

Aus dem Walther-Straub-Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. T. Gudermann

**Untersuchung von DNA-Addukten tabakspezifischer
Nitrosamine in Pankreasgewebe in Abhängigkeit von der
Nikotin- und Myosminbelastung durch Rauchen
und rauchlose Tabakwaren**

Dissertation zum
Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von
Heike Eggert
aus
München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Elmar Richter

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Oliver Peschel
Priv. Doz. Dr. Beatrice Bachmeier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2011

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Krebserkrankungen	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Krebsentstehung durch chemische Kanzerogenese.....	4
1.1.3 Pankreaskrebs	6
1.1.3.1 Anatomie und Histologie des Pankreas	6
1.1.3.2 Funktion des Pankreas.....	7
1.1.3.3 Pathologie von Pankreastumoren.....	9
1.1.3.4 Pankreaskrebsvorkommen in Deutschland, Schweden und der Welt	10
1.1.3.5 Diagnose und Therapie von Pankreaskrebs.....	13
1.1.3.6 Rauchen und weitere Risikofaktoren von Pankreaskrebs	15
1.2 Tabakspezifische Nitrosamine	18
1.2.1 Entstehung der tabakspezifischen Nitrosamine.....	18
1.2.2 Metabolismus von NNK und NNN	20
1.2.2.1 Reduktion von NNK zu NNAL.....	21
1.2.2.2 N-Oxidation von NNK und NNAL	21
1.2.2.3 α -Hydroxylierung von NNK und NNAL.....	21
1.2.2.4 Speziesunterschiede im NNK-Metabolismus	22
1.2.2.5 Metabolismus von NNN.....	23
1.2.3 Krebsentstehung durch TSNA im Tierversuch.....	24
1.3 Schwedischer Snus	26
1.3.1 Definition	26
1.3.2 Herstellung und Inhaltstoffe.....	27
1.3.3 Gesundheitsrisiken.....	28
1.3.4 Snus als Zigarettenersatz – Pro und Kontra	30
1.4 Biomonitoring der Belastung mit Tabak und Tabakrauch	31
1.4.1 Tabakalkaloide	32
1.4.2 Tabakspezifische Nitrosamine.....	33

2	Material und Methoden	36
2.1	Material	36
2.1.1	GC-MS-Systeme	36
2.1.2	Laborgeräte.....	36
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	37
2.1.4	Chemikalien	38
2.1.5	Reagenzien	39
2.2	Methoden	41
2.2.1	Gewinnung des humanen Probenmaterials.....	41
2.2.1.1	Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin München	41
2.2.1.2	Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin Solna, Stockholm	42
2.2.2	Untersuchung des Pankreasgewebes auf HPB-freisetzung DNA-Addukte	43
2.2.2.1	Isolierung der DNA.....	43
2.2.2.2	Gehaltsbestimmung und Reinheitsprüfung der DNA	43
2.2.2.3	Saure Hydrolyse der DNA und Extraktion von HPB.....	44
2.2.2.4	Derivatisierung von HPB	45
2.2.2.5	Validierung der HPB-Analytik	46
2.2.3	Diol-Analytik	47
2.2.3.1	Zweifache Derivatisierung von Diol	47
2.2.3.2	Extraktion des Diols.....	49
2.2.3.3	Validierung der Diol-Analytik	50
2.2.4	Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin.....	50
2.2.4.1	Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin aus Urin und Blutplasma	51
2.2.4.2	Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin aus Zehennägeln.....	52
2.2.5	GC-MS-Analysen	53
2.2.5.1	GC-MS-Analyse zur HPB-Bestimmung	53
2.2.5.2	GC-MS-Analyse zur Diol-Bestimmung.....	56
2.2.5.3	GC-MS-Analyse zur Cotinin-, Nikotin- und Myosminbestimmung	57
2.2.6	Statistik	58

3	Ergebnisse	60
3.1	Herkunft und Charakterisierung des humanen Probenmaterials	60
3.1.1	Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin München	60
3.1.2	Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin Solna, Stockholm	62
3.2	Untersuchung des humanen Pankreasgewebes auf HPB-freisetzende DNA-Addukte	63
3.2.1	Isolierung und Bestimmung der DNA aus Pankreasgewebe	63
3.2.2	Analytik von HPB	66
3.2.2.1	Identifizierung von HPB	66
3.2.2.2	Bestimmung von Linearität, Nachweisgrenze und Wiederfindung	67
3.2.2.3	Untersuchung auf HPB-freisetzende DNA-Addukte	69
3.3	Methodenentwicklung der Diol-Analytik	70
3.3.1	Versuche mit einfach derivatisiertem Diol	70
3.3.2	Identifizierung des zweifach derivatisierten Diols	72
3.3.3	Optimierung der Diol-Derivatisierung	74
3.3.4	Versuche zur Extraktion des Diols	76
3.3.5	Validierung der Diol-Analytik	79
3.4	Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin	80
3.4.1	Identifizierung von Cotinin, Nikotin und Myosmin	80
3.4.1.1	Fragmentierung von Cotinin	80
3.4.1.2	Fragmentierung von Nikotin	81
3.4.1.3	Fragmentierung von Myosmin	81
3.4.2	Validierungsergebnisse der Methoden zur Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin aus verschiedenen Biomatrices	82
3.4.3	Cotinin, Nikotin und Myosmin in Zehennägeln	83
3.4.4	Cotinin, Nikotin und Myosmin in Plasma	87
3.4.5	Cotinin, Nikotin und Myosmin in Urin	91
3.4.6	Vergleich der Nikotinoidkonzentrationen in Plasma und Urin	94

4	Diskussion	96
4.1	Beurteilung der analytischen Methoden zur Bestimmung von HPB- und Diol- freisetzenden DNA-Addukten	96
4.2	Untersuchung des humanen Pankreasgewebes auf HPB-freisetzende DNA- Addukte	98
4.3	Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin	103
4.3.1	Cotinin, Nikotin und Myosmin in Zehennägeln.....	103
4.3.2	Cotinin, Nikotin und Myosmin in Plasma.....	105
4.3.3	Cotinin, Nikotin und Myosmin in Urin.....	108
5	Zusammenfassung	111
6	Literaturverzeichnis	113
7	Anhang	130
7.1	Fragebogen für die Rechtsmedizin in München	130
7.2	Fragebogen und Sammelanleitung für die Rechtsmedizin in Stockholm	131
7.3	Tabellen	133
	Danksagung	138

Abkürzungen

11 β -HSD-1	11 β -Steroiddehydrogenase Typ 1
ACN	Acetonitril
AUC	Area under the curve
BMI	Body Mass Index
BTM	Betäubungsmittel
CA	Karzinom
CI	Chemische Ionisation
DCM	Dichlormethan
df	Filmdicke
Diol	1-(3-Pyridyl)-1,4-butandiol
DMAP	4-N,N-Dimethylaminopyridin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ETS	Environmental tobacco smoke
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HPB	4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon
HS	Hauptstromrauch
HWZ	Halbwertszeit
IARC	International Agency for Research on Cancer
ID	Innendurchmesser
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
iso-NNAC	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure
iso-NNAL	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol
ISTD	Interner Standard
KHK	Koronare Herzkrankheit
LOD	Limit of Detection, Nachweisgrenze
LOQ	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.d.	nicht detektierbar
NAB	N'-Nitrosoanabasin
NAT	N'-Nitrosoanatabin

VI

NDMA	<i>N</i> -Nitrosodimethylamin
NICI	negative ion chemical ionisation
NNA	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butanal
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol [nicotine-derived nitrosamino alcohol]
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon [nicotine-derived nitrosaminoketone]
NNN	<i>N</i> '-Nitrosornikotin
NS	Nebenstromrauch
oD	optische Dichte
PA	Pivalinsäureanhydrid
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PFBC	Pentafluorobenzoylchlorid
PEITC	Phenylethylisothiocyanat
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
R ²	Bestimmtheitsmaß der linearen Regression
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SE	Standard Error, Standardfehler
SIM	Single Ion Monitoring
SIR	Single Ion Recording
SPE	Solid Phase Extraktion, Festphasenextraktion
TMA	Trimethylamin
Trp.	Tropfen
TSNA	tabakspezifische Nitrosamine
UV/VIS	Spektralphotometrie mit ultravioletterem und sichtbarem Licht
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

1.1.1 Epidemiologie

Jedes Jahr wird bei 3,2 Millionen Europäern eine Krebserkrankung diagnostiziert und mehr als 1,7 Millionen sterben daran. Deutschland nimmt im europäischen Vergleich einen mittleren Rang ein. Niedrige Erkrankungsraten verzeichnen die südeuropäischen Länder Spanien, Griechenland und Portugal. Schätzungen zufolge erkrankten im Jahr 2008 in Deutschland fast 480.000 Menschen an Krebs [1]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 68 Jahren und für Männer bei 69 Jahren. Das Risiko einer Frau im Laufe ihres Lebens an Krebs zu erkranken, beträgt etwa 38 %, das eines Mannes 47 % [2].

Für Männer ist im Vergleich zu vorangegangenen Schätzungen die Neuerkrankungsrate von Lungenkrebs deutlich zurückgegangen. Lungenkrebs ist damit nicht mehr, wie in früheren Jahren, die häufigste Krebserkrankung. Mit 34.640 neu erkrankten Männern nimmt der Prostatakrebs im Jahr 2008 den dritten Platz in der Rangfolge der häufigsten Krebskrankheiten ein. Mit geschätzten 70.790 Neuerkrankungen belegt der Prostatakrebs Platz eins und der Darmkrebs mit 38.020 Neuerkrankungen Platz zwei (Abbildung 1-1).

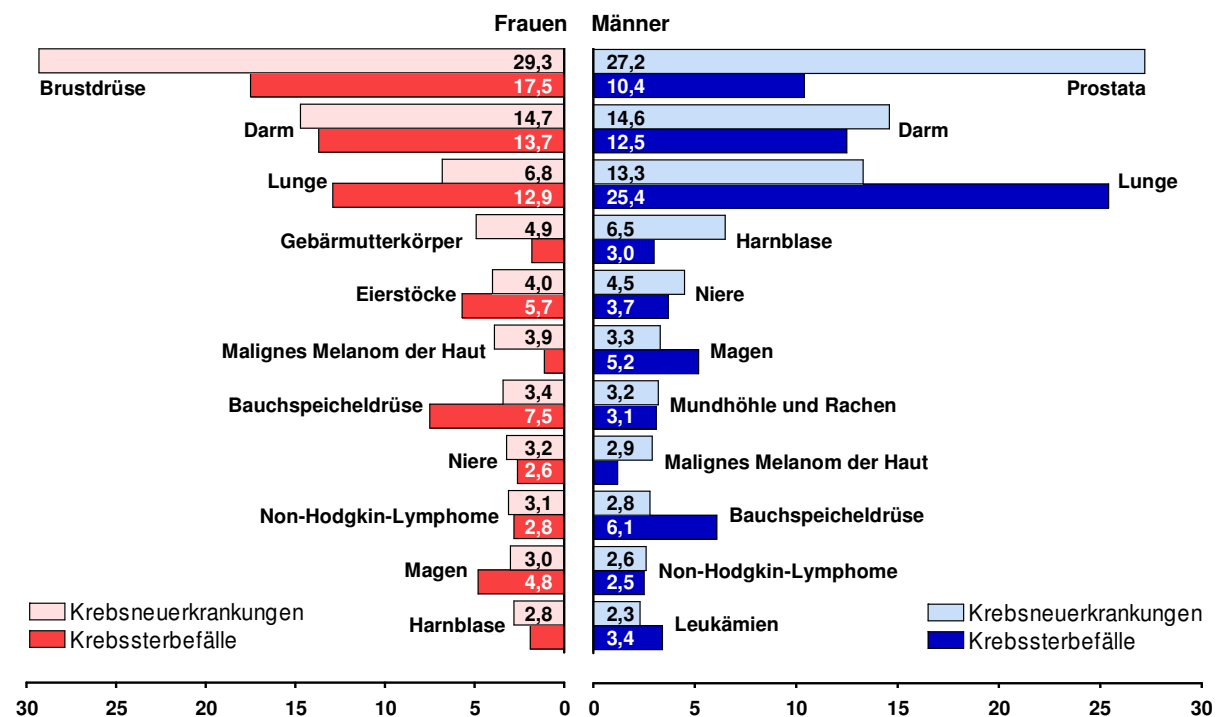


Abbildung 1-1: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen und Krebssterbefällen in Deutschland 2008 [1]

Die häufigste Krebserkrankung der Frau ist schon seit einigen Jahren der Brustdrüsenkrebs. Im Jahr 2008 wurde bei 64.150 deutschen Frauen diese Krebsart diagnostiziert. Dank einer immer früheren Erkennung durch Mammographie-Screening ist ein Rückgang der Mortalität zu verzeichnen. Darmkrebs nimmt bei den Frauen mit 32.320 neuen Fällen pro Jahr, wie auch bei den Männern, den zweiten Platz der häufigsten Krebserkrankungen ein. Die Zunahme von Lungenkrebs bei Frauen hat sich mit inzwischen 14.930 jährlichen Neuerkrankungen fortgesetzt und belegt damit den dritten Platz der häufigsten Krebsneuerkrankungen [1,2].

Krebs stellt in Deutschland nach Erkrankungen des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache dar. Jeder vierte Todesfall ist auf eine Krebserkrankung zurückzuführen (Tabelle 1-1). Die Statistik der Todesursachen basiert auf den Angaben der ärztlichen Todesbescheinigungen.

Tabelle 1-1: Die häufigsten Todesursachengruppen in Deutschland 2008 [3]

Todesursache	Anzahl	Anteil in Prozent
Kreislaufsystem	356.729	42,2
Krebs	216.010	25,6
Atmungsorgane	59.049	7,0
Verdauungssystem	43.686	5,2
Unfälle	31.480	3,7
Sonstige	137.485	16,3
Gesamt	844.439	100,0

Die Zahl der jährlichen Krebsneuerkrankungen hat in den letzten 20 Jahren bei Frauen um ca. 35 %, bei Männern um etwa 80 % zugenommen. Eine Ursache hierfür ist eine zunehmend älter werdende Gesellschaft in Deutschland. Durch verbesserte Früherkennungsmaßnahmen und Therapiekonzepte sanken jedoch die Krebssterberaten für Frauen und Männer gleichermaßen um mehr als 20 %.

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten variieren je nach Krebsart von sehr günstigen Raten für das maligne Melanom oder den Prostatakrebs mit etwa 90 % bis hin zu sehr ungünstigen Raten unterhalb von 20 % für Lungenkrebs oder Speiseröhrenkrebs und sogar von weniger als 10 % für Bauchspeicheldrüsenkrebs. Die durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensraten aller Krebsarten liegen für Frauen zwischen 61 % und 62 %, für Männer zwischen 54 % und 57 % [2].

