzieller Ausprägung findet sich diese Beobachtung in der vorliegenden Arbeit auch in den Spermidin- und Sperminergebnissen der Langzeitgruppen wieder.

Zusammengefasst kann eine polyaminreiche Kost plus Aminoguanidin in normalem Lebergewebe offenbar keinen signifikanten Anstieg der intrazellulären Polyaminkonzentrationen bewirken. Dies steht im Einklang mit dem bei PRD-Tieren gegenüber Standardkostbedingungen nicht maßgeblich erhöhten Risiko der Karzinominduktion. Die dennoch vorliegenden Indizien für eine tumorfördernde Wirkung eines vermehrten Angebots enteraler Polyamine, nämlich zahlreicher und höhermaligne auftretende hepatozelluläre Karzinome sowie eine beschleunigte Weiterentwicklung präneoplastischer Zellherde, finden zu den hier betrachteten Zeitpunkten keine korrespondierenden Abweichungen der Enzym- oder Polyaminkonzentrationen. Auch hier muss noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die Messung der einzelnen Parameter des Polyaminstoffwechsels natürlich nur punktuell am Ende des Versuchs erfolgten und daraus nicht auf mögliche signifikante Effekte im früheren Verlauf der Karzinogenese rückgeschlossen werden kann.

4.2.4 Auswirkungen einer Karzinomerkrankung auf gesundes Leber- und Nierengewebe

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sich die in Karzinomgewebe verstärkte Putrescin de novo-Synthese mit erhöhten intrazellulären ODC- und Putrescinkonzentrationen in weniger starker Ausprägung auch in tumorbenachbartem Gewebeabschnitten findet. Pizzi et al. wiesen am Modell AOM-induzierter Kolontumoren in tumorbenachbarter Mukosa gegenüber der Mukosa von Kontrolltieren erhöhte ODC-Aktivitäten nach (*Pizzi et al., 1994*). Halline et al. konnten in Gewebeabschnitten, die an DMH-induzierte Kolontumoren angrenzten, im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Putrescinkonzentrationen feststellen (*Halline et al.,*

1989 b). Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit gezielt auf Unterschiede zwischen Lebergewebe gesunder Tiere und karzinombenachbartem, aber makroskopisch unauffälligem Gewebe tumorerkrankter Tiere geachtet werden. Da die für malignes Gewebe typischen Auffälligkeiten bei karzinombefallenen Tieren auch Organe betreffen können, die selbst keine Gewebeneoplasien aufweisen, wurde darüber hinaus Nierengewebe von leberkarzinomerkrankten Tieren mit dem gesunder Tiere verglichen.

Relevante Unterschiede im Vergleich karzinomerkrankter und nicht karzinomerkrankter Tiere bezüglich einer in gesundem Leber- oder Nierengewebe gesteigerten Putrescin de novo-Synthese und konnten in dieser Arbeit nicht belegt werden. Dennoch zeigten sich im Vergleich der Gewebeproben gesunder bzw. an einem hepatozellulären Karzinom erkrankter Tiere tendenzielle Auffälligkeiten, die insbesondere die intrazellulären Putrescin- und Spermidinkonzentrationen unter polyaminreicher Kost plus Aminoguanidin betrafen. So waren beide Polyamine in gesunden Leberzellen karzinombefallener Tiere, also in karzinombenachbarten Leberzellen, gegenüber den Vergleichswerten in Leberzellen karzinomfreier Tiere leicht erhöht (*Diagramm 20 und 21*). Nierengewebe wies im Vergleich ebenfalls eine angedeutete Putrescin- und Spermidinerhöhung bei erkrankten Tieren auf (*Diagramm 28 und 29*). Die Sperminwerte verhielten sich bei erkrankten Tieren der PRD-Gruppe in Leber und Niere unauffällig (*Diagramm 22 und 30*).

Unter einer polyaminreduzierten und antibiotikahaltigen Diät wiesen bei den Kurzzeittieren – in der Auswertung der Langzeittiere war ein Vergleich zwischen gesunden und karzinomerkrankten Tieren nicht möglich – jeweils alle drei Polyamine in den Leber- und Nierenproben karzinombefallener Tiere leicht erhöhte Konzentrationen auf. Eine Aktivierung der ODC, wie sie entsprechend der Literatur als typische Veränderung zu erwarten wäre, deutete sich allenfalls in Nierengewebe karzinombefallener Standardkosttiere an (*Diagramm 25*). Insgesamt zeigte diese Arbeit somit zwar vereinzelt Tendenzen im Sinne charakteristischer karzinomassoziierter Enzym- und Polyaminveränderungen in gesunden Gewebeabschnitten, signifikante Unterschiede zur Bestätigung der Literaturergebnisse konnten allerdings nicht gefunden werden. Ursache hierfür sind vermutlich die sehr niedrigen Fallzahlen, die sich infolge der Unterscheidung zwischen karzinombefallenen und gesunden Tieren in den einzelnen Versuchsgruppen ergaben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Polyamine sind ubiquitäre essentielle Bestandteile der Zellen und spielen in der Zellproliferation und -differenzierung eine zentrale Rolle. Am Beispiel der N-Nitrosomorpholin-induzierten Hepatokarzinogenese untersucht die vorliegende Arbeit die Auswirkungen eines veränderten Polyaminstoffwechsels auf Differenzierung und Wachstum bei einem nicht-intestinalen Karzinogenesemodell. Der modifizierte Polyamingehalt der Nahrung erwies sich im Langzeitversuch als nicht-toxisch und wurde gut vertragen. Das als Karzinogen gewählte Nitrosamin verfügt über eine sehr hohe toxische und karzinogene Potenz. Unter einer täglichen Dosierung von 12 mg/kg KG erkrankten in einem Zeitraum von 10 Wochen nach ebenfalls 10wöchiger Karzinogenapplikation 100% der Versuchstiere an präneoplastischen Zellveränderungen. Lebertumoren bildeten 71% der als Vergleichsgruppe dienenden Standardkosttiere aus.

