

## Über den Nachweis elektronisch angeregter Moleküle im Zigarettenrauch

On the Detection of Electronic Excited Molecules in Cigaret Smoke

J. Stauff, G. Reske und I. Simo

Institut für physikalische Biochemie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. **28 c**, 469–470 [1973]; eingegangen am 1. März 1973)

Cigaret smoke, excited molecules, carcinogenesis

In der Diskussion über die Entstehung des Bronchialcarcinoms durch Zigarettenrauch wird häufig der Einwand gemacht, daß die im Rauch (bzw. Teer) enthaltenen Mengen von carcinogenen Kohlenwasserstoffen derart geringfügig seien, daß ein Raucher undiskutabel große Mengen von Zigaretten rauchen müßte, um den im Tierversuch ermittelten notwendigen Schwellenwert der Entstehung von Tumoren zu erreichen<sup>1–4</sup>. Andererseits kann über die Möglichkeit, daß die krebserregende Wirkung des Tabakrauchs in vollem Umfang durch andere Komponenten des Tabakrauchteers verursacht wird, keine sichere Aussage gemacht werden. Es ist weder über die Angriffsziele (Proteine, Nucleinsäuren, Lipoide) noch über den Reaktionsmechanismus der im Tabakteer enthaltenen carcinogenen Substanzen Einigkeit zu erzielen, die von allgemeiner Gültigkeit sein könnte.

Eine frühere Untersuchung, die die Reaktionsfähigkeit des 3.4-Benzpyrens mit Proteinen in wäßrigem Medium prüfen sollte, stellte fest, daß eine Einwirkung nur in Gegenwart von O<sub>2</sub> und nur über den durch Licht angeregten Zustand des Kohlenwasserstoffs stattfindet<sup>5</sup>. In einem anderen Beitrag<sup>6</sup> wurde gefunden, daß Zigarettenrauch, der mit wäßrigen Proteinlösungen in Berührung gebracht wurde, ebenfalls mit Proteinen reagiert, z. B. durch Angriff auf SH-Gruppen mit entsprechender partieller Denaturierung. Obwohl nun ein direkter Zusammenhang zwischen den Photooxidationen des 3.4-Benzpyrens und der chemischen Reaktion des Zigarettenrauchs nicht ohne weiteres hergestellt werden kann, kann die Frage gestellt werden, wie denn etwa das 3.4-Benzpyren des Zigarettenrauchs auf Proteine einwirken könnte, wenn am Reaktionsort in der wäßrigen Proteinlösung oder in den Schleimhäuten der Bronchien keine Anregung des Kohlenwasserstoff durch Licht stattfindet. Aus Tierexperimenten ist bekannt<sup>7, 8</sup>, daß sich Hautkrebs durch 3.4-Benzpyren bei Belichtung sehr viel schneller und bei ge-

ringeren Dosen entwickelt als ohne Belichtung. Eine carcinogene Wirkung des Zigarettenrauchs müßte dann entweder auf noch anderen Substanzen des Rauchteers, z. B. Phenolen<sup>9</sup>, oder auf die Kohlenwasserstoffe aktivierenden oder elektronisch anregenden Mechanismen im Organismus beruhen. Wohl können leicht verletzte (Einfrieren, Auftauen) Mitochondrien (aus Rinderherzen oder Rattenlebern) den photodynamisch wirksamen Farbstoff Acridinorange zur Lumineszenz anregen<sup>10</sup>; ob sie das gleiche auch bei 3.4-Benzpyren oder anderen carcinogenen aromatischen Kohlenwasserstoffen können, ist nur zu vermuten, da eine Überprüfung wegen der äußerst geringen Löslichkeit der Kohlenwasserstoffe bis jetzt nicht möglich war.

Einen neuen Aspekt gewinnen die Überlegungen zur Wirkung des Zigarettenrauchs, wenn die im folgenden mitgeteilten Beobachtungen berücksichtigt werden. Es konnte nämlich mit Hilfe einer Anordnung, die zur Messung der Chemilumineszenz von Gasen dient<sup>11</sup>, festgestellt werden, daß vom Zigarettenrauch eine Lichtemission von der Wellenlänge 350–600 nm ausgeht. Sie muß durch eine oder mehrere chemische Reaktionen in den Rauchpartikeln bzw. im Rauchteer erzeugt werden. Abb. 1 zeigt

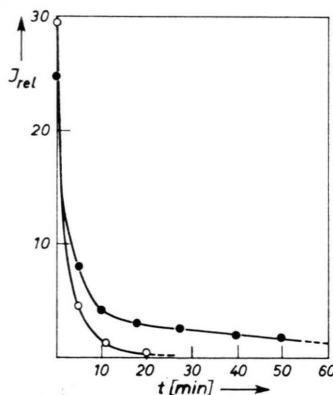


Abb. 1. Lumineszenzintensität von Zigarettenrauch  $I_{rel}$  in willkürlichen Einheiten in Abhängigkeit von der Zeit; ●-●-● a. ein Zug, anschließend Spülung der Küvette mit Luft; ○-○-○ b. nach Abrauchen einer ganzen Zigarette (400 ml/min).

die Zeitabhängigkeit der Leuchtintensität nach einem Zug und nach dem Abrauchen einer ganzen Zigarette. Beim Versuch mit einem Zug (Kurve a) wurde anschließend Luft durch die Meßküvette gesaugt. Da sich dabei die Emission nicht änderte, mußte daraus geschlossen werden, daß sie von einem Teer-Niederschlag an den Küvettenwänden herrührt. Dies wurde durch die Zugabe von Methanol oder Äthanol bestätigt. Wie Abb. 2 zeigt, steigt die Lumineszenz bei