Mehr als ein Drittel aller Krebserkrankungen in Deutschland sind ernährungsbedingt (Abbildung 1-2). Ein geringer Verzehr von Obst und Gemüse sowie regelmäßiger Alkoholkonsum spielen heute vermutlich eine wichtigere Rolle als Schadstoffe oder Verunreinigungen in Lebensmitteln. Dennoch fand man durch epidemiologische Studien eine positive Korrelation zwischen der Nitrit- und Nitrosaminaufnahme und Krebsarten des Gastrointestinaltrakts, sowie zwischen dem Verzehr von Fleisch- und Wurstwaren und Speiseröhren- und Magenkrebs [4,5]. Nitrosamine können in zahlreichen Lebensmitteln tierischer Herkunft nachgewiesen werden. So enthält beispielsweise Salami bis zu 80 µg/kg N-Nitrosodimethylamin (NDMA). Durch das Braten von Fleischwaren kann der Nitrosamingehalt noch gesteigert werden [6].

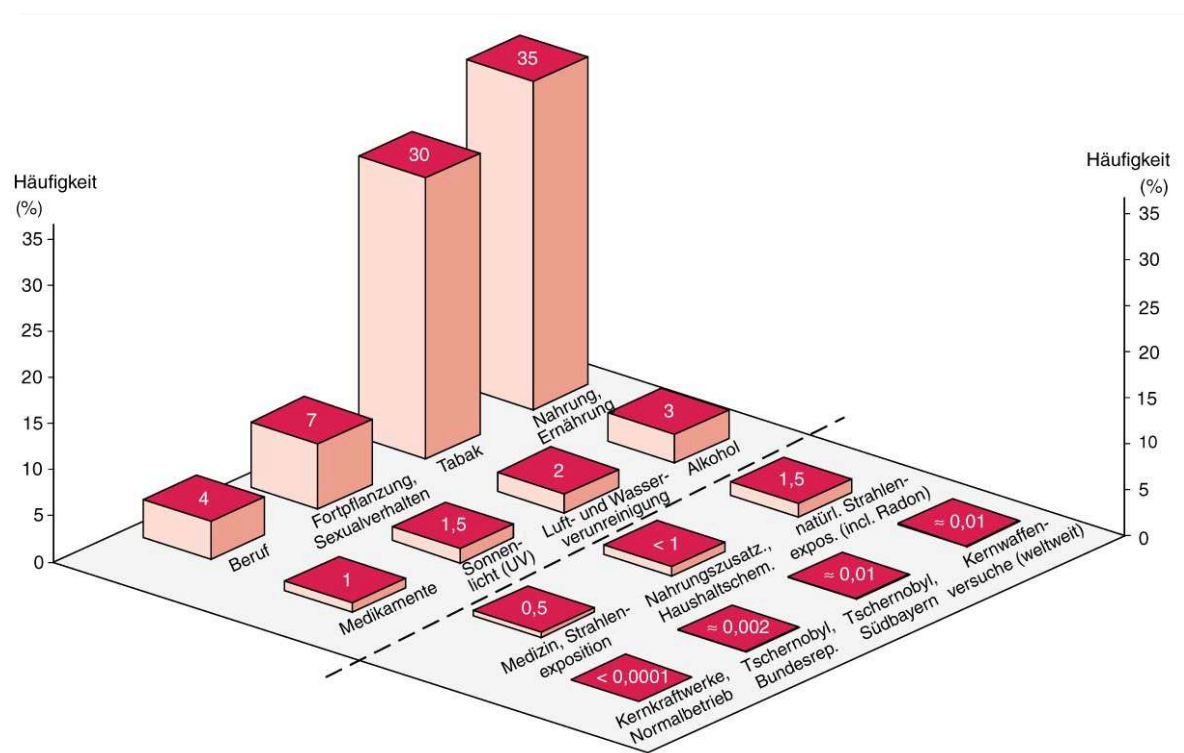


Abbildung 1-2: Übersicht der wesentlichen Ursachen für Krebskrankheiten in hoch entwickelten Industrieländern [7]

Die wissenschaftlichen Empfehlungen zu einer „Anti-Krebs-Ernährung“ beschreiben eine kalorienarme, ballaststoffreiche Ernährung mit wenig rotem Fleisch und raffiniertem Zucker, dafür vielen Antioxidantien und sekundären Pflanzenstoffen aus einem hohen Obst- und Gemüseanteil der Nahrung. Mögliche Nährstoffmängel von Selen, Vitamin B₁₂, Folsäure oder Vitamin D sollten ausgeglichen werden [8].

Ein vermeidbarer Risikofaktor, der etwa ein Drittel aller Krebsfälle verursacht, ist der Konsum von Tabak. Insbesondere das Zigarettenrauchen kann neben Lungenkrebs noch eine Vielzahl anderer Krebsarten auslösen [9]. Andere Risikofaktoren für speziel-

le Krebsarten stellen beispielsweise Virusinfektionen, Expositionen am Arbeitsplatz oder Sonnenstrahlung dar [2,7].

1.1.2 Krebsentstehung durch chemische Kanzerogenese

Bisher wurden mehr als 2000 natürliche und zivilisationsbedingte Stoffe identifiziert, die im Tierversuch Krebs erzeugen können. Hierzu gehören beispielsweise Kanzerogene aus der Zigarette und aus der Nahrung. Alle Verbindungen, die im Tierexperiment krebserregend sind, gelten auch für den Menschen als potentielle Krebsauslöser. Krebsentstehung ist durch eine lange Latenzphase gekennzeichnet. Zwischen Einwirken des Kanzerogens und der klinischen Manifestation einer Krebserkrankung können bis zu 40 Jahre vergehen [7,10].

Die Induktion benigner und maligner Tumoren durch chemisch definierte Stoffe wird als chemische Kanzerogenese bezeichnet. Das Mehrstufenkonzept der chemischen Kanzerogenese ist in Abbildung 1-3 dargestellt. Sie wird in drei Phasen gegliedert: Initiation, Promotion, Progression.

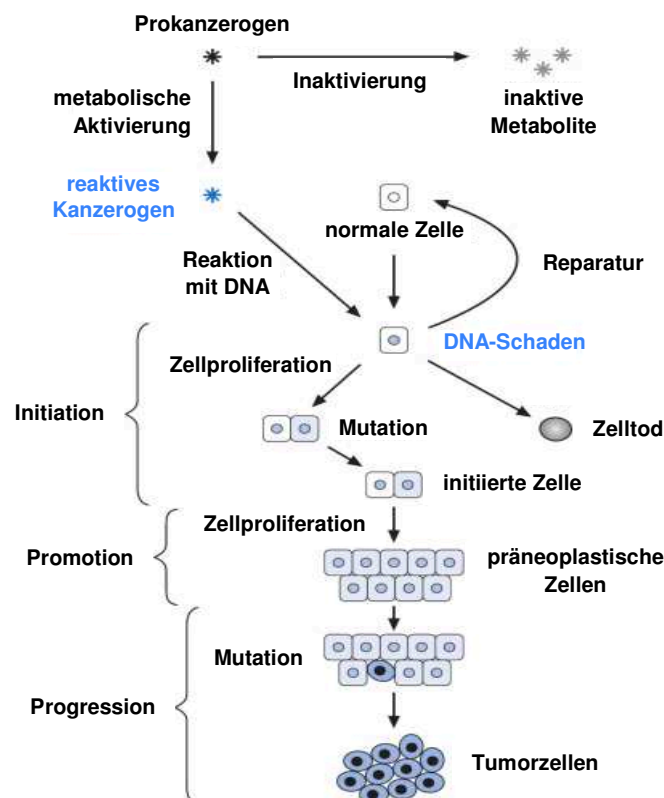


Abbildung 1-3: Mehrstufenkonzept der chemischen Kanzerogenese [11]

Die Initiation beschreibt die irreversible Veränderung des genetischen Materials, die an die Tochterzelle weitergegeben wird. Während der Promotion wird durch Einwirken von Promotoren das Zellwachstum angeregt, es entsteht zunächst ein gutartiger

Tumor. Bei starken Kanzerogenen z.B. aus den Stoffklassen der Nitrosamine, aromatischen Amine und polyzyklischen Kohlenwasserstoffe handelt es sich um vollständige Kanzerogene. Sie bedürfen keiner weiteren Promotoren, um eine Tumorbildung auszulösen, da sie selbst initiierend und promovierend wirken. Die Umwandlung des Tumors in seine maligne Form geschieht während der Progressionsphase, in der die Wachstumsautonomie und das Metastasierungspotenzial zunehmen [10,11].

Tumorinitiatoren sind entweder selbst chemisch aktiv (sog. direktes Kanzerogen) oder sie werden als indirektes Kanzerogen durch den Stoffwechsel metabolisch aktiviert und in eine reaktive Zwischenstufe (ultimales Kanzerogen) umgewandelt. Letzteres trifft beispielsweise für tabakspezifische Nitrosamine (TSNA) zu. Sie werden vor allem durch Beteiligung von verschiedenen Cytochrom P450-Isoenzymen über α -Hydroxylierung metabolisch aktiviert. Durch die unterschiedliche Enzymausstattung verschiedener Gewebe ergibt sich unabhängig vom Ort der Applikation eine Organspezifität der Nitrosamine für die Tumorentstehung [12]. Häufig sind es elektrophile Mutagene, die zu einem Reaktionsprodukt mit DNA-Basen führen, so auch im Falle der TSNA [13,14].

Abbildung 1-4 zeigt die wichtigsten Angriffspunkte für nukleophile Agenzien an den DNA-Basen. Aktive Positionen zur Adduktbildung stellen dabei besonders die Stickstoff- und Sauerstoffgruppen dar, bekannt sind jedoch auch Reaktionen an Phosphat- und Desoxyribosegruppen [11,15].

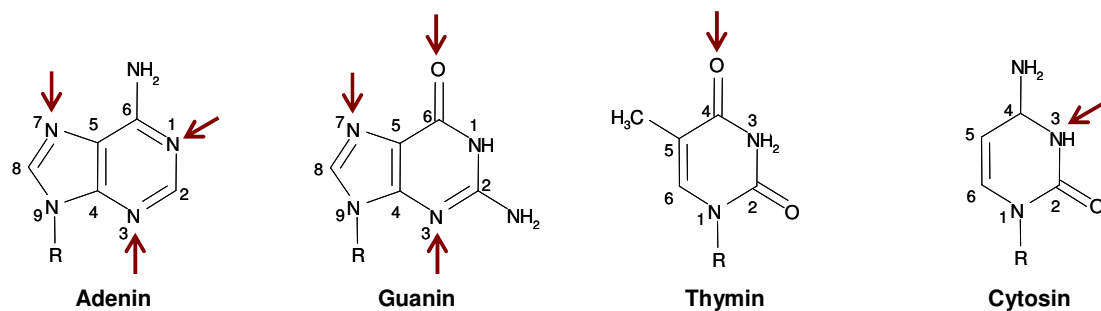


Abbildung 1-4: DNA-Basen mit bevorzugten nukleophilen Alkylierungsstellen

Eine DNA-Basenmodifikation, die bei einer späteren Replikation zu Mutationen führen kann, wird als prämutagene Läsion bezeichnet. Im Gegensatz zu einer eher harmlosen Alkylierung an der N7-Position des Guanins, stellt O⁶-Alkylguanin eine wichtige prämutagene Läsion dar.

Viele DNA-Schäden bleiben ohne Folgen, da sie meist schnell und fehlerfrei durch DNA-Reparaturmechanismen behoben werden [16,17]. Zellen mit nicht behobenen

DNA-Schäden sterben häufig aufgrund einer fehlerhaften Proteinbiosynthese oder werden an Kontrollpunkten des Zellzyklus als defekt erkannt und durch Apoptose eliminiert. Kommt es jedoch zu Veränderungen von Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen (z.B. p53), kann die Zellzyklus-überwachende Funktion nicht mehr korrekt erfüllt werden. Die folgenden Zellgenerationen erwerben krebstypische Fähigkeiten wie Gewebeinvasion, Unsterblichkeit durch Umgehen der Apoptose, Angiogenese und Metastasierung [11,18].

DNA-Addukte stellen ein wichtiges Instrument des Biomonitorings dar. Als Biomarker des biochemischen Effekts sind sie frühe Reaktionsprodukte eines Fremdstoffs mit der Erbsubstanz. Die Untersuchung von DNA-Addukten in verschiedenen Organen nach Exposition mit einem kanzerogenen Adduktbildner oder dessen Vorstufen liefert wertvolle Hinweise auf die jeweilige Organspezifität.

1.1.3 Pankreaskrebs

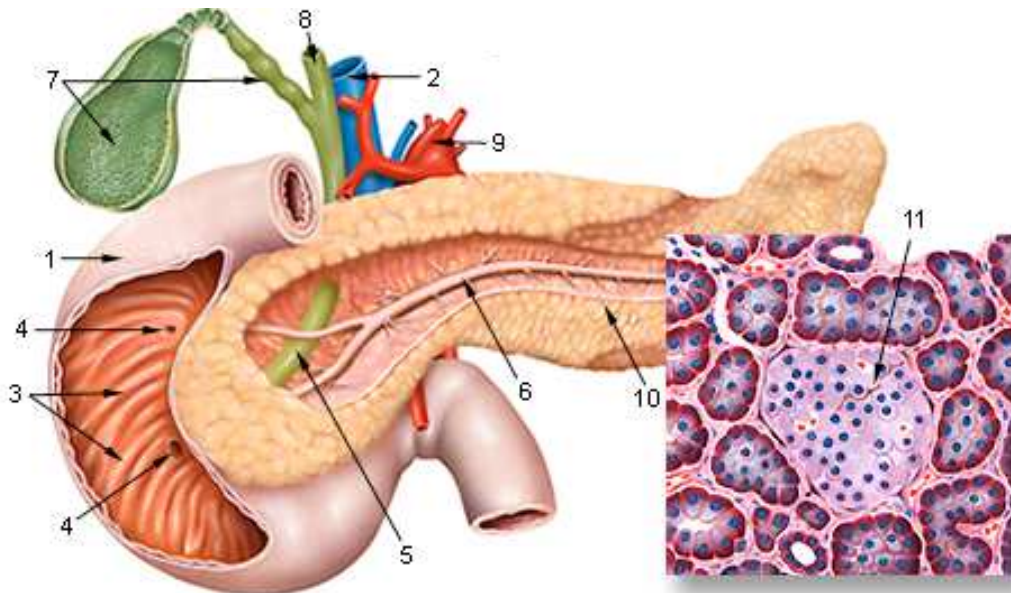
1.1.3.1 Anatomie und Histologie des Pankreas

Das Pankreas (gr. pán: ganz, kréas: Fleisch) ist ein keilförmiges, 70 bis 100 g schweres Drüsenorgan von etwa 15 cm Länge, 4 cm Breite und 1 bis 2 cm Dicke. Es befindet sich im Oberbauch hinter dem Magen und erstreckt sich zwischen Duodenum und Milz. Man unterscheidet makroskopisch drei Anteile: den Pankreaskopf (*Caput pancreatis*), den Pankreaskörper (*Corpus pancreatis*) und den Pankreasschwanz (*Cauda pancreatis*). Der Pankreaskopf liegt in der Konkavität der Duodenalschleife und lässt sich durch die Pankreaseinkerbung (*Incisura pancreatis*) deutlich vom Pankreaskörper abgrenzen. Der Pankreaskörper geht ohne scharfe Grenze in den Pankreasschwanz über (Abbildung 1-5).