Der unter anderem am Modell der DMH-induzierten Kolonkarzinogenese nachgewiesene tumorreduzierende Effekt des ODC-Inhibitors α -Difluoromethylornithin in Kombination mit einer Reduktion des exogenen enteralen Polyaminpools aus Nahrung und Produktion durch Darmbakterien führte auch im hier verwendeten Karzinogenesemodell der Leber zu einer signifikanten Reduktion der NNM-induzierten Entstehung von Lebertumoren. Bei in dieser Behandlungsgruppe erniedrigten intrazellulären ODC- und Putrescinspiegeln in nicht-karzinomatösem Lebergewebe war das Risiko einer Karzinombildung teilweise signifikant gesenkt. Darüber hinaus zeigten die entstehenden malignen Leberzellveränderungen wie auch die präneoplastischen Leberzellherde niedrigere Malignitätsgrade und eine verzögerte histologische Progredienz.

Die alleinige Gabe einer polyaminreduzierten und antibiotikahaltigen Kost zur Reduzierung der luminalen enteralen Polyamine ließ in frühen Stadien der Tumorentstehung eine tendenziell inhibierende Wirkung auf Häufigkeit und Weiterentwicklung der Leberzellveränderungen

ZUSAMMENFASSUNG

erkennen. Langfristig wurden jedoch keine Auswirkungen auf den Karzinogeneseprozess erzielt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Beobachtung, dass luminale enterale Polyamine in erster Linie als lokaler Faktor für Wachstumsprozesse in intestinalem Gewebe, nicht aber für darmferne Organe von maßgeblicher Bedeutung sind (Löser *et al.*, 1999).

Eine polyaminangereicherte Nahrung in Kombination mit Aminoguanidin führte in der Niere zu signifikant erhöhten Putrescin- und Spermidinkonzentrationen, während in der Leberzelle der intrazelluläre Polyaminspiegel dadurch nicht verändert wurde. Dennoch begünstigte die gezielte Erhöhung der luminalen Polyamine offensichtlich die Entstehung vergleichsweise hochmaligner hepatozellulärer Karzinome und präneoplastische Leberzellherde zeigten sich in Ausbreitung und histologischem Fortschreiten beschleunigt.

Die NNM-induzierten Leberzellkarzinome wiesen als Anzeichen einer gesteigerten Putrescin de novo-Synthese erhöhte ODC- und Putrescinkonzentrationen auf, wie sie aus der Literatur als karzinomtypische Veränderungen bekannt sind. Eine darüber hinaus bei karzinomatösen Erkrankungen auch in tumorbenachbartem Gewebe oder in Organen, die nicht am Karzinogeneseprozess beteiligt sind, induzierte Putrescin de novo-Synthese konnte nicht nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer etablierter Karzinogenesemodelle belegen die systematisch erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit auch für das Karzinogenesemodell der NNM-induzierten Lebertumore, dass die Hemmung des Polyaminstoffwechsels durch Gabe von DFMO und Reduktion der luminalen Polyamine zu einer signifikanten Reduktion der NNM-induzierten Bildung von Lebertumoren führt, was die Bedeutung des Polyaminstoffwechsels für dieses Karzinogenesemodell belegt. Im Gegensatz zur intestinalen Karzinogenese spielen luminale Polyamine aus Nahrung und Darmbakterienproduktion bei der Leberkarzinogenese keine wesentliche Rolle, da weder die Reduktion der luminalen Polyamine zu einer Verringerung, noch die deutliche Anreicherung zu einer Vermehrung der NNM-induzierten Lebertumore führt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Arlow, F.L., Walczak, S.M., Luk, G.D., Majumdar, A.P. (1989):** Attenuation of azoxy-methane-induced colonic mucosal ornithine decarboxylase and tyrosine kinase activity by calcium in rats. *Cancer Res.* 49, 5884-5888
- Ask, A., Persson, L., Heby, O. (1992):** Increased survival of L 1210 leukemic mice by prevention of the utilization of extracellular polyamines. Studies using a polyamine-uptake mutant, antibiotics and a polyamine-deficient diet. *Cancer Lett.* 66, 29-34
- Bacchi, C.J., Garofalo, J., Ciminelli, M., Rattendi, D., Goldberg, B., Mc Cann, P.P., Yarlett, N. (1993):** Resistance to DL-alpha-difluoromethylornithine by clinical isolates of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Role of S-adenosylmethionine. *Biochem. Pharmacol.* 46, 471-481
- Ball, W.J. Jr., Salsler, J.S., Balis, M.E. (1976):** Biochemical changes in preneoplastic rodent intestines. *Cancer Res.* 36, 2686-2689
- Bannasch, P., Zerban, H. (1986):** Pathogenesis of primary liver tumors induced by chemicals. *Cancer Res.* 100, 1-15
- Bannasch, P., Mayer, D., Krech, R. (1979):** Neoplastic and preneoplastic lesions in rats after oral administration of a single dose of N-nitrosomorpholine. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 94, 233-248
- Bannasch, P., Hacker, H.J., Klimek, F., Mayer, D. (1984):** Hepatocellular glycogenesis and related pattern of enzymatic changes during hepatocarcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 97-121
- Bannasch, P., Enzmann, H., Klimek, F., Weber, E., Zerban, H. (1989):** Significance of sequential cellular changes inside and outside foci of altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 17, 617-628
- Bender, R., Lange, St. (2001):** Verlaufskurven. *Dtsch. Med. Wschr.* 126, T45-T46
- Benrezzak, O., Nigam, V.N., Madarnas, P. (1987):** Increased survival of CD1 mice bearing dimethylhydrazine induced primary colon and anal cancers by difluoromethylornithine with concomitant increase in angiosarcoma incidence. *Anticancer Res.* 7, 251-257
- Bieganski, T. (1983):** Biochemical, physiological and pathophysiological aspects of intestinal diamine oxidase. *Acta Physiol. Pol.* 34, 139-154

