



Doctoral Thesis

Bestimmung der Nitrosierung von Dimethylamin und Aminopyrin im Magen aufgrund der Methylierung von DNS

Author(s):

Meier-Bratschi, Anna-Elisabeth

Publication Date:

1982

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000257337> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

BESTIMMUNG DER NITROSIERUNG VON DIMETHYLAMIN UND AMINOPYRIN IM MAGEN
AUFGRUND DER METHYLIERUNG VON DNS

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

Anna Elisabeth Meier-Bratschi

eidg. dipl. Apothekerin

geboren am 10.5.1953

von Wetzikon TG

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. Ch. Schlatter, Referent

PD Dr. W.K. Lutz, Korreferent

Prof. Dr. O. Sticher, Korreferent

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bildung und alkylierende Wirkung von Dimethylnitrosamin in der Leber konnte unter Anwendung des kovalenten Bindungsindex CBI in der Maus und Ratte gezeigt werden, indem Tiere mit den Vorläufern Nitrit und Dimethylamin oder Aminopyrin behandelt wurden. Da eine lineare Dosisabhängigkeit von Dimethylnitrosamin in bezug auf die Methylierung der DNS bestand, konnte die Menge an gebildetem Dimethylnitrosamin anhand einer Eichgerade berechnet werden. Die Menge an nitrosiertem Amin wurde durch Vergleich des Bindungsindex von Dimethylnitrosamin mit den Bindungsindizes von Amin und Nitrit berechnet. Mit Hilfe von Purinbasenanalytik auf Reverse-Phase HPLC wurde weiter differenziert zwischen methyliertem Guanin und biosynthetisch inkorporierten $^{14}\text{C}_1$ -Fragmenten in die natürlichen Basen.

Nach oraler Applikation des stark basischen Amins Dimethylamin zusammen mit einem Ueberschuss an Nitrit wurden 0,25 - 1,5% des Amins in vivo nitrosiert zu Dimethylnitrosamin. Für das schwach basische Aminopyrin betrug die Nitrosierrate unter analogen Bedingungen fast 100%. Die Nitrosierung von Aminopyrin folgte einer sigmoiden Kurve in bezug auf die Nitritkonzentration bei konstanter Aminopyrindosis. Bis hinunter zu 3 mg $\text{KNO}_2/\text{kg KG}$ konnte sowohl bei der Ratte wie bei der Maus eine Methylierung in 7- Stellung von Guanin nachgewiesen werden. Der Nachweis von 7-Methylguanin war ein Beweis für die erfolgte Bildung und alkylierende Wirkung von DMNA.

Vitamin C, zusammen mit Nitrit und AP sondiert, zeigte eine grosse Hemmwirkung auf die DMNA-Bildung. Hingegen reduzierte Vitamin E die Nitrosierrate nur unwesentlich.

Nach Vorbehandlung von Mäusen mit 10'000 ppm Kaliumnitrat während einer Woche und nachfolgender Applikation von Aminopyrin konnte keine Nitrosierung des Amins nachgewiesen werden. Bei analoger Behandlung von Ratten wurde 7-Methylguanin im DNS-Hydrolysat nachgewiesen, was die Bildung von DMNA aus Nitrat und AP in dieser Tierspezies bewies. Magen- und Darmschleimhaut- DNS zeigten in allen Versuchen hohe Bindungsindizes, die auf biosynthetische Inkorporation von $^{14}\text{C}_1$ - Fragmenten zurückgeführt werden konnten. Entsprechende Kontrolllexperimente mit reinem DMA, AP und Methanol bestätigten diesen Befund.

Das angewendete Testsystem erlaubte Nitrosierstudien in vivo unter verschiedenen Bedingungen. Der durch das gebildete Nitrosamin erzeugte Schaden auf der DNS wurde gemessen. Die Alkylierung der DNS wird heute als wesentlicher Schritt bei der Induktion von Tumoren angenommen. Die Bestimmung der Methylierung von Leber-DNS durch im Magen nitrosierte Amine erwies sich deshalb als eine mögliche Methode zur Bestimmung des integralen Schadens auf der DNS durch in vivo gebildete Nitrosamine.