Das gesamte Organ wird der Länge nach von dem 2 mm weiten Hauptbauchspeichelgang (Wirsung-Gang, *Ductus pancreaticus*) durchzogen, welcher meist gemeinsam mit dem Gallengang ins Duodenum mündet. Durch einen Schließmuskel (*M. sphincter ductus pancreatici*) wird der Rückfluss von Darminhalt und Galle verhindert. Häufig befindet sich im Kopfteil noch ein Nebenbauchspeichelgang (Santorini-Gang, *Ductus pancreaticus accessorius*), der entweder in den Hauptbauchspeichelgang mündet oder direkt das Duodenum erreicht [19].

Das Pankreas ist von einer dünnen Bindegewebskapsel umgeben, die in Septen ins Innere des Organs führt und so die dicht gepackten Drüsenläppchen voneinander trennt. Die Oberfläche ist sicht- und tastbar klein gelappt. Die Hauptmasse des

Organs besteht aus exokrinem Drüsengewebe, welches einen alkalischen, enzymreichen Verdauungssaft produziert. Die endokrinen, hormon-produzierenden Zellen machen dagegen nur etwa 2 % der Organmasse aus und liegen in kleinen Gruppen als Inselorgan verstreut im exokrinen Drüsengewebe. Regelmäßig treten einzelne Vater-Pacini-Körperchen (schnell adaptierende Mechanorezeptoren) auf [20,21].



1 = Duodenum, 2 = untere Hohlvene (V. cava inferior), 3 = Ringfalten (Plicae circulares), 4 = große und kleine Mündungsstelle (Papilla duodeni major et minor), 5 = Gallengang (Ductus choledochus), 6 = Hauptbauchspeichelgang (Ductus pancreaticus), 7 = Gallenblase mit Gallengang, 8 = gemeinsamer Lebergang (Ductus hepaticus communis), 9 = Bauchaorta (Aorta abdominalis), 10 = Pankreas, 11 = Pankreasinseln

Abbildung 1-5: Pankreas mit Gangsystem und Duodenum [22]

1.1.3.2 Funktion des Pankreas

Der exokrine Anteil der Bauchspeicheldrüse bildet als rein seröse Drüse pro Tag etwa ein bis zwei Liter farblosen Pankreassaft, ein isoosmotisches, dünnflüssiges und bicarbonatreiches Sekret von pH 8,0-8,3, das über 20 verschiedene Verdauungsenzyme enthält. Über das Ausführungssystem wird es in das Duodenum abgegeben. Die Sekretion der tubuloaziniären Endstücke (sog. Azini) wird neuronal durch den Parasympathikus und hormonell durch das gastrointestinale endokrine System gesteuert. Das Hormon Cholezystokinin wird im Dünndarm produziert und durch den Stimulus von essentiellen Aminosäuren, Fettsäuren und Magensäure freigesetzt. Es fördert neben der Synthese von Pankreasenzymen auch die Abgabe von Gallenflüssigkeit aus der Gallenblase. Ein weiteres Hormon, Sekretin, stimuliert die Bildung von bicarbonatreichen, alkalischen Pankreassaft. Es wird im Dünndarm gebildet und durch den Reiz von Magensäure freigesetzt.

Die Azini produzieren lipolytische (Lipase, Phospholipase A, Cholesterinase), amylotische (Amylase), Nukleinsäure-spaltende (Ribonuklease, Desoxyribonuklease) und mehrere proteolytische Enzyme, zu denen Exopeptidasen (Carboxypeptidasen, Aminopeptidasen, Elastase) und Endopeptidasen (Trypsin, Chymotrypsin) gehören. Alle Pankreasenzyme dienen der Verdauung. Ihr pH-Optimum liegt im alkalischen Bereich. Durch die Sekretion der proteolytischen Enzyme als inaktive Vorstufen (sog. Zymogene) und die Synthese von Proteaseinhibitoren wird eine Autodigestion verhindert [21].

Das endokrine Pankreas wird durch mehr als eine Million Langerhans-Inseln repräsentiert, welche vor allem im Pankreasschwanz lokalisiert sind. Man unterscheidet dabei fünf verschiedene Zellformen:

- Alphazelle (A₂-Zelle, Glukagonozyt):

Die A₂-Zellen sind in der Inselperipherie lokalisiert und machen etwa 20 % der Zellen aus. Hier wird das Peptidhormon Glukagon gebildet und als Sekretgranula gespeichert. Die Freisetzung erfolgt bei Hypoglykämie und Aktivierung des Sympathikus. Glukagon mobilisiert Kohlenhydrate aus der Leber, erhöht langfristig den Blutzucker und wirkt damit als Gegenspieler des Insulins.

- Betazelle (B-Zelle, Insulinozyt):

Die B-Zellen liegen im Inselzentrum und stellen mit 70 % den größten Anteil der Zelltypen dar. Hier findet die Synthese von Insulin statt. Durch einen Anstieg der Blutglukosekonzentration, die Aktivierung des Parasympathikus oder einigen Enterohormonen wird Insulin ausgeschüttet und fördert durch Translokation von Glukosetransportern die Aufnahme und Verwertung von Glukose in verschiedenen Geweben wie Muskulatur und Fettzellen. Es senkt den Blutglukosespiegel und bewirkt den Aufbau von Glykogen in Muskeln und Leber. Durch Noradrenalin wird die Insulin-Freisetzung gehemmt.

- C-Zelle:

Die C-Zellen stellen inaktive Vorstufen von B-Zellen dar, besitzen keine Granula und sollten nicht mit den C-Zellen der Schilddrüse verwechselt werden.

- Delta-Zelle (D-Zelle, A₁-Zelle):

D-Zellen produzieren das Peptidhormon Somatostatin, das vor allem parakrin als Inhibitor auf die A₂-Zellen und in hohen Konzentrationen auch auf die B-Zellen wirkt. Zusätzlich hemmt es die exokrine Pankreasfunktion. Es wird während der Verdauung ausgeschüttet.

- PP-Zelle:

Die PP-Zellen bilden das Pankreaspolypeptid. Es hemmt die Salzsäuresekretion im Magen und stellt damit einen Gegenspieler des Gastrins dar.

1.1.3.3 Pathologie von Pankreastumoren

Der Überbegriff Pankreastumor umfasst eine Vielzahl von klinisch und histologisch unterschiedlichen Neoplasien, die ihren Ursprung in der Bauchspeicheldrüse haben. Eine grobe Einteilung bietet die Unterscheidung von Tumoren, die von exokrinem oder endokrinem Pankreasgewebe stammen. Etwa 95 % der Pankreasneoplasien gehen vom exokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse aus. Die wichtigsten exokrinen Pankreasneoplasien und ihre relative Häufigkeit zeigt Tabelle 1-2. Das duktales Adenokarzinom stellt dabei mit Abstand den größten Vertreter dieser Gruppe dar, wodurch es häufig mit dem Ausdruck Pankreaskarzinom gleichgesetzt wird. Es handelt sich um einen hochmalignen, epithelialen Tumor, der sich durch atypische gangartige Drüsenstrukturen mit Schleimproduktion auszeichnet. Die atypischen Drüsen wachsen interstitiell in das Pankreasgewebe ein und induzieren in ihrer Umgebung eine Desmoplasie (Bildung von Bindegewebe). Histologische Varianten des duktales Adenokarzinoms sind z.B. das adenosquamöse Karzinom (atypische Drüsen- und Plattenepithelbildungen), das muzinöse nichtzystische Karzinom (atypische Drüsenstrukturen mit starker Schleimbildung) und das anaplastische (undifferenzierte) Karzinom.

Tabelle 1-2: Einteilung der exokrinen Pankreasneoplasien [23]

Tumortyp	Häufigkeit [%]
benigne Tumoren	
seröses Zystadenom	1
maligne Tumoren	
duktales Adenokarzinom mit Varianten	92
intraduktales papillär-muzinöses Karzinom	2
muzinöses Zystadenom	1
Azinuszellkarzinom	1
andere Tumoren	3

Rund 70 % der Pankreaskarzinome entstehen im Pankreaskopf, 20 % im Pankreaskörper und nur 10 % im Pankreasschwanz. Bei der Diagnosestellung sind Tumoren, die im Pankreaskopf lokalisiert sind, meist zwischen zwei und fünf Zentimeter groß. Pankreaskörper- und Schwanztumoren sind im Vergleich dazu häufig größer und haben

bereits zu Lebermetastasen oder einer Peritonealkarzinose geführt. Morphologisch zeichnet sich das duktale Adenokarzinom durch eine feste Konsistenz und grau-gelbliche Farbe ab. Durch das Fehlen einer Kapsel ist der Tumor unscharf begrenzt und breitet sich lymphogen und perineural in das peripankreatische retroperitoneale Fettgewebe aus. Die ersten Metastasen der Pankreaskopftumoren bilden sich in den regionären Lymphknoten und in der Leber [23].

Zu den deutlich selteneren endokrinen Tumoren zählen Insulinome, Gastrinome, Glukagonome, VIPome (Werner-Morrison-Syndrom) und das Karzinoid, welches durch eine niedrige Malignität gekennzeichnet ist. Das Insulinom ist ein üblicherweise benignes, Insulin-produzierendes Adenom der Betazellen. Klinisch macht es sich durch wiederholte Hypoglykämien bemerkbar. Zur Hemmung der Insulinsekretion wird der Kaliumkanalöffner Diazoxid oder das synthetische Somatostatin-Analogon Octreotid gegeben. Die bevorzugte Behandlungsmethode ist jedoch die operative Entfernung. Das Gastrinom (Zollinger-Elison-Syndrom) ist ein gastrinbildender, häufig maligner Tumor, der meist in der Bauchspeicheldrüse und seltener im oberen Abschnitt des Dünndarms auftritt und eine Überproduktion von Magensäure bewirkt. Das Glukagonom zeichnet sich durch die Bildung des Hormons Glukagon aus. Klinisch fallen ein Diabetes mellitus und nekrotisierende Hautveränderungen auf [24].

1.1.3.4 Pankreaskrebsvorkommen in Deutschland, Schweden und der Welt

Die Grundlage für die Epidemiologie von Pankreaskrebs stellt die ärztliche Meldung dieser Erkrankung als ICD-10-Code C25 bei den zuständigen Krebsregistern dar. Anhand der gesammelten Daten können Aussagen zu Mortalität und Inzidenz, der zeitlichen Entwicklung (Trends) und der mittleren Überlebenszeit getroffen werden. Die Kodierung „C25.“ bezeichnet bösartige Neubildungen des Pankreas und dessen verschiedene Lokalisationen (Tabelle 1-3).

In Deutschland stellt Pankreaskrebs nach Darm- und Magenkrebs die dritthäufigste Krebserkrankung der Verdauungsorgane dar. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird bei Frauen auf etwa 7.410 geschätzt, bei Männern auf etwa 7.270. Bei Frauen hat Pankreaskrebs einen Anteil von 3,4 % an allen Krebserkrankungen, bei Männern einen Anteil von 2,8 %. Aufgrund der schlechten Heilungschancen ist diese Krebsart bei Frauen für 7,5 % und bei Männern für 6,1 % aller Krebstodesfälle verantwortlich. Es ist damit bei beiden Geschlechtern die vierthäufigste Krebstodesursache (Abbildung 1-1). Im Zeitraum 2000 bis 2004 lagen die relativen 5-Jahres-Überlebensraten bei 8 % für Frauen und 6 % für Männer. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für

Frauen bei 76 Jahren, das der Männer bei 69 Jahren. Die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten sind für beide Geschlechter etwa gleich groß (Abbildung 1-6). Seit Ende der 1980er-Jahre blieben die geschätzten Neuerkrankungs- und Sterberaten bei Männern etwa konstant. Bei Frauen zeigen dagegen die Neuerkrankungs- als auch die Sterberaten einen leichten Anstieg [2].

Tabelle 1-3: Klassifikation der bösartigen Neubildungen des Pankreas nach ICD-10 [25]

C25.-	Bösartige Neubildung des Pankreas
C25.0	Pankreaskopf
C25.1	Pankreaskörper
C25.2	Pankreasschwanz
C25.3	Ductus pancreaticus
C25.4	Endokriner Drüsenanteil des Pankreas (inkl. Langerhans-Inseln)
C25.7	Sonstige Teile des Pankreas (inkl. Pankreashals)
C25.8	Pankreas, mehrere Teilbereiche überlappend
C25.9	Pankreas, nicht näher bezeichnet

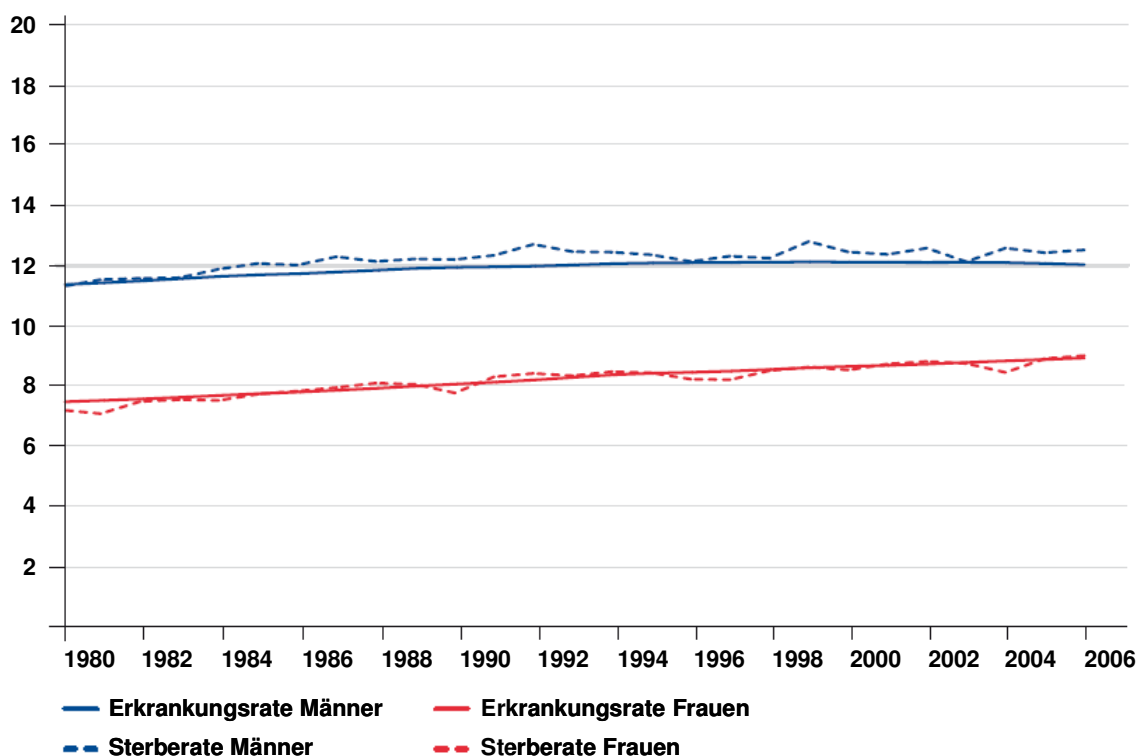


Abbildung 1-6: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten von bösartigen Neubildungen des Pankreas in Deutschland im Zeitraum 1980 bis 2006; Fälle pro 100.000 (Europastandard) [2]

In Schweden erkrankten im Jahr 2008 418 Frauen und 379 Männer an Pankreaskrebs (nach ICD-7 157). Bei Frauen hatte diese Krebsart einen Anteil von 1,7 % an allen Krebserkrankungen, bei Männern einen Anteil von 1,4 %. Mit diesen relativ geringen Fallzahlen erscheint die Erkrankung nicht in der Rangliste der zehn häufigsten Krebserkrankungen in Schweden. Die meisten Pankreaskrebsneuerkrankungen werden bei Männern und Frauen im Alter von 75 bis 79 Jahren registriert [26].