- Bolkenius, F.N., Seiler, N. (1981):** Acetylderivates as intermediates in polyamine catabolism. *Int. J. Biochem.* 13, 287-292
- Bolkenius, F.N., Seiler, N. (1987):** The role of polyamine reutilization in depletion of cellular stores of polyamines in non-proliferating tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 923, 125-135
- Bradford, M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brockhaus (1996):** Die Enzyklopädie. Brockhaus Verlag, Mannheim
- Brunton, V., Grant, M., Wallace, H. (1990):** Spermine toxicity and glutathione depletion in BHK-21/C13 cells. *Biochem. Pharmacol.* 40, 1893-1900
- Brunton, V., Grant, M., Wallace, H. (1991):** Mechanisms of spermine toxicity in baby-hamster kidney (BHK) cells. The role of amine oxidases and oxidative stress. *Biochem. J.* 280, 193-198
- Cannellakis, E.S., Kyriakidis, D.A., Heller, J.S., Pawlak, J.W. (1981):** The complexity of regulation of ornithine decarboxylase. *Med. Biol.* 59, 279-285
- Casero Jr., R.A., Woster, P.M. (2009):** Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *J Med Chem.* 13, 4551-4573
- Claverie, N., Wagner, J., Knödgen, B., Seiler, N. (1987):** Inhibition of polyamine oxidase improves the antitumoral effect of ornithine decarboxylase inhibitors. *Anticancer Res.* 7, 765-772
- Coleman, C., Wallace, H. (1990):** Polyamine excretion from human cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 1228-1229
- Cortinovis, Chr., Klimek, F., Nogueira, E. (1991):** Rat hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosodiethylamine and N-nitrosomorpholine continuously administered at low doses. *Am. J. Pathol.* 139, 1157-1171
- Dombrowski, F., Lehringer-Polzin, M., Pfeifer, U. (1994):** Hyperproliferative liver acini after intraportal islet transplantation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Lab. Invest.* 71, 688-699
- Dombrowski, F., Jost, Chr., Manekeller, S., Evert, M. (2005):** Cocarcinogenic effects of islet hormones and N-nitrosomorpholine in hepatocarcinogenesis after intrahepatic transplantation of pancreatic islets in streptozotocin-diabetic rats. *Cancer Res.* 65, 7013-7022
- Dorhout, B., Te Velde, R.J., Ferwerda, H., Kingma, A.W., De Hoog, E., Muskiet, F.A. (1995 a):** In vivo growth inhibition of L1210 leukemia by 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A), a new inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *Int. J. Cancer* 61, 214-217

- Dorhout, B., Te Velde, R.J., Ferwerda, H., Kingma, A.W., De Hoog, E., Muskiet, F.A. (1995 b):** In vivo effects of 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A) and α -difluoromethylornithine (DFMO) on L1210 growth, cell-cycle phase distribution and polyamine contents. *Int. J. Cancer* 62, 738-742
- Dowling, R.H., Fölsch, U.R., Löser, Chr. (1992):** Polyamines in the gastrointestinal tract. Kluwer academic publishers, Lancaster
- Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmähl, D. (1967):** Organotropic carcinogenic effects of 65 various N-nitroso-compounds on BD rats. *Z. Krebsforsch.* 69, 103-201
- Dudley, H.W., Rosenheim, M.C., Rosenheim, O. (1924):** The chemical constitution of spermine. *Biochem J.* 18(6), 1263-1272
- Dudley, H.W., Rosenheim, O., Starling, W.W. (1926):** The chemical constitution of spermine: structure and synthesis. *Biochem J.* 20(5), 1082-1094
- Enzmann, H., Zerban, H., Kopp-Schneider, A., Löser, E., Bannasch, P. (1995):** Effects of low doses of N-nitrosomorpholine on the development of early stages of hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 16, 1513-1518
- Estebe, J.P., Legay, F., Gentili, M., Wodey, E., Leduc, C., Ecoffey, C., Moulinoux, J.P. (2006):** An evaluation of a polyamine-deficient diet for the treatment of inflammatory pain. *Anesth. Analg.* 102, 1781-1788
- Flamigni, F., Stanic', I., Facchini, A., Cetrullo, S., Tantini, B., Borzì, R.M., Guarnieri, C., Caldarella, C.M. (2007):** Polyamine biosynthesis as a target to inhibit apoptosis of non-tumoral cells. *Amino Acids* 33, 197-202
- Fredericq, E., Hacha, R., Colson, P., Houssier, C. (1991):** Condensation and precipitation of chromatin by multivalent cations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 8, 847-865
- Freudig, D. (1998):** Lexikon der Biologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Frydman, B., Blokhin, A.V., Brummel, S., Wilding, G., Maxuitenko, Y., Sarkar, A., Bhattacharya, S., Church, D., Reddy, V.K., Kink, J.A., Marton, L.J., Valasinas, A., Basu, H.S. (2003):** Cyclopropane-containing polyamine analogues are efficient growth inhibitors of human prostate tumor xenograft in nude mice. *J. Med. Chem.* 46, 4586-4600
- Göttlicher, M., Cikryt, P. (1987):** Induction of ornithine decarboxylase by aromatic amines in rat liver. *Cancer Lett.* 35, 65-70
- Haarstad, H., Winnberg, A., Petersen, H. (1985):** Effects of a cholecystokinin-like peptide on DNA and polyamine synthesis in the rat pancreas. *Scand. J. Gastroenterol.* 20, 530-538
- Hacker, A., Marton, L.J., Sobolewski, M., Casero, R.A. Jr. (2008):** In vitro and in vivo effects of the conformationally restricted polyamine analogue CGC-11047 on small cell and non-small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63, 45-53