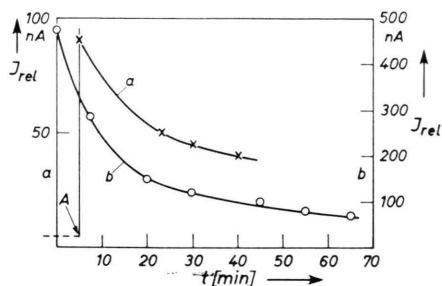


Abb. 2. Lumineszenzintensität des Zigarettenrauch-Teers (in nA des Photomultipliers) in Abhängigkeit von der Zeit:  $\times-\times-\times$  a. etwa eine Stunde alter Teer wird bei A mit Methanol versetzt, linker Maßstab,  $\circ-\circ-\circ$  b. Rauch einer Zigarette durch Dimethylphthalat geleitet, rechter Maßstab.

Zugabe von Alkohol auf das 10-fache an. Leitet man den Rauch sofort durch ein organisches Lösungsmittel, wie Dimethylphthalat, erhält man eine mit jedem „Zug“ ansteigende Lumineszenz, die beim Abschalten des Rauchstroms erst in etwa 60 min auf den zehnten Teil ihres Ausgangswertes abklingt. Eine

- <sup>1</sup> E. L. Wynder u. G. Wright, *Cancer* **10**, 255 [1957].
- <sup>2</sup> H. Druckrey, *Acta med. scand.* **170**, Suppl. 24 [1961].
- <sup>3</sup> H. Druckrey u. A. Schildbach, *Z. Krebsforsch.* **65**, 465 [1963].
- <sup>4</sup> Ph. Lazar, I. Chouroulinkov, C. Libermann u. M. Guerin, *J. nat. Cancer Inst.* **37**, 573 [1966].
- <sup>5</sup> G. Reske u. J. Stauff, *Z. Naturforsch.* **18b**, 774, [1963]; **19b**, 716 [1964].
- <sup>6</sup> G. Reske, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* **13**, 913 [1963].

Analyse der Kinetik der Lumineszenzabklingkurven ergab weder eine erste noch eine zweite Reaktionsordnung, was auf einen komplizierten Mechanismus der Erzeugung der angeregten Zustände deutet, die für die Lichtemission verantwortlich sind. Dies und die außerordentlich lange Abklingzeit lassen mit Sicherheit auf eine chemische Reaktion schließen, die erst nach dem Verbrennungsprozeß des Tabaks einsetzt. Sie muß Reaktionsschritte einschließen, die in der Lage sind, fluoreszenz- oder phosphoreszenzfähige Moleküle anzuregen.

Bei Berücksichtigung dieser Eigenschaft des Rauchteers ist damit zu rechnen, daß bei seiner Einwirkung auf biologische Substanzen auch Reaktionen elektronisch angeregter Moleküle stattfinden, wie sie sonst nur bei photochemischen Prozessen auftreten. Wegen der begrenzten Zeit, in der im Teer angeregte Moleküle erzeugt werden, müßten alle Aussagen, die aus Versuchen mit Rauchteer hergeleitet worden sind, überprüft werden, ob diese mit frischen Präparaten (bis zu etwa  $\frac{3}{4}$  Sde. alt) gemacht worden sind oder nicht.

- <sup>7</sup> J. Maisin u. A. De Jonghe, *C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées* **117**, 111 [1934].
- <sup>8</sup> L. Santamaria, G. G. Giordano, M. Alfisi u. F. Cascione, *Nature [London]* **210**, 824 [1966].
- <sup>9</sup> B. L. Van Duuren, A. Sivak, A. Segal, L. Orris u. L. Langseth, *J. Nat. Cancer Inst.* **37**, 519 [1966].
- <sup>10</sup> J. Stauff u. J. Ostrowski, *Z. Naturforsch.* **22b**, 734 [1967].
- <sup>11</sup> J. Stauff u. H. Fuhr, *Z. Naturforsch.* **26b**, 259 [1971].

## Plating Efficiency of Protoplasts of Tobacco in Different Light Conditions

Gisela Enzmann-Becker

Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Melchers, Tübingen

(*Z. Naturforsch.* **28c**, 470–471 [1973]; received May 5, 1973)

Protoplasts, intensity of light, calli, tobacco

Today there appears to exist no real difficulty for the isolation of protoplasts of plant cells. Protoplasts have been successfully cultured and have produced callus masses which can regenerate into whole plants<sup>1</sup>. The conditions which proved to be suitable for the cultivation of protoplasts to calluses depend on the plant material (variety, growth conditions,

age of leaves a. s. o.), the culture medium, temperature and light conditions. We found that dimlight, especially in the first two days after isolation, increases the plating efficiency.

The protoplasts were isolated from leaves of *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" which were cultivated in a greenhouse with additional illumination (Osram Fluora; 21–8 o'clock) in autumn and winter. The leaves which had most recently expanded were used. The sterilized leaf pieces<sup>2</sup> were pre-incubated with pectin-glycosidase from *Aspergillus*, Rohament P\* (Röhm GmbH, Darmstadt) as described<sup>3</sup>. The further isolation followed the two-step method<sup>4</sup>. The liberated cells were counted and the resulting number of the protoplasts per ml of medium was calculated (counts made with a haemocytometer). The cells were plated in agar with the medium described by Nagata and Takebe (1971)<sup>2</sup> and cultivated in a

Requests for reprints should be sent to Dipl.-Biol. G. Enzmann-Becker, Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Melchers, D-7400 Tübingen, Corrensstr. 41.

\* Sincere thanks are due to Röhm GmbH for the donation of the enzyme Rohament P and to Osram GmbH for a gift of fluorescence tubes.