Im Zeitraum von 1989 bis 2008 lässt sich in Schweden im Gegensatz zu Deutschland ein deutlich rückläufiger Trend der Inzidenz von Pankreaskrebs beobachten (Abbildung 1-7). So lag die altersstandardisierte Inzidenzrate (bezogen auf die Weltstandard-Bevölkerung) für Männer im Jahr 1989 noch bei 7,4 und erreichte im Jahr 2008 einen Tiefstand von 4,2 [26].

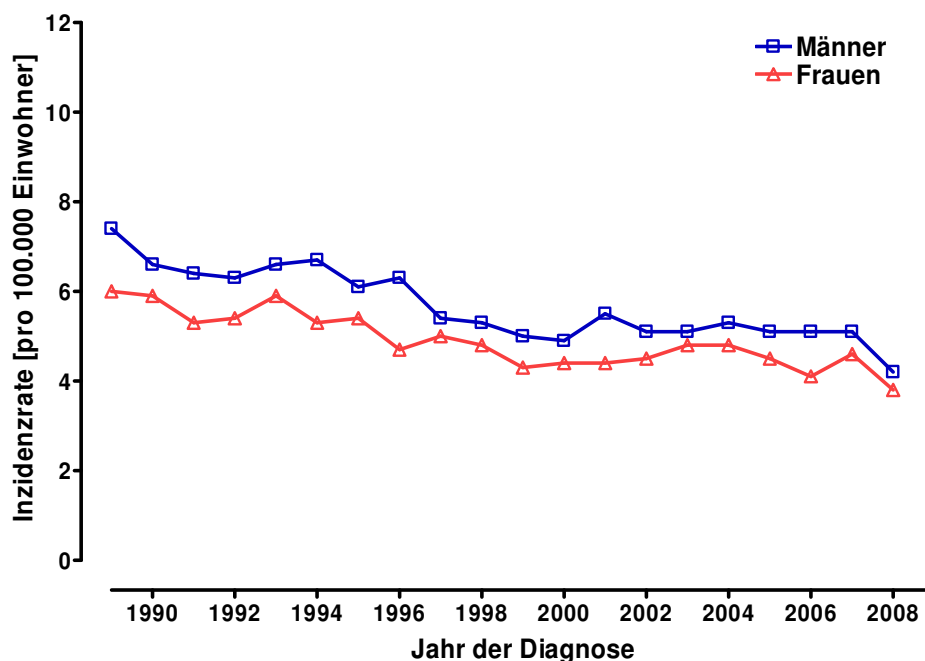


Abbildung 1-7: Altersstandardisierte Inzidenzraten von bösartigen Neubildungen des Pankreas in Schweden; Fälle pro 100.000 (Weltstandard) [26]

Im internationalen Vergleich ist erkennbar, dass die Neuerkrankungsraten von Pankreaskrebs in Schweden deutlich geringer sind als in Deutschland (Abbildung 1-8). Tschechien stellt in dieser Statistik das Land mit den höchsten Neuerkrankungs- und Mortalitätsraten für beide Geschlechter dar, Hongkong fällt dagegen mit besonders niedrigen Pankreaskrebszahlen auf [2]. In den USA wurde beobachtet, dass die Inzidenz je nach ethnischer Bevölkerungsgruppe variiert [27]. So ist das Pankreaskrebsvorkommen bei der asiatischen Bevölkerung besonders gering, in der weißen Bevölkerung dagegen größer und am häufigsten tritt die Erkrankung bei der schwarzen

Bevölkerung auf. Weltweit nimmt Pankreaskrebs die Plätze 12 und 13 der häufigsten Krebserkrankungen bei Männern und Frauen ein. Die altersstandardisierte Inzidenzrate liegt mit 3,9 leicht unterhalb der Rate für Schweden (4,3) und deutlich unter der von Deutschland (7,4) [28].

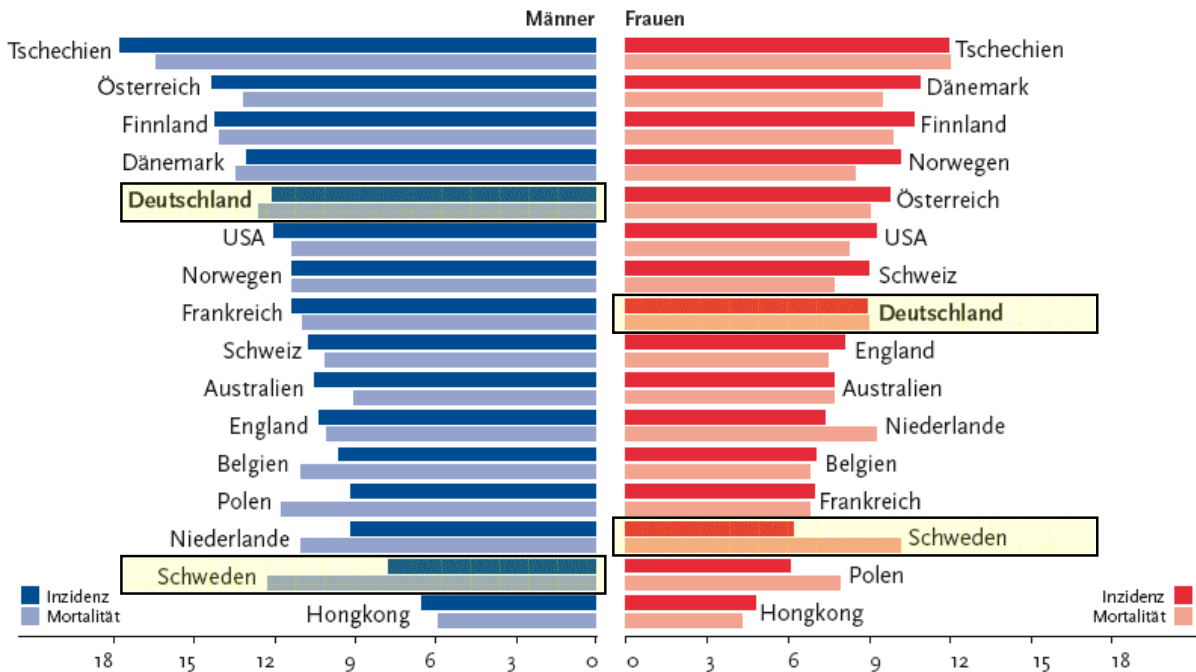


Abbildung 1-8: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten von bösartigen Neubildungen des Pankreas im internationalen Vergleich; Fälle pro 100.000 (Europastandard) [2]

1.1.3.5 Diagnose und Therapie von Pankreaskrebs

Pankreaskrebs löst keine charakteristischen Frühsymptome aus. Die meisten Patienten stellen sich wegen unspezifischen Leiden wie Gewichtsverlust, Ikterus, abdominellen Schmerzen, Appetitlosigkeit oder allgemeiner Schwäche erstmals beim Arzt vor. Der Verschlussikterus durch Gallengangobstruktion tritt frühzeitig bei Lokalisation der Tumoren im Pankreaskopf auf. Infolgedessen können hohe Plasmawerte der alkalischen Phosphatase und Bilirubin gemessen werden. Häufig werden dann auch weitere Auffälligkeiten wie dunkler Urin, heller Stuhl, Juckreiz und Steatorrhoe bemerkt. Bei Pankreastumoren in Körper oder Schwanz kann ein Ikterus völlig fehlen, hier steht neben Gewichtsverlust ein abdomineller, in den Rücken ausstrahlender Schmerz mit dumpfem, bohrenden Charakter im Vordergrund, der allerdings erst spät durch große Tumoren auftritt. Ein Diabetes ohne erklärbare Ursache kann ebenfalls auf einen malignen Tumor der Bauchspeicheldrüse hinweisen [29,30].

Bei Verdacht auf eine Erkrankung der Bauchspeicheldrüse kommen verschiedene bildgebende Verfahren zum Einsatz. Eine erste Untersuchung kann mittels abdomi-

neller Sonographie erfolgen. Hiermit können Tumoren ab einer Größe von 2 cm, Aufweitungen des Gallen- und Pankreasgangs und Lebermetastasen bestimmt werden. Mit der Endosonographie können auch kleinere Tumoren mit weniger als 1,5 cm diagnostiziert und deren Resektabilität beurteilt werden. Eine histologische Untersuchung des Gewebes ist dabei durch eine gleichzeitige Biopsieentnahme möglich. Diese Diagnosetechnik kommt zum Einsatz, wenn der heutige Goldstandard, die Computertomographie (CT), keine eindeutigen Ergebnisse liefert, der Verdacht auf Pankreaskrebs jedoch hoch ist. Eine Weiterentwicklung, das Spiral-CT, gilt wegen seiner noch besseren Sensitivität und Spezifität als beste Möglichkeit zur Diagnose und Festlegung des Tumorstadiums und ist der konventionellen CT überlegen. Die einst wichtigste Diagnosemethode, die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP), wird heute vor allem angewendet, wenn andere Methoden wenig aussagekräftige Ergebnisse liefern, Gewebe oder Pankreassekret für weitere Untersuchungen gesammelt oder ein Stent bei vorliegender Cholestase eingesetzt werden soll. Andere bildgebende Verfahren, wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder die Magnetresonanztomographie (MRT), sind als diagnostische Routineverfahren wenig etabliert und werden in der Literatur kontrovers diskutiert [29,31,32].

Laborchemische Untersuchungen weisen bei Pankreaskrebspatienten häufig erhöhte Serumspiegel von Tumormarkern wie CA 19-9 oder CEA auf. Wegen zu geringer Sensitivität (z.B. CA 19-9: 50-75 %) und Spezifität (z.B. CA 19-9: 83 %) ist jedoch bis heute noch kein geeigneter Tumormarker zur Frühdiagnose für Pankreaskrebs gefunden worden. CA 19-9 korreliert mit der Größe des Tumors und kann daher als Verlaufsparemeter nach Resektion zur Erkennung von Rezidiven herangezogen werden. An neueren Tumormarkern wie beta-hCG oder CA 72-4 wird derzeit intensiv geforscht. Zukunftsweisend ist die Forschung an typischen molekulargenetischen Veränderungen des Protoonkogens K-ras und des Tumorsuppressorgens p53, welche sich in Pankreaskrebsgewebe, aber auch in Pankreassekret nachweisen lassen. Eine Ausweitung dieser Nachweismethoden auf leichter zugängliche Biomatrizes wie beispielsweise Blut könnte ein hervorragendes Screeningverfahren darstellen [29,32].

Die einzige potentiell kurative Therapie von Pankreaskrebs ist die vollständige Entfernung des Tumorgewebes nach präoperativ diagnostizierter Resektabilität. Meist wird allerdings die Diagnose erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium gestellt und so besteht diese Möglichkeit nur für 10-15 % der Patienten [32]. Die mittlere Überlebenszeit (MÜZ) dieser kleinen Patientengruppe stellt mit etwa 23 Monaten einen deutlichen Unterschied zu Patienten mit metastasierendem, nicht resektablem

Pankreaskarzinom dar (MÜZ: 3-5 Monate) [32,33]. Ausschlusskriterien für eine Operation sind beispielsweise Tumorinvasion in angrenzende Gefäße, Fernmetastasen oder eine Peritonealkarzinose [29].

Die medikamentöse adjuvante Therapie mit 5-Fluorouracil (kombiniert mit Leukovorin) zeigte bisher die beste Lebenszeitverlängerung. Eine aktuelle, internationale Studie der European Study Group for Pancreatic Cancer (ESPAC) [33] ergab jedoch, dass die Monotherapie mit Gemcitabin verglichen mit der Kombinationstherapie von 5-Fluorouracil und Leukovorin bei gleicher MÜZ für die Patienten besser verträglich ist. Eine Folgestudie über den Vergleich einer Gemcitabin-Monotherapie und der Kombination von Gemcitabin mit Capecitabin wird derzeit durchgeführt. Die alleinige Bestrahlung nach einer Resektion kann die Rate an Lokalrezidiven senken, wirkt sich aber nicht lebensverlängernd aus. Eine kombinierte Radiochemotherapie zeigte im Vergleich mit alleiniger Chemotherapie bezüglich der MÜZ ebenfalls keinen Vorteil.

Die Palliativtherapie von Patienten mit nicht-operablen Pankreastumoren sieht in erster Linie eine Verbesserung ihrer Lebensqualität vor. Eine intensive Schmerztherapie nach dem Stufenschema der WHO kann durch eine Neurolyse des Plexus coeliacus ergänzt werden. Dem Gewichtsverlust wird durch oralen Ersatz der Pankreasenzyme und Einsatz von Stents bei vorliegender Cholestase entgegengewirkt. Bezüglich der Erfahrungen mit Bestrahlung und Chemotherapie zeigt sich im Vergleich zur adjuvanten Therapie kein Unterschied. Eine Steigerung der 1-Jahres-Überlebensrate von 22,0 auf 24,3 % konnte beobachtet werden, wenn statt Gemcitabin alleine eine Kombination mit Capecitabin als palliative Chemotherapie gegeben wurde [32,34].

1.1.3.6 Rauchen und weitere Risikofaktoren von Pankreaskrebs

Zwillingsstudien zeigten, dass Umwelt- und Lifestylefaktoren wie beispielsweise Rauchen, Alkoholkonsum oder Ernährung einen großen Einfluss auf das Pankreaskrebsrisiko haben. Ein allgemein gesunder Lebensstil senkt das Risiko um rund 60 % [27,35].

Rauchen ist der bekannteste und am besten untersuchte Risikofaktor für Pankreaskrebs [36]. Bereits 1973 wurde ein Zusammenhang zwischen dieser seltenen Krebsart und dem Konsum von Tabak festgestellt [37]. Neuere Studien zeigen, dass rund 25 % aller Pankreaskrebserkrankungen auf das Rauchen zurückzuführen sind. Damit stellt es einen großen, leicht vermeidbaren Risikofaktor dar. Das Ergebnis einer aktuellen Metaanalyse zeigte einen Odds-Ratio von 1,5 für Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern [38]. Eine große Metaanalyse von Iodice et al. [36], die 82 verschiedene

Studien umfasste, zeigte ein relatives Risiko von 1,7 für aktive Raucher und von 1,2 für Ex-Raucher. Das Risiko an Pankreaskrebs zu erkranken fällt mit den Jahren nach Beendigung des Rauchens nach einem kurzen Anstieg allmählich ab (Abbildung 1-9). Das geringere Risiko eines Nichtraucher wird jedoch nicht wieder erreicht [39].