- Halline, A.G., Dudeja, P.K., Brasitus, T.A. (1989 a):** Differential stimulation of S-adenosylmethionine decarboxylase by difluoromethylornithine in the rat colon and small intestine. *Biochem. J.* 259, 513-518
- Halline, A.G., Dudeja, P.K., Brasitus, T.A. (1989 b):** 1,2-Dimethylhydrazine-induced alterations in N₁-acetylspemidine levels and spermidine N₁-acetyltransferase activity in rat colonic mucosa. *Cancer Res.* 49, 633-638
- Hampel, K.J., Crosson, P., Lee, J.S. (1991):** Polyamines favour DNA triplex formation at neutral pH. *Biochemistry* 30, 4455-4459
- Harada, J., Sugimoto, M. (1997):** Polyamines prevent apoptotic cell death in cultured cerebellar granule neurones. *Brain Res.* 753, 251-259
- Heby, O. (1981):** Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19, 1-20
- Heby, O. (1985):** Ornithine decarboxylase as a target of chemotherapy. *Adv. Enzyme Regul.* 24, 103-124
- Heby, O., Holm, I., Frostesjö, L., Collin, H., Grahn, B., Rehnholm, A., Stjernborg, L., Ask, A., Persson, L. (1992):** Polyamines: regulators of mammalian cell growth and differentiation. In: Dowling, R.H., Fölsch, U.R., Löser, Chr. (Hrsg.): *Polyamines in the gastrointestinal tract.* Kluwer academic publishers, Lancaster, 19-28
- Heby, O., Roberts, S.C., Ullman, B. (2003):** Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 415-419
- Heby, O., Persson, L., Rentala, M. (2007):** Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas` disease and leishmaniasis. *Amino Acids* 33, 359-366
- Herrera-Ornelas, L., Porter, C., Pera, P., Greco, W., Petrelli, N.J., Mittelman, A. (1987):** A comparison of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase activity in human large bowel mucosa, polyps and colorectal adenocarcinoma. *J. Surg. Res.* 42, 56-60
- Hogarty, M.D., Norris, M.D., Davis, K., Liu, X., Evageliou, N.F., Hayes, C.S., Pawel, B., Guo, R., Zhao, H., Sekyere, E., Keating, J., Thomas, W., Cheng, N.C., Murray, J., Smith, J., Sutton, R., Venn, N., London, W.B., Buxton, A., Gilmour, S.K., Marshall, G.M., Haber, M. (2008):** ODC1 is a critical determinant of MYCN oncogenesis and a therapeutic target in neuroblastoma. *Cancer Res.* 68, 9735-9745
- Huang, Y., Hager, E.R., Phillips, D.L., Dunn, V.R., Hacker, A., Frydman, B., Kink, J.A., Valasinas, A.L., Reddy, V.K., Marton, L.J., Casero, R.A. Jr., Davidson, N.E. (2003):** A novel polyamine analog inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 9, 2769-2777
- Jänne, J., Alhonen, L., Leinonen, P. (1991):** Polyamines: from molecular biology to clinical applications. *Ann. Med.* 23, 241-259

- Jänne, J., Alhonen, L., Pietilä, M., Keinänen, T.A. (2004):** Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur. J. Biochem.* 271, 877-894
- Johnson, T.D. (1996):** Modulation of channel function by polyamines. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 22-27
- Kingsnorth, A.N., King, W.W., Diekema, K.A., Mc Cann, P.P., Ross, J.S., Malt, R.A. (1983):** Inhibition of ornithine decarboxylase with 2-diflouromethylornithine: reduced incidence of dimethylhydrazine-induced colon tumors in mice. *Cancer Res.* 43, 2545-2549
- Kramer, D.L., Khomutov, R.M., Bukin, Y.V., Khomutov, A.R., Porter, C.W. (1989):** Cellular characterization of a new irreversible inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase and its use in determining the relative abilities of individual polyamines to sustain growth and viability of L1210 cells. *Biochem. J.* 259, 325-331
- Labarca, C., Paigen, K. (1980):** A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102, 344-352
- La Muraglia, G.M., Lacaine, F., Malt, R.A. (1986):** High ornithine decarboxylase activity and polyamine levels in human colorectal neoplasia. *Ann. Surg.* 204, 89-93
- Leeuwenhoek, A. van (1678):** Observations D. Anthonii Lewenhoeck de natis e semine genitali animalculus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 12, 1040
- Levin, V.A., Prados, M.D., Yung, W.K., Gleason, M.J., Ictech, S., Malec, M. (1992):** Treatment of recurrent gliomas with eflornithine. *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 1432-1437
- Lexikon der Biologie (1998).** Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Lijinsky, W., Kovatch, R.M., Riggs, C.W., Walters, P.T. (1988):** Dose response study with N-nitrosomorpholine in drinking water of F-344 rats. *Cancer Res.* 48, 2089-2095
- Linsalata, M., Russo, F. (2008):** Nutritional factors and polyamine metabolism in colorectal cancer. *Nutrition* 24, 382-389
- Löser, Chr. (2000):** Polyamines in human and animal milk. *Br. J. Nutr.* 84, 55-58
- Löser, Chr., Wunderlich, U., Fölsch, U.R. (1988):** Reversed-phase liquid chromatographic separation and simultaneous fluorimetric detection of polyamines and their monoacetyl derivatives in human and animal urine, serum and tissue samples: an improved, rapid and sensitive method for routine application. *J. Chromatogr.* 430, 249-262
- Löser, Chr., Fölsch, U.R., Paprotny, C., Creutzfeldt, W. (1989):** Polyamines in human gastric and esophageal cancer. *Scand. J. Gastroenterol.* 24, 1193-1199
- Löser, Chr., Fölsch, U.R., Paprotny, C., Creutzfeldt, W. (1990 a):** Polyamine concentrations in pancreatic tissue, serum and urine of patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 5, 119-127