SUMMARY

Amines can react with nitrite to form nitrosamines under conditions met in the stomach of animals and men, but there is very little data available on the quantitative aspects of this reaction in vivo. Amines are ubiquitous dietary constituents. Nitrite is constantly formed from the reduction of nitrate by bacteria of the intestine and oral cavity. Most nitrosamines are potent carcinogens that act via covalent interactions of reactive metabolites with DNA. This genotoxicity was the endpoint for the present investigations where the methylation of DNA of various organs of rats and mice by dimethylnitrosamine (DMNA) generated in vivo from non-carcinogenic precursors dimethylamine (DMA) or aminopyrine (AP) was determined under various conditions of nitrite or nitrate administered simultaneously or by prefeeding. The experiments involved oral administration of [^{14}C] labelled amine to the animals and isolation of DNA after six hours. The radioactivity on the DNA could have been due to methylation as well as to biosynthetic incorporation of [^{14}C] carbon-1-pool precursors generated in the metabolism of the labelled chemicals. The two sources could be distinguished by HPLC of acid-hydrolysed DNA, which allowed a separation of the normal bases from the methylated purines, such as 7-methylguanine and O⁶-methylguanine. It was found that the biosynthetic incorporation of radioactivity was highest in the DNA of the small intestine. Accordingly it was never possible to detect a true methylation from a DNA-sample of intestine or stomach because of the exceedingly high radioactivity of the neighbouring normal bases. For the estimation of the fraction of the amine dose that had been converted to DMNA under various conditions, the methylation of DNA after administration of DMNA itself was taken as 100% positive control value.

The corresponding value of amine alone was taken as 0% negative control. It was verified in a first experiment that the assumed linearity of DMNA dose-binding relationship held over the dose range expected for the main experiments. By use of the endpoint described above, the nitrosation of DMA was determined after simultaneous oral administration of nitrite. It was found that 0,25-1,5% of the amine was nitrosated in the rat, 0-1,5% in the mouse. Large individual differences resulted in this experiment. Simultaneous administration of vitamine C resulted in a inhibition of DMNA formation, whereas vitamine E did not exert an inhibitory effect. Pretreatment of rats with 3'000 ppm potassium nitrate in the drinking water did not result in a measurable formation of DMNA formation. Because of the low rate of nitrosation of DMA, the subsequent studies were performed with aminopyrine. In a first experiment the rate of nitrosation was determined under various doses of nitrite in rat and mouse. A very similar dose-response curve resulted with a sigmoid shape. This shape is in agreement with the in vitro finding that the formation of nitrosamines follows the second order of the concentration of nitrite. The reaction times deduced from these results were of the order of minutes. The experiment with vitamins was repeated with this more sensitive amine. The same protective effect for vitamine C was found. Thanks to the much higher sensitivity of the experiments with AP the influence of nitrate on nitrosation was detectable in the rat. In the present study it was shown that the determination of DNA damage by nitrosamines formed in vivo is a useful method for the estimation of the nitrosation reaction. However the nitrite doses administered were much higher than is to be expected in human diet. Therefore, and also because of different gastro-intestinal physiology, an extrapolation of the results to man must await much more additional information.

DANKSAGUNGEN

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Toxikologie der ETH in Schwerzenbach unter der Leitung von Prof. Dr. Ch. Schlatter.

Für die Möglichkeit der freien Arbeitsgestaltung möchte ich ihm ebenso danken wie für die Ermöglichung des Besuches von Tagungen und Kongressen und die mir gewährte Unterstützung in allen Bereichen.

Danken möchte ich auch PD Dr. Werner Lutz für die direkte Betreuung meiner Arbeit sowie wertvolle Diskussionen und Mithilfe bei der Interpretation von Resultaten.

Elsbeth Brändle spreche ich einen speziellen Dank aus für die Mithilfe beim Behandeln der Tiere.

Prof. Dr. O. Sticher danke ich, dass er sich als Korreferent zur Verfügung gestellt hat als Vertreter der Abteilung für Pharmazie.

Meinen Arbeitskollegen der DNS- Gruppe danke ich für alle Anregungen sowohl fachlicher wie privater Art und für das angenehme Arbeitsklima, das bei uns stets herrscht.