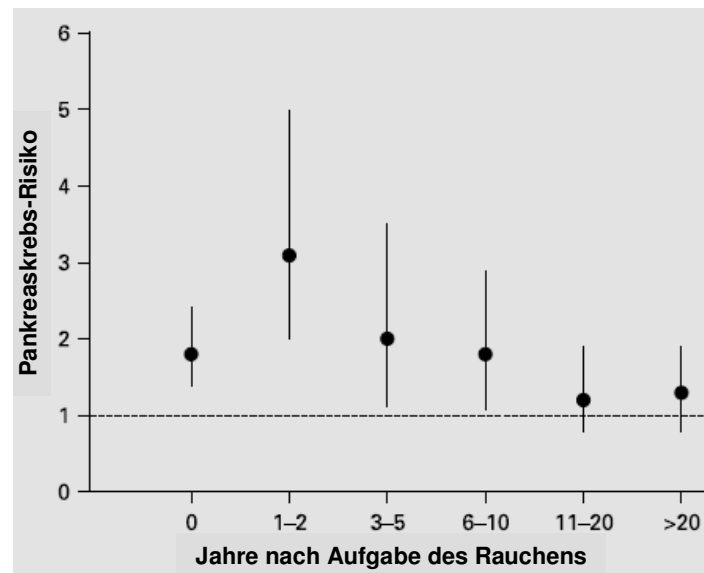


Abbildung 1-9: Abnahme des Pankreaskrebsrisikos nach Aufgabe des Rauchens [39]

Das Pankreaskrebsrisiko steigt mit der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten und lässt daher eine Dosis-Wirkungs-Beziehung vermuten. So haben beispielsweise starke Raucher mit einem Konsum von zwei oder mehr Zigarettenpackungen pro Tag ein doppelt so großes Risiko im Vergleich zu leichten Rauchern mit einem täglichen Konsum von einer halben Zigarettenpackung oder weniger [40]. Ein Zusammenhang zwischen Passivrauchbelastung und Pankreaskrebs wird kontrovers diskutiert. Während Hassan et al. [41] keine Korrelation fanden, ergab eine Studie von Vrieling et al. [42] eine Hazardrate von 2,6 für Nichtraucher, die in ihrer Kindheit Passivrauch ausgesetzt waren, sowie eine Hazardrate von 1,5 für Nichtraucher, die zu Hause oder am Arbeitsplatz von Zigarettenrauchern umgeben sind.

Auch andere Arten des Tabakkonsums wie Pfeifen- oder Zigarrenrauchen erhöhen das Pankreaskrebsrisiko. Zigarrenraucher erkranken etwa 1,6mal häufiger an Bauchspeicheldrüsenkrebs als Nichtraucher. Pfeifenraucher erkranken dagegen nur 1,1mal häufiger [38].

Tabakarten, bei deren Konsum der Tabak nicht verbrannt wird, werden in der Fachliteratur als rauchfreier Tabak oder „smokeless tobacco“ (SLT) bezeichnet. Als Beispiele sind Kau- und Schnupftabak oder schwedischer Snus zu nennen. Neueren

multizentrischen Metaanalysen zufolge trägt ihr Genuss nicht zu einer Erhöhung des Pankreaskrebsrisikos bei [38,43]. Zwei Studien aus Nordeuropa zeigten jedoch relative Risiken von 1,7 und 2,0. Eine Abnahme des Pankreaskrebsrisikos nach Beendigung des Konsums konnte nicht beobachtet werden [44-46]. Die Ergebnisse dieser Studien sind allerdings als unsicher einzustufen, da die Befragung der Teilnehmer zu ihrem Rauch- oder Snusverhalten nur zum Studienbeginn erfolgte. Mögliche Veränderungen im Konsumverhalten während des Beobachtungszeitraums, eventuell sogar ein Wechsel von Snus zu Zigaretten, wurden nicht beachtet. Verschiedene Studien aus Nordamerika wiesen einen geringeren oder gar keinen Zusammenhang zwischen Pankreaskrebs und SLT auf [38,41,47]. Die regional unterschiedlichen Studienergebnisse verwundern in Hinblick auf die Tatsache, dass der in Norwegen und Schweden konsumierte Snus deutlich ärmer an krebserregenden tabakspezifischen Nitrosaminen ist als vergleichbare Produkte aus den USA [48].

Ein weiterer, gut untersuchter Lifestylefaktor ist der Konsum von Alkohol. Grundsätzlich besteht kein oder nur ein sehr schwacher Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Pankreaskrebs. An Pankreaskrebszellen konnte jedoch *in vitro* gezeigt werden, dass Ethanol die NNK-induzierte Proliferation fördert [49]. Das Trinken von Alkohol könnte somit den krebserregenden Effekt des Zigarettenrauchens verstärken. Patienten mit chronischer Pankreatitis, die in den meisten Fällen durch Alkoholabusus entwickelt wird, haben ein deutliches, etwa 14fach erhöhtes Pankreaskrebsrisiko [27,40,50]. Eine obst- und gemüsereiche, leichte mediterrane Kost senkt das Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs. Die Mikronährstoffe Folsäure, Pyridoxin (Vitamin B₆), Methionin und Vitamin D₃ scheinen einen protektiven Einfluss zu haben. Studien über die Einnahme von NSAIDs lieferten keinen überzeugenden Beweis für einen möglichen krebsschutz effekt bezüglich der Bauchspeicheldrüse. Interessant wäre eine Studie zur Einnahme von Propranolol, einem häufig verschriebenen Betablocker. Die Substanz zeigte im Tierversuch einen schützenden Effekt [51]. Eine hochkalorische, proteinreiche Kost und ein hoher BMI werden mit einem erhöhten Pankreaskrebsrisiko assoziiert. Der Konsum von Kaffee erhöht entgegen früherer Annahmen das Risiko nicht [27,52].

Auch demographische Risikofaktoren spielen bei der Entwicklung von Pankreaskrebs eine Rolle. So gilt, analog zu vielen anderen Krebsarten auch, ein höheres Lebensalter als wesentlicher Risikofaktor. Männer sind möglicherweise durch einen höheren Anteil an Rauchern häufiger betroffen als Frauen. Bei nordischen Populationen, die weit entfernt vom Äquator leben, wie Finnländer oder Isländer, ist Pankreaskrebs

(eventuell durch Vitamin D₃-Mangel) verbreiteter als in sonnenreichen Regionen wie Tunesien oder Ägypten. Beobachtungen zu ethnischen Einflüssen zeigten, dass die höchste Mortalität in der schwarzen Bevölkerung, die geringste in der asiatischen Bevölkerung zu finden ist. Mögliche Ursachen hierfür könnten unterschiedlich effiziente Entgiftungsmechanismen für krebsauslösende Stoffe des Tabakrauchs sein oder der in der schwarzen Bevölkerung häufigere Vitamin D₃-Mangel [27,40].

Das Pankreaskrebsrisiko ist bei verschiedenen Erbkrankheiten wie beispielsweise dem FAMMM-Syndrom (Mutationen des CDKN2A-Gens), dem Peutz-Jeghers-Syndrom oder der Mukoviszidose deutlich erhöht. Für Patienten mit hereditärer Pankreatitis liegt das kumulative Risiko bei 40-55 %. Pankreaskrebs kann gehäuft in Familien auftreten. Das Risiko für Verwandte ersten Grades eines Pankreaskrebspatienten ist 18fach erhöht. Es ist 57fach erhöht, wenn drei Verwandte ersten Grades erkrankt sind [53]. Ein langjähriger Diabetes verdoppelt das Pankreaskrebsrisiko [27,54].

1.2 Tabakspezifische Nitrosamine

1.2.1 Entstehung der tabakspezifischen Nitrosamine

Die jungen, hellgrünen Blätter der Tabakpflanze enthalten nur Spuren von tabakspezifischen Nitrosaminen (TSNA). Der größte Anteil der TSNA entsteht während der Trocknung und Fermentierung im Tabakherstellungsprozess, ein kleiner Anteil durch die Alterung der Pflanze [55,56]. Aufgrund der Fähigkeit verschiedener Tabakvarietäten bei der Trocknung auf schnelle Weise Wasser zu verlieren, kann die Nitritbildung und folglich auch die Bildung der TSNA begrenzt werden. Eine moderate Stickstoffdüngung wirkt sich ebenso positiv auf die Erzeugung von TSNA-armen Tabakpflanzen aus. Zusätzlich lässt sich durch Wahl geeigneter Prozessbedingungen bei der Herstellung des Tabaks der TSNA-Gehalt des Produkts steuern [57,58].

Unverbrannter Tabak enthält wesentlich weniger Kanzerogene als Zigarettenrauch, da viele erst durch den Verbrennungsprozess gebildet werden [59,60]. In rauchlosen Tabakprodukten wird das größte kanzerogene Potenzial den tabakspezifischen Nitrosaminen zugeschrieben [61]. Die TSNA konnten in Haupt- und Nebenstromrauch sowie im unverbrannten Tabak nachgewiesen werden (Tabelle 1-4). Die Komponenten des Hauptstromrauchs werden vom Raucher während des Zuges aktiv aufgenommen, Nebenstromrauch entsteht während den Zugpausen. Der TSNA-Gehalt des Rauchs ist abhängig von unterschiedlichen Verbrennungsbedingungen und so enthält Nebenstromrauch wesentlich mehr TSNA als Hauptstromrauch. Besonders

hohe TSNA-Werte wurde in Toombak, einem traditionellen sudanesischem Mundtabak gefunden [62,63], sehr geringe dagegen in schwedischem Snus [64].

Tabelle 1-4: Konzentrationen tabakspezifischer Nitrosamine in Zigarettenrauch und rauchfreien Tabakprodukten [64,65]

Zigarettenrauch [ng/Zigarette] (USA)	NNN	NNK	NAB + NAT
Hauptstromrauch	40-278	17-194	42-269
Nebenstromrauch	191-330	261-468	121-262
rauchfreier Tabak [µg/g]	NNN	NNK	NAB + NAT
Snus (Schweden)	0,07-0,98	0,02-0,53	0,06-1,53
Moist Snuff (USA)	6,4-64,0	0,5-5	3-44 (NAT)
Toombak (Sudan)	420-3080	620-7870	40-2660

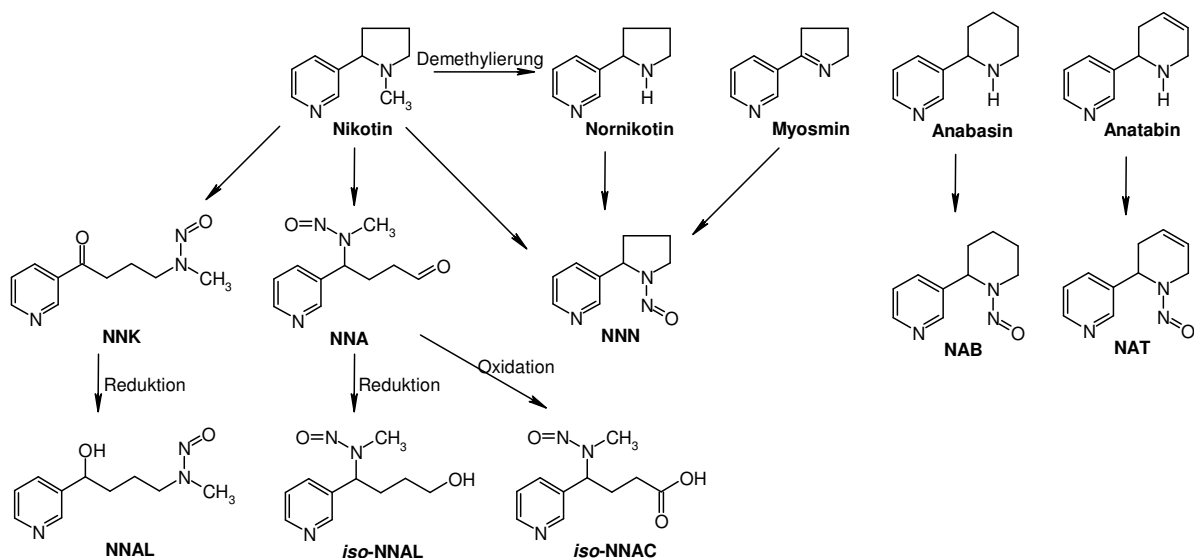


Abbildung 1-10: Entstehung der TSNA (nach Hoffmann et al. [66], ergänzt durch Zwickenpflug [67])

Durch Nitrosierungsreaktionen der Tabakalkaloide Nikotin, Nornikotin, Anabasin, Anatabin werden die tabakspezifischen Nitrosamine gebildet (Abbildung 1-10). *N'*-Nitrosornikotin (NNN), *N'*-Nitrosoanabasin (NAB) und *N'*-Nitrosoanatabin (NAT) entstehen durch Nitrosierung der Tabakalkaloide Nornikotin, Anabasin und Anatabin. Nach Demethylierung zu Nornikotin ist auch Nikotin eine Quelle von NNN [68]. Die NNK-Bildung wird durch mikrobiellen Abbau von Nikotin-1'-*N*-oxid zu Pseudooxynikotin gefördert, welches weiter zu NNK nitrosiert wird [69]. Durch enzymatische Reduktion der Ketogruppe von NNK entsteht 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), das im Tabak allerdings kaum nachgewiesen wurde. Aus Nikotin entsteht neben NNK, NNN und NNAL auch 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butanal (NNA), das

weiter zu 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure (iso-NNAC) oxidiert oder zu 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol (iso-NNAL) reduziert wird [65,66]. Eine weitere NNN-Quelle stellt das Alkaloid Myosmin dar [67]. Außer in Tabak wurde Myosmin in etlichen pflanzlichen Nahrungsmitteln wie Getreide, Obst oder Nüssen gefunden [70,71]. Auch in Milchprodukten konnte das Alkaloid von Tyroller et al. [71] nachgewiesen werden. Sahne enthielt Konzentrationen von bis zu 6,26 ng/g. In der Tabakpflanze ist Myosmin ein Sekundärmetabolit von Nikotin, denn es entsteht ausschließlich nach Demethylierung des Nikotins aus Nornikotin [72]. Myosmin wird vom Menschen über die Nahrung oder auch durch Tabakprodukte aufgenommen. Im Hauptstromrauch wurden Myosminmengen von 13-33 µg pro Zigarette, im Nebenstromrauch 73-224 µg pro Zigarette gemessen [73].

1.2.2 Metabolismus von NNK und NNN

Bei NNK werden drei Hauptwege des Metabolismus unterschieden (Abbildung 1-11), die Reduktion zu NNAL, die *N'*-Oxidation und die α -Hydroxylierung [74,75].