- Löser, Chr., Fölsch, U.R., Paprotny, C., Creutzfeldt, W. (1990 b):** Polyamines in colorectal cancer. Evaluation of polyamine concentrations in the colon tissue, serum and urine of 50 patients with colorectal cancer. *Cancer* 65, 958-966
- Löser, Chr., Fölsch, U.R., Paprotny, C., Creutzfeldt, W. (1990 c):** Polyamines in human gastrointestinal malignancies. *Digestion* 46, 430-438
- Löser, Chr., Fölsch, U.R., Dittmar, K.U., Paprotny, C. (1992):** Polyamines as diagnostic markers in various benign, premalignant, and malignant colorectal diseases. In: Dowling R.H., Fölsch, U.R., Löser, Chr. (Hrsg.): Polyamines in the gastrointestinal tract. Kluwer academic publishers, Lancaster, 155-169
- Löser, Chr., Stüber, E., Fölsch, U.R. (1995):** Dissimilar effect of the carcinogenic agent azaserine on pancreatic and hepatic polyamine metabolism in rats. *Pancreas* 10, 44-52
- Löser, Chr., Starp, F., Fölsch, U.R. (1996):** Dissimilar activation patterns of the carcinogen dimethylhydrazine (DMH) on intracellular polyamine metabolism in various organs. *Z. Gastroenterol.* 34, 801-808
- Löser, Chr., Fitting, T., Fölsch, U.R. (1997 a):** Importance of intracellular S-adenosylmethionine decarboxylase activity for the regulation of camostate-induced pancreatic polyamine metabolism and growth: in vivo effect of two novel S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors. *Digestion* 58, 258-265
- Löser, Chr., Eisel, A., Fölsch, U.R. (1997 b):** Long-term feeding of polyamine-deficient diets induces potent pancreatic hypertrophy and small bowel and colonic hypoplasia. *Digestion* 58, 57
- Löser, Chr., Torff, L., Fölsch, U.R. (1997 c):** Uptake of extracellular, dietary Putrescine is an important regulatory mechanism of intracellular polyamine metabolism during camostate-induced pancreatic growth in rats. *Dig. Dis. Sci.* 42, 503-513
- Löser, Chr., Eisel, A., Fölsch, U.R. (1998):** Die Fütterung polyaminarmer Diäten hemmt signifikant die Dimethylhydrazin (DMH)-induzierte Kolonkarzinogenese von Ratten. Abstract, 53. Tagung der Dt. Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Kiel
- Löser, Chr., Eisel, A., Harms, D., Fölsch, U.R. (1999):** Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut.* 44, 12-16
- López-García, C., López-Contreras, A.J., Cremades, A., Castells, M.T., Marín, F., Schreiber, F., Penafiel, R. (2008):** Molecular and morphological changes in placenta and embryo development associated with the inhibition of polyamine synthesis during midpregnancy in mice. *Endocrinology* 149, 5012-5023
- Luk, G.D., Bayless, T.M., Baylin, S.B. (1980):** Diamin oxidase (histaminase). A circulating marker for rat intestinal mucosal maturation and integrity. *J. Clin. Invest.* 66, 66-70
- Luk, G.D., Zhang, S.Z., Hamilton, S.R. (1989):** Effects of timing of administration and dose of difluoromethylornithine on rat colonic carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 421-427

- Malt, R.A., Kingsnorth, A.N., La Muraglia, G.M., Lacaine, F., Ross, J.S. (1985):** Chemo-prevention and chemotherapy by inhibition of ornithine decarboxylase activity and polyamine synthesis: colonic, pancreatic, mammary and renal carcinomas. *Adv. Enzyme Regul.* 24, 93-102
- Manni, A., Badger, B., Wechter, R., Kunselman, S., Rossini, A., Demers, L. (1995):** Biochemical and growth-modulatory effects of the new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor CGP 48664 in malignant and immortalized normal human breast epithelial cells in culture. *Int. J. Cancer* 62, 485-491
- Marton, L.J., Pegg, A.E. (1995):** Polyamines as targets for the therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 55-91
- Matsui, I., Pegg, A.E. (1982):** Induction of spermidine-N¹-acetyltransferase by dialkyl-nitrosoamines. *Cancer Res.* 42, 2990-2995
- Matsui, I., Wiegand, L., Pegg, A.E. (1981):** Properties of spermidine-N-acetyltransferase from liver of rats treated with carbon tetrachloride and its role in the conversion of spermidine into putrescine. *J. Biol. Chem.* 256, 2454-2459
- Mc Closkey, D.E., Casero, R.A. Jr., Woster, P.M., Davidson, N.E. (1995):** Induction of programmed cell death in human breast cancer cells by an unsymmetrically alkylated polyamine analogue. *Cancer Res.* 55, 3233-3236
- Milord, F., Pépin, J., Loko, L., Ethier, L., Mpia, B. (1992):** Efficacy and toxicity of eflornithine for treatment of trypanosoma brucei gambiense sleeping sickness. *Lancet* 340, 652-655
- Mitchell, J.L., Judd, G.G., Bareyal-Leyser, A., Ling, S.Y. (1994):** Feedback repression of polyamine transport is mediated by antizyme in mammalian tissue-culture cells. *Biochem. J.* 299, 19-22
- Mitchell, J.L., Leyser, A., Holtorff, M.S., Bates, J.S., Frydman, B., Valasinas, A.L., Reddy, V.K., Marton, L.J. (2002):** Antizyme induction by polyamine analogues as a factor in cell growth inhibition. *Biochem. J.* 366, 663-671
- Monti, M.G., Ghiaroni, S., Pernecco, L., Barbieri, D., Marverti, G., Franceschi, C. (1998):** Polyamine depletion protects HL-60 cells from 2-deoxy-D-ribose-induced apoptosis. *Life Sci.* 62, 799-806
- Murakami, Y., Fujita, K., Kameji, T., Hayashi, S. (1985):** Accumulation of ornithine decarboxylase-antizyme complex in HMOA cells. *Biochem. J.* 225, 689-697
- Moulinoux, J.P., Darcel, F., Quemener, V., Havouis, R., Seiler, N. (1991):** Inhibition of the growth of U-251 human glioblastoma in nude mice by polyamine deprivation. *Anticancer Res.* 11, 175-180
- Nichols, C.G., Lopatin, A.N. (1997):** Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 171-191