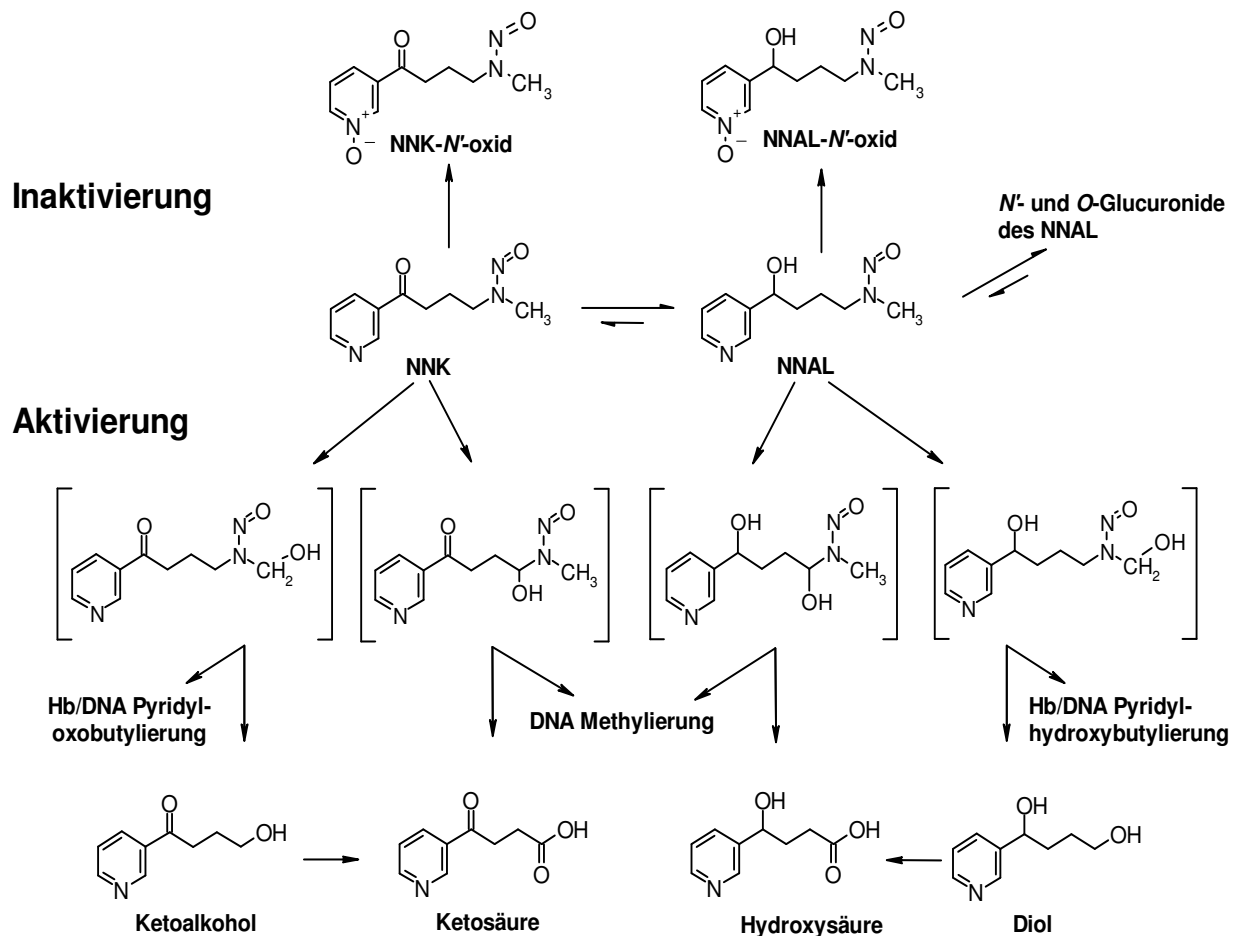


Abbildung 1-11: Metabolismus von NNK (modifiziert nach Richter et al. [76])

1.2.2.1 Reduktion von NNK zu NNAL

Mit Hilfe von mikrosomalen Steroiddehydrogenasen und cytosolischen Enzymen entsteht durch die Reduktion an der Carbonylgruppe NNAL, ein weiteres Kanzerogen, das ähnlich wie NNK weiter verstoffwechselt wird [77,78]. Die Bildung von NNAL aus NNK konnte *in vitro* auch in humanem Pankreascytosol und -mikrosomen gezeigt werden [79]. NNAL wird effektiv glukuronidiert, sowohl an der Hydroxylgruppe zum O-Glukuronid als auch am Pyridinstickstoff zum *N'*-Glukuronid. Im Gegensatz zu Nagetieren wird beim Affen auch bei niedriger NNK-Belastung ein hoher Anteil in Form von NNAL und seinen Glukuroniden (Σ NNAL) im Urin ausgeschieden [80-83]. Dies konnte bei Ratten und Affen auf den Unterschied in der biliären Ausscheidung der Glukuronide zurückgeführt werden [84,85]. Auch beim Menschen ist die Ausscheidung von NNK trotz Aufnahme erheblich niedrigerer NNK-Konzentrationen relativ hoch. Nach oraler Aufnahme von NNK über Mundtabak wurden durchschnittlich etwa 15 % als Σ NNAL, mit hohen interindividuellen Streuungen von 2,5 % bis 40,0 %, im Urin ausgeschieden [86]. Auch bei Rauchern wurde der Anteil von Σ NNAL an der Ausscheidung in einer Studie auf durchschnittlich 12 % geschätzt [87], in anderen Studien dagegen bis auf 50 % [88].

1.2.2.2 *N'*-Oxidation von NNK und NNAL

Durch Cytochrom P450-vermittelte Oxidation am Pyridinstickstoff von NNK und NNAL entstehen die nicht kanzerogenen *N'*-Oxide [89]. Sie konnten im Urin von Labornagern, Affen und auch beim Menschen nachgewiesen werden [81,84,85,90,91].

1.2.2.3 α -Hydroxylierung von NNK und NNAL

Die toxikologisch relevante metabolische Aktivierung von NNK und NNAL durch α -Hydroxylierung wird ebenfalls überwiegend durch Cytochrom P450-Enzyme katalysiert [89]. Die dabei entstehenden instabilen Zwischenprodukte zerfallen spontan in ein Aldehyd und ein hochreaktives Diazohydroxid [74]. Bei der α -Hydroxylierung am Methylenkohlenstoff von NNK und NNAL entsteht Methan-Diazohydroxid, das überwiegend mit Wasser zu Methanol abreagiert, aber auch Makromoleküle wie Proteine oder DNA methyliert. Diese Methylierung ist nicht spezifisch für NNK, sondern kann auch durch NDMA, viele weitere Nitrosamine und andere Umweltstoffe wie Methylmethansulfonat erfolgen. Die Aldehyde, die als zweiter Partner bei dieser Reaktion entstehen, werden vollständig zu den entsprechenden Säuren, der Ketosäure bei NNK und der Hydroxysäure bei NNAL, abgebaut. Diese Säuren sind bei den Versuchstieren und auch beim Menschen die Hauptmetaboliten von NNK im Urin [74,87].

Bei der α -Hydroxylierung am Methylkohlenstoff von NNK und NNAL entstehen Diazo-hydroxide, die hauptsächlich mit Wasser zu Ketoalkohol und Diol abreagieren, aber auch Proteine und DNA pyridyloxo- bzw. pyridylhydroxybutylieren. Den Hydroxy-pyridylbutanol-Addukten an DNA und Hämoglobin wurde ursprünglich eine hohe Spezifität für die Belastung mit NNK zugeschrieben [92]. Ketoalkohol und Diol werden weiter zu Keto- und Hydroxysäure oxidiert und renal ausgeschieden. Die Bestimmung der sauren Metaboliten im Urin erlaubt deshalb keine Differenzierung zwischen den beiden verschiedenen α -Hydroxylierungswegen von NNK und NNAL. Das zweite Produkt der α -Hydroxylierung am Methylkohlenstoff von NNK und NNAL ist Formaldehyd, welches ebenfalls DNA-Addukte erzeugt [92] und von der IARC als Humankarzinogen eingestuft wurde [93]. Im Vergleich zu anderen Quellen von Formaldehyd ist jedoch der Beitrag durch NNK zur Belastung des Menschen mit diesem Karzinogen unbedeutend. So finden sich im Haupt- und Nebenstromrauch von Zigaretten 10-1000fach höhere Mengen an Formaldehyd als NNK [9].

1.2.2.4 Speziesunterschiede im NNK-Metabolismus

Auf die unterschiedliche Ausscheidung von Σ NNAL wurde bereits in Kapitel 1.2.2.1 hingewiesen. Versuche mit radioaktiv markiertem NNK zeigten, dass die Ausscheidungsrate über die Galle speziesabhängig ist. So wurden im Gallensaft von Ratten 6-9 %, bei einem Rhesusaffen dagegen nur 0,6 % der verabreichten Dosis als Gesamtradioaktivität wiedergefunden [84,85]. Eine spätere Studie mit Ratten, denen eine höhere Dosis NNK gegeben wurde, zeigte eine biliäre Ausscheidungsrate von 17,5 %, wobei als Hauptmetabolit (R)-NNAL identifiziert werden konnte [94]. Die überwiegend biliäre Ausscheidung der NNAL-Glukuronide ist ein gutes Beispiel für die unterschiedliche Molekulargewichtsschwelle bei Nagern und Primaten. Während bei Nagern Substrate bereits ab einem Molekulargewicht von ca. 350 über die Galle ausgeschieden werden, ist dies bei Primaten erst ab ca. 500 der Fall [95]. Die geringere Ausscheidung von Σ NNAL bedeutet auch, dass bei Nagern im Vergleich zu Primaten ein höherer Anteil des NNK metabolisch aktiviert wird, denn die biliär ausgeschiedenen NNAL-Glukuronide werden in tieferen Darmabschnitten bakteriell gespalten und das freie NNAL kann nach Rückresorption erneut metabolisch aktiviert werden [96].

Auch die Halbwertszeit von NNAL im Blut ist speziesabhängig. Bei der Ratte beträgt sie 3-5 Stunden [97], bei Rhesusaffen wurde ein Wert von 48 Stunden gefunden [85] und für den Menschen wurde sie auf 1,5 Monate geschätzt [98]. In vielen Geweben

ist NNAL der Hauptmetabolit von NNK, durch seine lange Halbwertszeit dominiert NNAL über NNK im Blut. Eine Rückoxidation zu NNK findet nur geringfügig statt [96].

Gravierende Unterschiede bestehen im Metabolismus von NNK in der Lunge, dem hauptsächlichsten Zielorgan der Kanzerogenese (siehe Kapitel 1.2.3). Während in Lungenschnitten von Ratten, Mäusen und Hamstern NNK im relevanten nanomolaren Konzentrationsbereich zu 30-60 % metabolisch aktiviert wird, überwiegt bei menschlichen Lungenschnitten mit über 80 % die NNAL-Bildung [76].

NNK unterliegt im Dünndarm von Ratten, Mäusen und Hamstern einem signifikanten First-Pass-Metabolismus, der sich quantitativ und qualitativ bei den verschiedenen Spezies unterscheidet [99]. Bei weiblichen Mäusen und Hamstern wurden 90 % des von Dünndarmschlingen resorbierten NNK metabolisiert, bei Mäusen überwiegt dabei die α -Hydroxylierung, bei Hamstern dagegen die *N'*-Oxidation. Bei weiblichen Ratten wurden weniger als 30 % des NNK verstoffwechselt, bei männlichen Ratten knapp 60 %, und NNAL war in beiden Fällen der Hauptmetabolit im Resorbat. Diese Unterschiede machen die Ergebnisse einiger Tumorexperimente mit NNK verständlich (siehe Kapitel 1.2.3).

1.2.2.5 Metabolismus von NNN

Der NNN-Metabolismus unterscheidet sich im Wesentlichen von dem des NNK dadurch, dass keine Methyl-DNA-Addukte gebildet werden können (Abbildung 1-12). Durch *N'*-Oxidation am Pyridinring entsteht NNN-*N'*-oxid, welches keine kanzerogene Wirkung mehr hat. Eine weitere charakteristische Reaktion ist die Bildung von Nornikotin und daraus Norcotinin. Die NNN-Aktivierung erfolgt durch α -Hydroxylierung an den 2'- und 5'- Positionen des Pyrrolidinrings. Die 2'-Hydroxylierung führt wie bei NNK zur Pyridyloxobutylierung von DNA und Hämoglobin. Dies hat zur Folge, dass diese beim Menschen häufig gemessenen Addukte keine Spezifität für NNK oder NNN besitzen (siehe Kapitel 1.4). Die 5'-Hydroxylierung führt wie bei NNAL zur Pyridylhydroxybutylierung. Die Endprodukte dieser beiden Reaktionen mit Wasser führen über Ketoalkohol und Diol bzw. seinen Analogen Lactol und Lacton zu den Hauptmetaboliten Ketosäure und Hydroxysäure im Urin der Versuchstiere. Über den Metabolismus von NNN bei Menschen ist bisher nur wenig aus *in vitro* Inkubationen bekannt. In humanen Lebermikrosomen wird die α -Hydroxylierung von NNN mit den CYP Isoenzymen 2A6 und 3A4 in Verbindung gebracht [100]. In Lungenschnitten vom Menschen war die Verstoffwechslung von NNN deutlich geringer als bei Mäusen und Ratten, es überwog in allen Fällen die 2'-Hydroxylierung [101].

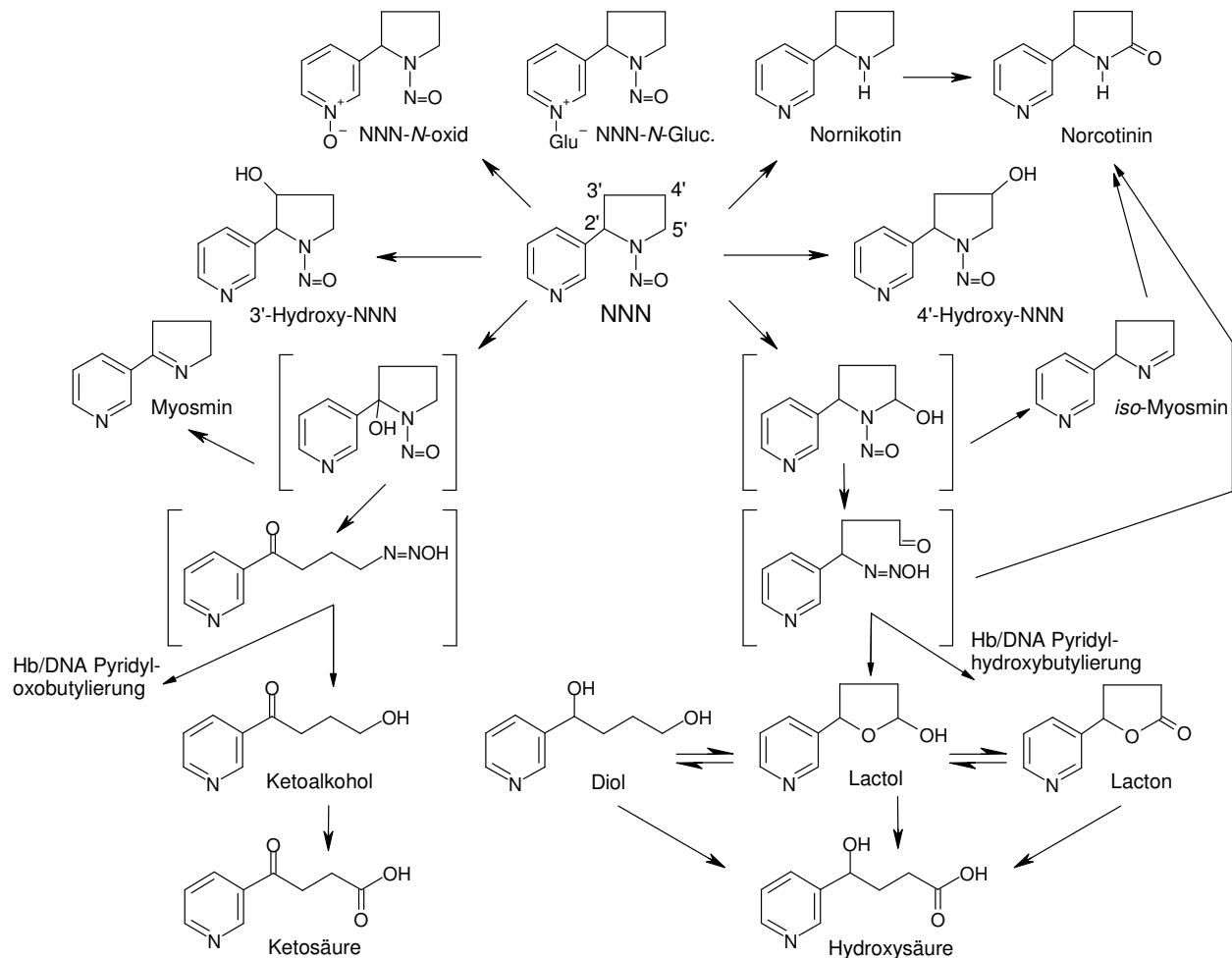


Abbildung 1-12: Metabolismus von NNN (modifiziert nach Hecht [74])

1.2.3 Krebsentstehung durch TSNA im Tierversuch

Die tabakspezifischen Nitrosamine NNK und NNN wurden von der IARC als Human-karzinogene eingestuft [102]. Als Präkanzerogene bedürfen sie einer metabolischen Aktivierung, die an Schleimhäuten oder in Organen stattfinden kann. Die TSNA zeigen je nach Applikationsort und -art des Nitrosamins, untersuchter Spezies und Dosierung eine klare Organospezifität bezüglich der Tumorbildung [74].

Die i.p.-Gabe von NNN erzeugte bei Hamstern Tumoren der Trachea und der Nasennebenhöhlen [103], bei Mäusen dagegen vorwiegend Lungentumoren [104,105]. F344-Ratten, die NNN über das Trinkwasser erhielten, entwickelten gleichermaßen Ösophagus- und Nasentumoren [106]. Wurde das Karzinogen subkutan verabreicht, traten überwiegend Nasentumoren auf [107].

NNK hat sich in zahlreichen Versuchen mit Ratten, Mäusen, Hamstern oder Nerzen als ein potenter Auslöser für Lungenkrebs erwiesen [108-111]. Andere Zielorgane von

NNK waren beispielsweise bei subkutaner Gabe der Nasenraum und die Leber der Ratte [112]. Pankreastumoren bildeten sich bei Ratten interessanterweise nur, wenn NNK über das Trinkwasser aufgenommen wurde [113,114]. Der NNK-Metabolit NNAL erzeugte bei dieser Art der Applikation deutlich mehr Pankreastumoren als NNK [114]. Dies kann durch den First-Pass-Metabolismus im Dünndarm der Ratte erklärt werden, der dafür sorgt, dass bei oraler Applikation NNK überwiegend in Form seines Hauptmetaboliten NNAL resorbiert wird (siehe Kapitel 1.2.2.4). Die Zahl der induzierten Lungentumoren war nach oraler Gabe von NNAL vergleichbar mit der von NNK-behandelten Ratten, dagegen wurden wesentlich weniger Lebertumoren und keine Nasentumoren hervorgerufen. Bei Mäusen führte intraperitoneal verabreichtes NNAL deutlich seltener zu Lungentumoren als NNK [115]. Angesichts des hohen First-Pass-Metabolismus bei Hamstern, der nicht wie bei der Ratte zu NNAL, sondern zu Metaboliten der α -Hydroxylierung und N-Oxidation führt, die nicht mehr krebsauslösend sind, überrascht es nicht, dass NNK nach oraler Gabe bei dieser Tierart keinerlei Tumoren erzeugt [116]. Auch die orale NNAL-Gabe wirkt bei Hamstern nicht krebsauslösend [117].

Chemoprävention bezeichnet die Nutzung natürlich vorkommender oder synthetischer Substanzen, die den Prozess der Krebsentstehung verhindern, hemmen oder rückgängig machen [118]. In der Vergangenheit haben viele epidemiologische Studien bewiesen, dass ein hoher Obst- und Gemüseverzehr das Krebsrisiko senkt [52]. Besonders Brassica-Gemüsearten, die reich an Isothiocyanaten sind, wie beispielsweise Brokkoli, Brunnenkresse, verschiedene Kohlsorten und Rettiche, zeigen einen krebsprotektiven Effekt [119-121]. Isothiocyanate, die konjugiert vorliegen, werden Glukosinolate oder auch Senfölglycoside genannt. Zahlreiche Tierversuche belegen, dass bestimmte Isothiocyanate, wie beispielsweise Phenylethylisothiocyanat (PEITC) die Bildung von Lungentumoren durch NNK hemmen [113,122-125]. Allerdings zeigte sich bei Ratten durch die Kombination von NNK und Sinigrin oder PEITC eine deutlich höhere Pankreaskrebsinzidenz (Abbildung 1-13). Die Ursache dafür liegt in der Wirkweise dieser Pflanzenstoffe. Durch Isothiocyanate werden Phase II-Enzyme induziert, die für eine bessere Wasserlöslichkeit und dadurch eine leichtere Elimination des Kanzerogens sorgen. Des Weiteren werden MAP-Kinasen aktiviert und so die Apoptoserate gesteigert. Am interessantesten ist jedoch, dass die metabolische Aktivierung von NNK durch Cytochrom P450-Enzyme erfolgreich gehemmt wird [126]. Vermutlich wird somit NNK vermehrt zu NNAL, einem potenten Auslöser für Pankreas-krebs bei der Ratte, metabolisiert. Hecht et al. [127] untersuchten den Einfluss von

Isothiocyanaten aus Brunnenkresse auf die Metabolisierung von NNK bei Rauchern. Drei Tage lang wurde Brunnenkresse als Beilage gereicht. Eine und zwei Wochen später wurden Urinproben gesammelt und analysiert. Es zeigte sich, dass die renale Ausscheidungsrate von Σ NNAL durch den Verzehr von Brunnenkresse um durchschnittlich 33,5 % erhöht werden konnte und eine Korrelation mit der aufgenommenen PEITC-Menge bestand.

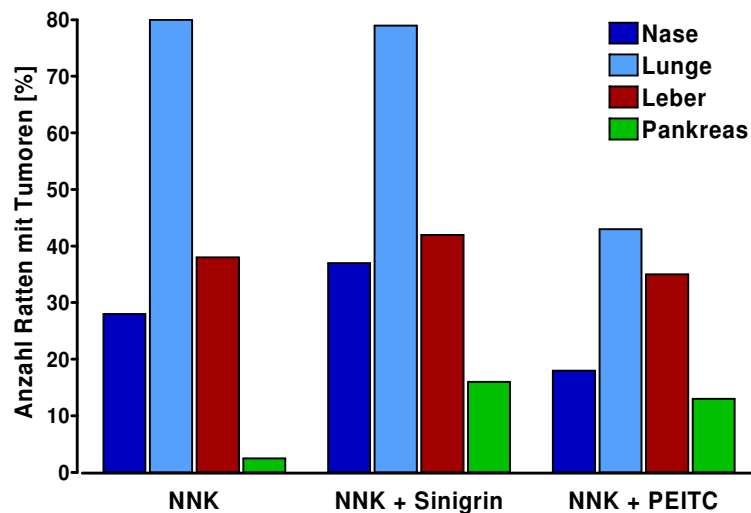


Abbildung 1-13: Chemoprävention durch Glukosinolate bei Ratten [113,128]

1.3 Schwedischer Snus

1.3.1 Definition

Schwedischer Snus ist ein feuchter bis halbfeuchter gemahlener Mundtabak, der hinter der Oberlippe platziert und dort für 15 bis 60 Minuten belassen wird.

Es existieren zwei Formen von Snus: Lös und Portion. Als Lös wird ein feuchtes Pulver bezeichnet, das vor dem Verwenden portioniert und geformt werden muss. Portion ist ein in kleine Zellulosebeutelchen verpackter Snus.

Der Verkauf von Snus ist durch die EU-Richtlinie 2001/37/EG [129] in allen Ländern der europäischen Union mit Ausnahme von Schweden verboten. Dort hat das Produkt eine fast 200-jährige Tradition. Rund 19 % der schwedischen Männer und 4 % Frauen verwenden täglich Snus [130]. Durch neuere Geschmacksrichtungen wie Cranberry oder Vanille, kleinere Portionsbeutelchen und attraktivere Verpackungen wird Snus auch bei Frauen zunehmend beliebter.

1.3.2 Herstellung und Inhaltstoffe

Im Jahr 1822 wurde von J.F. Ljunglöf und dem Chemiker J.J. Berzelius erstmals ein Schnellverfahren zur Herstellung eines qualitativ hochwertigen Snus entwickelt. Heute unterliegt die Herstellung dem schwedischen Lebensmittelgesetz, dem alle Zutaten entsprechen müssen.

Zur Herstellung des schwedischen Snus werden zunächst bis zu 30 verschiedene Sorten von sonnen- und luftgetrockneten Tabakblättern gemahlen und gemischt. Die verwendeten Tabaksorten und Trocknungsmethoden haben großen Einfluss auf den Gehalt an Nitrit und tabakspezifischen Nitrosaminen im Rohmaterial und damit auch auf das Endprodukt (siehe Kapitel 1.2.1) [58]. Anschließend wird der pulverisierte Tabak mit Salz und Wasser vermengt und in einem geschlossenen System durch Erhitzen pasteurisiert. Durch diesen Prozess werden Bakterien abgetötet, die vermutlich für die Bildung von tabakspezifischen Nitrosaminen mitverantwortlich sind [61,66]. Auch nach Lagerung des Snus für 20 Wochen bei bis zu 23 °C steigt daher der Nitrosamingehalt nicht signifikant an [131]. Nach dem Abkühlen kommen neben Aromen weitere Hilfsstoffe wie Feuchthaltemittel, Konservierungsstoffe und Säureregulatoren dazu. Anschließend wird die Mischung in Dosen verpackt und zur Reifung für mehrere Tage gekühlt gelagert. Das Endprodukt enthält einen Wasseranteil von ca. 55 %.

Im Rahmen einer Studie wurden 2002 die TSNA-Mengen von allen auf dem Markt erhältlichen schwedischen Snus-Sorten bestimmt [64]. Es wurden niedrige Werte von 0,15-3,0 µg/g Feuchtgewicht gefunden. Dieses Ergebnis bestätigt den Erfolg der Verbesserungen bezüglich der Herstellungsprozesse in den letzten 20 Jahren: Zwischen 1983 und 2002 sanken die Konzentrationen von NNN und NNK von 3,8 auf 0,49 und von 0,80 auf 0,19 µg/g Feuchtgewicht.

Vergleichbare traditionelle US-amerikanische Sorten von feuchtem Mundtabak (moist snuff) enthielten aufgrund einer anderen Herstellungstechnik etwa die 45fache Menge an gefährlichen Nitrosaminen [61]. Als Ausgangsmaterial wurden hitzegetrocknete Tabakblätter verwendet und das Produkt wurde nicht pasteurisiert, sondern fermentiert, was die TSNA-Bildung fördert [48]. Hinzu kommt, dass der amerikanische Mundtabak im Gegensatz zu schwedischem Snus bis zum Verkauf nicht kühl gelagert wird. Djordjevic et al. [132] konnten einen signifikanten Anstieg von TSNA und Nitrit in US-amerikanischem Mundtabaken feststellen, der für vier Wochen bei 37 °C gelagert wurde. Neuerdings sind aber auch in vielen amerikanischen Mundtabaken die TSNA auf ähnlich niedrige Werte abgesenkt worden wie beim Snus [133].

Etwa 28 verschiedene Kanzerogene wurden in rauchfreien Tabakprodukten gefunden: Neben den tabakspezifischen Nitrosaminen konnten beispielsweise Benz[a]pyren, Formaldehyd, Acetaldehyd, Arsen, Nickel und Polonium-210 nachgewiesen werden [61,134]. Zur Begrenzung einiger gesundheitsschädlicher Stoffe entwickelte ein führender schwedischer Snus-Hersteller den sog. GothiaTek®-Standard. Dabei handelt es sich um einen Qualitätsstandard, der unter anderem maximal zulässige Konzentrationen unerwünschter Inhaltsstoffe festlegt (Tabelle 1-5) [135].

Tabelle 1-5: Grenzwerte des GothiaTek®-Standards; die Angaben beziehen sich auf Snus mit einem Wasseranteil von 50 % [135]

Toxin	Grenzwert
Nitrit	3,5 mg/kg
tabakspezifische Nitrosamine (TSNA)	5 mg/kg
N-Nitrosodimethylamin (NDMA)	5 µg/kg
Benz[a]pyren	10 µg/kg
Cadmium	0,5 mg/kg
Blei	1,0 mg/kg
Arsen	0,25 mg/kg
Nickel	2,25 mg/kg
Chrom	1,5 mg/kg

Die mit Snus aufgenommene Nikotinmenge entspricht in etwa der durch das Zigarettenrauchen [136-138]. Nikotin flutet aber beim Rauchen einer Zigarette wesentlich schneller im Blut an und erreicht kurzzeitig hohe Konzentrationen. Die maximale Nikotinkonzentration in venösen Blut wird bereits 5-8 min nach dem ersten Zigarettenzug erreicht [139], bei Konsum von Snus erst nach etwa 35 min [136]. Die Resorption von Nikotin aus Snus findet über die Mundschleimhaut statt. Da Nikotin in seiner nicht protonierten Form die Zellmembranen wesentlich leichter überwinden kann, fördert ein alkalischer pH-Wert des Snus die Resorptionsgeschwindigkeit [140]. Schwedischer Snus hat üblicherweise einen pH-Wert zwischen 7,9-8,6 [141].