- Nigro, N.D., Bull, A.W., Boyd, M.E. (1987):** Importance of the duration of inhibition on intestinal carcinogenesis by difluoromethylornithine in rats. *Cancer Lett.* 35, 153-158
- Niiranen, K., Pietilä, M., Pirttilä, T.J., Järvinen, A., Halmekytö, M., Korhonen, V.P., Keinänen, T.A., Alhonen, L., Jänne, J. (2002):** Target disruption of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase gene in mouse embryonic stem cells. Effects on polyamine homeostasis and sensitivity to polyamine analogues. *J. Biol. Chem.* 277, 25323-25328
- Nilsson, J., Grahn, B., Heby, O. (2000):** Antizyme inhibitor is rapidly induced in growth-stimulated mouse fibroblasts and releases ornithine decarboxylase from antizyme suppression. *Biochem. J.* 346, 699-704
- O'Toole, B.A., Huffman, K.W., Gibson, J.P. (1989):** Effects of eflornithine hydrochloride (DFMO) on fetal development in rats and rabbits. *Teratology* 39, 103-113
- Paulsen, J.E., Reistad, R., Eliassen, K.A., Sjaastad, O.V., Alexander, J. (1997):** Dietary polyamines promote the growth of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Carcinogenesis* 18, 1871-1875
- Pegg, A.E. (1977):** Inhibition of mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase activity by 1,1'-[(methylethanediyliidene)-dinitrilo]bis(3-aminoguanidine). *J. Biol. Chem.* 253, 539-542
- Pegg, A.E. (1988):** Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res.* 48, 759-774
- Pegg, A.E. (2008):** Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294 (6), E995-1010
- Pegg, A.E., Mc Gill, S.M. (1978):** Inhibition of diamine oxidase by 1,1'-[(methyl-ethanediyliidene)-dinitrilo]-bis-(3-aminoguanidine) and 1,1'-[(methyl-ethanediyliidene)-dinitrilo]-diguanidine. *Biochem. Pharmacol.* 27, 1625-1629
- Pegg, A.E., Mc Cann, P.P. (1982):** Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 243, C212-221
- Pegg, A.E., Pösö, H. (1983):** S-adenosylmethionine decarboxylase (rat liver). *Methods Enzymol.* 94, 234-239
- Pegg, A.E., Erwin, B.G. (1985):** Induction of spermidine/spermine N₁-acetyltransferase in rat tissues by polyamines. *Biochem. J.* 231, 285-289
- Pegg, A.E., Mc Cann, P.P. (1992):** S-adenosylmethionine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacol. Ther.* 56, 359-377
- Pegg, A.E., Stanley, B.A., Shantz, L.M., Coleman, C.S., Poulin, R., Lu, L. (1992):** Structural studies on key regulatory enzymes involved in polyamine metabolism. In: Dowling, R.H., Fölsch, U.R., Löser, Chr. (Hrsg.): *Polyamines in the gastrointestinal tract*. Kluwer academic publishers, Lancaster, 3-18

- Persson, L., Holm, I., Heby, O. (1988):** Regulation of ornithine decarboxylase mRNA translation by polyamines. Studies using a cell-free system and a cell line with an amplified ornithine decarboxylase gene. *J. Biol. Chem.* 263, 3528-3533
- Persson, L., Stjernborg, L., Holm, I., Heby, O. (1989):** Polyamine-mediated control of mammalian S-adenosyl-L-methionine decarboxylase expression: effects on the content and translational efficiency of the mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 1196-1202
- Persson, L., Lövkvist, E., Stjernborg, L., Ask, A., Holm, I., Heby, O. (1992):** Regulatory mechanisms in polyamine metabolism. In: Dowling, R.H., Fölsch, U.R., Löser, Chr. (Hrsg.): *Polyamines in the gastrointestinal tract.* Kluwer academic publishers, Lancaster, 389-400
- Pizzi, C., Pignata, S., Calderopoli, R., D'Agostino, L., Tritto, G., D'Adamo, G., Esposito, G., Daniele, B., Mazzacca, G., Bianco, A.R., Contegiacomo, A. (1994):** Cell kinetics and polyamine enzymes in the intestinal mucosa of rats with azoxymethane induced tumors. *Int. J. Exp. Pathol.* 75, 305-311
- Porter, C.W., Bergeron, R.J. (1988):** Enzyme regulation as an approach to interference with polyamine biosynthesis – an alternative to enzyme inhibition. *Adv. Enzyme Regul.* 27, 57-79
- Porter, C.W., Herrera-Ornelas, L., Pera, P., Petrelli, N.F., Mittelman, A. (1987):** Polyamine biosynthetic activity in normal and neoplastic human colorectal tissues. *Cancer* 60, 1275-1281
- Pospeschill, M. (2006):** *Statistische Methoden.* Elsevier-Verlag, Heidelberg
- Raul, F. (2007):** Revival of 2-(difluoromethyl)ornithine (DFMO), an inhibitor of polyamine biosynthesis, as a cancer chemopreventive agent. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 353-355
- Ray, R.M., Viar, M.J., Yuan, O., Johnson, L.R. (2000):** Polyamine depletion delays apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, C480-489
- Regenass, U., Mett, H., Stanek, J., Müller, M., Kramer, D., Porter, C.W. (1994):** CGP 48664, a new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor with broad spectrum anti-proliferative and antitumor activity. *Cancer Res.* 54, 3210-3217
- Rivat, C., Richebé, P., Laboureyras, E., Laulin, J.P., Havouis, R., Noble, F., Moulinoux, J.P., Simonnet, G. (2008):** Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. *Pain* 137, 125-137
- Roberts, S.C., Scott, J., Gasteier, J.E., Jiang, Y., Brooks, B., Jardim, A., Carter, N.S., Heby, O., Ullman, B. (2002):** S-adenosylmethionine decarboxylase from *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 277, 5902-5909
- Robichová, S., Slamenová, D., Gábelová, A., Sedlák, J., Jakobíková, J. (2004):** An investigation of the genotoxic effects of N-nitrosomorpholine in mammalian cells. *Chem. Biol. Interact.* 148, 163-171
- Rosenheim, O. (1924):** The isolation of spermine phosphate from semen and testis. *Biochem J.* 18(6), 1253-1262

- Rozhin, J., Wilson, P.S., Bull, A.W., Nigro, N.D. (1984):** Ornithine decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Res.* 44, 3226-3230
- Russell, D.H. (1983):** Clinical relevance of polyamines. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 18, 261-311
- Sachs, L. (2004):** *Angewandte Statistik.* 11. Auflage. Berlin. Springer
- Sakata, K., Kashiwagi, K., Igarashi, K. (2000):** Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme. *Biochem. J.* 347, 297-303
- Sarhan, S., Knödgen, B., Seiler, N. (1989):** The gastrointestinal tract as polyamine source for tumor growth. *Anticancer Res.* 9, 215-223
- Schuber, F. (1989):** Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem. J.* 260, 1-10
- Seiler, N. (1987):** Functions of polyamine acetylation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 2024-2035
- Seiler, N. (1990):** Polyamine metabolism. *Digestion* 46, 319-330
- Seiler, N. (1992):** Polyamine catabolism and elimination by the vertebrate organism. In: Dowling, R.H., Fölsch, U.R., Löser, Chr. (Hrsg.): *Polyamines in the gastrointestinal tract.* Kluwer academic publishers, Lancaster, 65-86
- Seiler, N. (2003 a):** Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Curr. Drug Targets* 4, 537-564
- Seiler, N. (2003 b):** Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 2. Structural analogues and derivatives. *Curr. Drug Targets* 4, 565-585
- Seiler, N., Bolkenius, F.N., Knödgen, B. (1985):** The influence of catabolic reactions on polyamine excretion. *Biochem. J.* 225, 219-226
- Seiler, N., Sarhan, S., Grauffel, C., Jones, R., Knödgen, B., Moulinoux, J.P. (1990):** Endogenous and exogenous polyamines in support of tumor growth. *Cancer Res.* 50, 5077-5083
- Seiler, N., Delcros, J.G., Vaultier, M., Le Roch, N., Havouis, R., Douaud, F., Moulinoux, J.P. (1996):** Bis(7-amino-4-azaheptyl)dimethylsilane and bis(7-ethylamino-4-azaheptyl)-dimethylsilane: inhibition of tumor cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 56, 5624-5630
- Singh, J., Kulkarni, N., Kelloff, G., Reddy, B.S. (1994):** Modulation of azoxymethane-induced mutational activation of ras protooncogenes by chemopreventive agents in colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 15, 1317-1323
- Sparapani, M., Virgili, M., Caprini, M., Facchinetti, F., Ciani, E., Contestabile, A. (1996):** Effects of gestational or neonatal treatment with alpha-difluoromethylornithine on ornithine decarboxylase and polyamines in developing rat brain and on adult rat neurochemistry. *Exp. Brain Res.* 108 (3), 433-440

- Stanek, J., Caravatti, G., Frei, J., Furet, P., Mett, H., Schneider, P., Regenass, U. (1993):** 4-Amidinoindan-1-one-2'-amidinohydrazone: a new potent and selective inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Med. Chem.* 36, 2168-2171
- Stefanelli, C., Bonavita, F., Stanic, I., Pignatti, C., Flamigni, F., Guarnieri, C., Caldarella, C.M. (1999):** Spermine triggers the activation of caspase-3 in a cell-free model of apoptosis. *FEBS Lett.* 451, 95-98
- Suzuki, T., He, Y., Kashiwagi, K., Murakami, Y., Hayashi, S., Igarashi, K. (1994):** Antizyme protects against abnormal accumulation and toxicity of polyamines in ornithine decarboxylase-overproducing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8930-8934
- Tabor, C.W., Tabor, H. (1984):** Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749-790
- Tadolini, B. (1988 a):** The influence of polyamine-nucleic acid complexes on Fe²⁺ autoxidation. *Mol. Cell. Biochem.* 83, 179-185
- Tadolini, B. (1988 b):** Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochem. J.* 249, 33-36
- Tamori, A., Nishiguchi, S., Kuroki, T., Seki, S., Kobayashi, K., Kinoshita, H., Otani, S. (1994):** Relationship of ornithine decarboxylase activity and histological findings in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 20, 1179-1186
- Thomas, T.J., Kulkarni, G.D., Greenfield, N.J., Shirahata, A., Thomas, T. (1996):** Structural specificity effects of trivalent polyamine analogues on the stabilization and conformational plasticity of triplex DNA. *Biochem. J.* 319, 591-599
- Thompson, H.J., Meeker, L.D., Herbst, E.J., Ronan, A.M., Minocha, R. (1985):** Effect of concentration of D,L-2-difluoromethylornithine on murine mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 45, 1170-1173
- Tome, M.E., Fiser, S.M., Payne, C.M., Gerner, E.W. (1997):** Excess putrescine accumulation inhibits the formation of modified eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and induces apoptosis. *Biochem. J.* 328, 847-854
- Uchida, K., Seidenfeld, F., Rademaker, A., Oyasu, R. (1989):** Inhibitory action of alpha-difluoromethylornithine on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine induced rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 49, 5249-5253
- Verma, A.K. (1990):** Inhibition of tumor promotion by DL-alpha-difluoromethylornithine, a specific irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. *Basic Life Sci.* 52, 195-204
- Vujcic, S., Diegelman, P., Bacchi, C.J., Kramer, D.L., Porter, C.W. (2002):** Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem. J.* 367, 665-675
- Wallace, H.M., Fraser, A.V., Hughes, A. (2003):** A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* 376, 1-14

LITERATURVERZEICHNIS

Weber, E., Bannasch, P. (1994 a): Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia and neoplasia induced by single oral exposures to N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* 15, 1219-1226

Weber, E., Bannasch, P. (1994 b): Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia and neoplasia induced in stop experiments by oral exposure to N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* 15, 1227-1234

Weber, E., Bannasch, P. (1994 c): Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia and neoplasia induced by continuous oral exposure to N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* 15, 1235-1242

Weeks, C.E., Herrmann, A.L., Nelson, F.R., Slaga, T.J. (1982): Alpha-Difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits tumor promoter-induced polyamine accumulation and carcinogenesis in mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 6028-6032

Williams, K. (1997): Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* 325, 289-297

Zhang, S.Z., Luk, G.D., Hamilton, S.R. (1988): Alpha-difluoromethylornithine-induced inhibition of growth autochthonous experimental colonic tumors produced by azoxymethane in male F344 rats. *Cancer Res.* 48, 6498-6503

7 DANKSAGUNGEN

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Christian Löser, Chefarzt der Medizinischen Klinik des Roten Kreuz Krankenhauses in Kassel. Seine intensive Forschung und seine Leistungen auf dem Gebiet der Polyamine ermöglichten diese Arbeit und auch Jahre nach Beginn der wissenschaftlichen Untersuchungen unterstützte und förderte er auf äußerst dankenswerte und hilfreiche Weise Fertigstellung und Ausarbeitung der Promotionschrift.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Michael Höpfner, Oberarzt der Medizinischen Klinik des Roten Kreuz Krankenhauses in Kassel, der während des gesamten Zeitraumes beratend, unterstützend und ermutigend an dem Erstellen der Arbeit mitwirkte und mir viel Zeit und Geduld zuteil werden ließ.

Besonders danke ich auch Herrn Prof. Dr. Dombrowski, Leiter des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Greifswald. Seine theoretische und praktische Unterstützung in der Anwendung der intravitalen Perfusionsfixation und die durch ihn durchgeführte sehr arbeitsaufwändige histologische Begutachtung aller Organpräparate trugen maßgeblich zu der Entstehung der Methodik- und Ergebnisteile dieser Arbeit bei. Auf die freundliche Bereitstellung des histologischen Bildmaterials sei ebenfalls mit großem Dank verwiesen.

Die statistische Auswertung der Tumorergebnisse erfolgte mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Dipl.-Inf. J. Hedderich aus dem Institut für medizinische Informatik und Statistik. In der abschließenden Analyse des gesamten, sehr komplexen Datenmaterials durfte ich zudem auf die sehr hilfreiche und dankenswerte Mitarbeit von Herrn Dr. Reimers aus Adendorf zurückgreifen.

Ich danke den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Frauke Grohmann und Frau Dagmar Leisner für die fachliche Einführung in labormedizinische Methoden und Arbeiten

DANKSAGUNGEN

sowie für die wertvolle Mitarbeit bei den Tierpräparationen. Außerdem danke ich dem Marion Merrell Dow Research Institute in Straßbourg, Frankreich, für die großzügige zur Verfügung Stellung des verabreichten α -Difluoromethylornithin.

Mein abschließender Dank gilt meinem Mann, der mir zu jeder Zeit motivierend und beratend zur Seite stand und meinen Kindern.

8 LEBENS LAUF

Name	Steinborn (geb. Kranz)
Vorname	Elena Doris
19. August 1973	geboren in Koblenz-Horchheim Vater: Klaus Kranz (Dipl.Ing.) Mutter: Heide-Rose Kranz (Hausfrau)
1980 bis 1984	Grundschule Argenthal
1984 bis 1993	Herzog-Johann-Gymnasium Simmern
Juni 1993	Abitur
Juli 1993	Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter der Marine
WS 1994/1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
März 1997	Physikum
März 1998	1. Staatsexamen
Seit Januar 1999	Wissenschaftliche Arbeit in der Klinik für Allgemeine Innere Medizin im Zentrum Konservative Medizin I des Klinikums der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Erstellen der vorliegenden Promotionsschrift
März 2000	2. Staatsexamen
Juni 2001	3. Staatsexamen
Juni 2001 bis Dezember 2002	„Ärztin im Praktikum“ auf der Abteilung für Neurochirurgie des Bundeswehrzentralkrankenhauses Koblenz
April 2003 bis Juli 2005	Schiffsarzt an Bord des Segelschulschiffs der Marine „Gorch Fock“
August 2005 bis Dezember 2006	Sanitätsoffizier in der Abteilung „Admiralarzt der Marine“ des Flottenkommandos Glücksburg
April 2007 bis Juli 2009	Elternzeit
seit August 2009	Truppenarzt am Fachsanitätszentrum Wilhelmshaven