1.3.3 Gesundheitsrisiken

Seit 1985 gilt rauchfreier Tabak als Humankanzerogen [61,142]. Verschiedene Krebserkrankungen wie Mundhöhlenkrebs, Ösophaguskrebs oder Pankreaskrebs wurden in der Vergangenheit mit Mundtabaken aus Indien oder den USA assoziiert [143-145].

Speziell schwedischer Snus, der wenig tabakspezifische Nitrosamine enthält, scheint jedoch kein Auslöser für Krebs zu sein [48]. Lediglich der Zusammenhang zwischen

Pankreaskrebs und schwedischen Snus bedarf noch weiterer Klärung (siehe Kapitel 1.1.3.6). Schildt et al. [146] fanden keinerlei Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von Snus und Mundhöhlenkrebs. Lewin et al. [147] konnte dieses Ergebnis bestätigen. Leukoplakie, eine Keratinisierungsstörung der Mundschleimhaut mit weißen, nicht abwischbaren Effloreszenzen, gilt als fakultative Präkanzerose. Sie tritt bevorzugt an der Stelle der Snus-Platzierung auf. Diese Gewebeveränderung ist jedoch bei Unterbrechung des Konsums reversibel [148] und tritt seltener auf, wenn Snus nicht in loser Form, sondern verpackt in Zellulosebeutelchen verwendet wird [149]. Ein Rückgang des Zahnfleisches wurde ebenfalls häufiger bei Konsumenten von losem Snus, als von Snus-Portionsbeutelchen beobachtet. Der Zahnfleischrückgang scheint jedoch im Gegensatz zur Leukoplakie nicht reversibel zu sein [150]. Die tabakspezifischen Nitrosamine, die nach dem Abschlucken des Tabaksafts die Speiseröhre und den Magen in höherer Menge erreichen als bei Rauchern, führen zu keinem erhöhten Krebsrisiko dieser Organe [151,152]. Die TSNA führen auch nicht zu einem erhöhten Lungenkrebsrisiko bei Snusern [46], obwohl speziell das NNK häufig für den Lungenkrebs der Raucher verantwortlich gemacht wird und im Tierversuch unabhängig von der Applikationsart Lungenkrebs erzeugt [61,74,75].

Nikotin führt zu einer Erhöhung der Herzfrequenz, des Blutdrucks und zu einer Verringerung der Elastizität der Arterien. Kardiovaskuläre Erkrankungen durch langjährigen Konsum von rauchfreien Tabakprodukten wurden bereits in zahlreichen Studien untersucht [48,61,153-159], die Ergebnisse waren jedoch widersprüchlich. Eine große, aktuelle Zwillingstudie aus Schweden [160] fand keinen Zusammenhang zwischen Snus-Konsum und kardiovaskulären Erkrankungen (RR 1,01 95 %-CI 0,69-1,46). Das Risiko für Schlaganfälle war für Snuser leicht erhöht (RR 1,18 95 %-CI 0,67-2,08), das für ischämische Herzerkrankungen leicht erniedrigt (RR 0,85 95 %-CI 0,51-1,41), die Werte sind aber in beiden Fällen weit von einer Signifikanz entfernt.

Zur Entstehung von Diabetes durch Konsum von Snus gibt es bisher nur wenig Erfahrung. Persson et al. [161] fand für Personen mit familiärer Vorgeschichte von Diabetes und hohem Snus-Konsum ein erhöhtes Risiko für Typ 2-Diabetes (OR 2,7 95 %-CI 1,3 - 5,5). Eine longitudinale Kohortenstudie von Norberg et al. [162] konnte dagegen auch bei starkem Gebrauch von schwedischem Snus kein höheres Risiko für Diabetes nachweisen, interessanterweise aber eine dosisabhängige, signifikante Erhöhung der Triglycerid-Bloodspiegel als einen Faktor des metabolischen Syndroms. Auch im Rahmen der MONICA-Studie [163] wurde bei 3384 Männern aus Nordschweden kein erhöhtes Diabetes-Risiko für Snuser gefunden, wohl aber für Raucher.

Rauchlose Tabakprodukte stellen in der Schwangerschaft keine sichere Alternative zum Zigarettenrauchen dar. Das von der Mutter aufgenommene Nikotin erreicht über die Plazenta ungehindert den Blutkreislauf des ungeborenen Kindes und schadet dort, unter anderem durch seinen vasokonstriktiven Effekt, der Entwicklung des Nervensystems. Rauchende Mütter erleiden häufiger im ersten Trimester einen Spontanabort als Schwangere, die Nikotin meiden. Auch während der Stillzeit muss dringend von Tabakkonsum abgeraten werden, da Nikotin in die Muttermilch übergeht [164-166]. Die Datenauswertung des schwedischen Geburtenregisters von 1999 bis 2006 verdeutlichte die Risiken, die Snus-Konsum während der Schwangerschaft birgt. So tritt Präeklampsie bei Snus-verwendenden Schwangeren geringfügig häufiger auf (OR 1,11 95 %-CI 0,97–1,28) [167] und die Risiken einer Frühgeburt [168] oder einer Totgeburt sind signifikant erhöht (OR 1,27 95 %-CI 1,14–1,41 bzw. OR 1,6 95 %-CI 1,1–2,3) [169]. Bei Benutzung von Snus während der gesamten Schwangerschaft beträgt das Geburtsgewicht durchschnittlich 93 g weniger als jenes der Neugeborenen von Müttern, die keine Tabakprodukte konsumieren (95 %-CI 38–147 g) [170,171].

1.3.4 Snus als Zigarettenersatz – Pro und Kontra

Es steht außer Frage, dass Snus-Konsum, ähnlich wie Zigarettenrauchen zu einer Abhängigkeitsentwicklung führen kann. Nikotin, der suchterzeugende Stoff in allen Tabakprodukten, ist hierfür die Ursache [157,172,173]. Snus darf keinesfalls als ein harmloses Genussmittel angesehen werden. Im Hinblick auf Erkenntnisse wie Zahnfleischrückgang oder negative Auswirkungen auf die Entwicklung ungeborenen Lebens stellt Snus durchaus gesundheitliche Risiken dar. Im Vergleich zu den Risiken durch Zigarettenrauchen sind diese allerdings gering [174,175]. Laut Expertenschätzungen ist der Konsum von Snus etwa 90 % weniger gesundheitschädlich als der von Zigaretten [150,176].

Schweden hat als Land mit jahrelanger Snus-Tradition die geringste Raucherquote (13 % der Männer, 15 % der Frauen) [130] und infolgedessen auch die niedrigste Lungenkrebsrate in ganz Europa [1,177]. Rodu et al. [178] sehen Snus als Grund für die geringe Raucherquote bei schwedischen Männern. Die Frage ist, ob die Verfügbarkeit von Snus in anderen europäischen Ländern ebenfalls einen gesundheitlichen Nutzen für die Bevölkerung darstellen könnte. Ohne Zweifel würde es den Schutz von Nichtrauchern vor Passivrauchbelastung verbessern.

Eine Studie von Lund et al. [179] zeigte, dass Snus eine geeignete Hilfe zum Aufgeben des Rauchens darstellen kann. Sie befasste sich mit der Frage, auf welche Art ehe-

malige Raucher ihre Sucht besiegen konnten. Insgesamt 1775 norwegische Exraucher gaben dazu Auskunft. Mit Vareniclin (Champix®) (OR 4,95 $p < 0,006$) und Snus (OR 2,68 $p < 0,001$) konnte das Rauchen leichter aufgegeben werden als mit Nikotinkaugummi (Referenz: OR = 1). 62,4 % der Probanden, die mit Hilfe von Snus den Rauchstopp geschafft haben, verwendeten Snus allerdings zum Zeitpunkt der Befragung noch immer. Auch andere Untersuchungen zeigen den Zusammenhang zwischen der Verwendung von rauchfreien Tabakprodukten und höheren Raten zur Aufgabe des Rauchens, ein Wechsel vom Snus-Konsum zum Zigarettenrauchen findet dagegen kaum statt [180,181].

Seit 1992 ist der Verkauf von Snus in Europa, mit Ausnahme von Schweden, verboten. Diese Tatsache erscheint ungerechtfertigt, wenn man bedenkt, dass Zigaretten als ein weitaus gefährlicheres Tabakprodukt dagegen leicht erhältlich sind. Von einer Neuregelung, nach der alle Nikotin- und Tabakprodukte entsprechend ihrer Schädlichkeit eingestuft werden, würde die öffentliche Gesundheit vermutlich profitieren. Tabak mit erwiesenem großen Gesundheitsgefährdungspotenzial sollte wesentlich schlechter verfügbar sein als geringer schädliche Varianten oder gar medizinische Nikotinersatzmittel [174,182,183].

1.4 Biomonitoring der Belastung mit Tabak und Tabakrauch

Das Biomonitoring dient der Bestimmung der individuellen Belastung mit Fremdstoffen. Für den Menschen wurde das Human-Biomonitoring vom Umweltbundesamt in zwei Kategorien eingeteilt, das Belastungsmonitoring und das Effektmonitoring [184]. Während beim Belastungsmonitoring einmalige oder wiederholte Messungen von Stoffen oder deren Stoffwechselprodukten in biologischen Materialien wie Blut, Muttermilch, Urin, Haare, Zähne, Ausatemluft, Sektionsmaterial etc. gemessen werden, beruht das Effektmonitoring auf der Bestimmung von biologischen Parametern, die auf Belastungen durch chemische, physikalische oder biologische Faktoren "reagieren" bzw. deren Wirkungen anzeigen. Die durch das Biomonitoring bestimmten Kenngrößen werden als Biomarker bezeichnet. Werden beim Belastungsmonitoring erste Reaktionsprodukte der Fremdstoffe mit Biomolekülen wie Proteinen, z.B. Hämoglobin, und DNA erfasst, spricht man auch von einem Biomonitoring des biochemischen Effekts [185].

Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen auf Zusammenhänge zwischen Belastungen durch Tabak bzw. Tabakrauch und Krankheitsrisiken werden die individuellen Angaben und Abschätzungen zum Genuss von Tabakprodukten und der

Passivrauchbelastung mit Hilfe des Biomonitorings durch nachprüfbar, quantitative Daten ergänzt. Die mit Abstand höchste Spezifität haben hier die Tabakalkaloide und die von ihnen abgeleiteten TSNA [186].

1.4.1 Tabakalkaloide

Bei den Tabakalkaloiden (Abbildung 1-10) besitzt die Bestimmung von Nikotin und seines längerlebigen Metaboliten Cotinin die höchste Spezifität und Sensitivität zur Unterscheidung von Tabakkonsumenten und Passivrauchern [187,188]. Am häufigsten erfolgt die Bestimmung im Blut, Urin und Speichel, wobei die beiden letzten Matrices den Vorteil haben, dass ihre Gewinnung nicht-invasiv erfolgen kann. Wegen variabler Ausscheidungsmengen und pH-Werten wird beim Urin häufig die Konzentration auf den Kreatiningehalt bezogen. Die beste Aussagekraft hat die gemeinsame Bestimmung von Nikotin und allen seinen quantitativ bedeutsamen Metaboliten im 24-Stunden Urin (Abbildung 1-14), die allerdings einen hohen analytischen Aufwand erfordert [188].

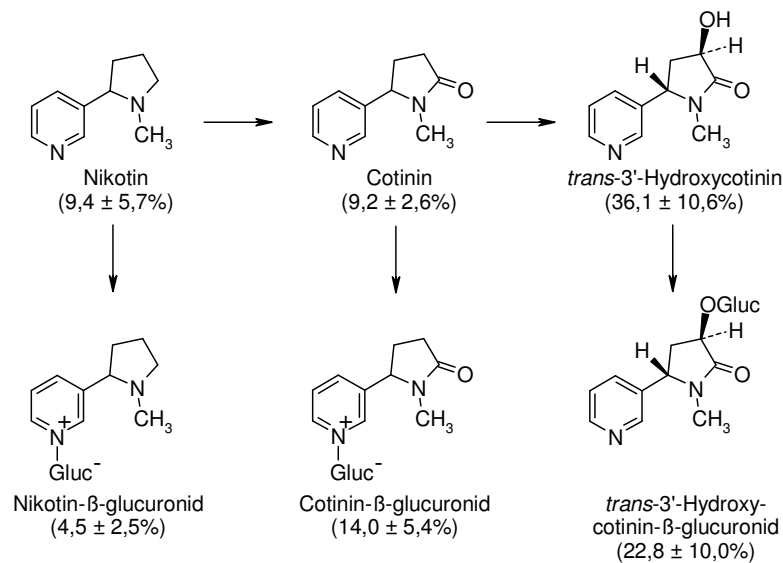


Abbildung 1-14: Hauptmetaboliten von Nikotin im Urin in Prozent der Gesamtausscheidung von Nikotin (modifiziert nach Tricker [188] und Hukkanen et al. [139])

Selbst das Cotinin mit seiner Halbwertszeit von durchschnittlich 18 Stunden ist nur ein Kurzzeit-Biomarker, der die Nikotin-Exposition der letzten 2-3 Tage widerspiegelt. Langzeit-Biomarker wie die Einlagerung von Nikotin und Cotinin in menschliche Haare, Zehennägel und Milchzähne bedürfen noch einer Validierung [188]. In großen epidemiologischen Studien erwies sich die nachträgliche Bestimmung von Nikotin in Zehennägeln als sinnvolle Ergänzung für die Abschätzung des Risikos für koronare Herzkrankheiten und Lungenkrebs durch das Rauchen [189,190].

Zur Spezifität anderer Tabakalkaloide gibt es wenige Studien. Die Bestimmung von Anabasin und Anatabin erreichte nicht die Spezifität der Cotininbestimmung für die Abschätzung der Anzahl gerauchter Zigaretten der untersuchten Probanden. Die Analyse der beiden Stoffe eignete sich aber, um in Rauchentwöhnungsstudien mit Nikotinersatzprodukten bei den Probanden das heimliche Rauchen nachzuweisen [191]. Für Myosmin in Plasma, Speichel und Zehennägeln bestand wegen seines Vorkommens in einer Vielzahl von Lebensmitteln [70,71] keine ausreichende Spezifität zu Unterscheidung von Rauchern und Nichtrauchern [192].

1.4.2 Tabakspezifische Nitrosamine

Mit dem gemeinsamen Hämoglobinaddukt von NNK und NNN, welches bei alkalischer Hydrolyse den Ketoalkohol (HPB) abspaltet (Abbildungen 1-11 und 1-12), der nach Derivatisierung mit hoher Empfindlichkeit durch GC-MS nachgewiesen werden kann, glaubte man einen spezifischen Langzeitmarker der Belastung mit Tabakprodukten gefunden zu haben, der zusätzlich ein Maß für die metabolische Aktivierung dieser beiden krebserzeugenden TSNA darstellt [193]. Wegen der langen Lebensdauer der Erythrozyten beim Menschen von ca. 120 Tagen und der fehlenden Reparatur der Hämoglobinaddukte, sollte das HPB-Addukt zuverlässig die Belastung durch Tabak bzw. Tabakrauch innerhalb der letzten 4 Monate anzeigen und vor allem auch eine zuverlässige Bestimmung der Passivrauchbelastung ermöglichen.

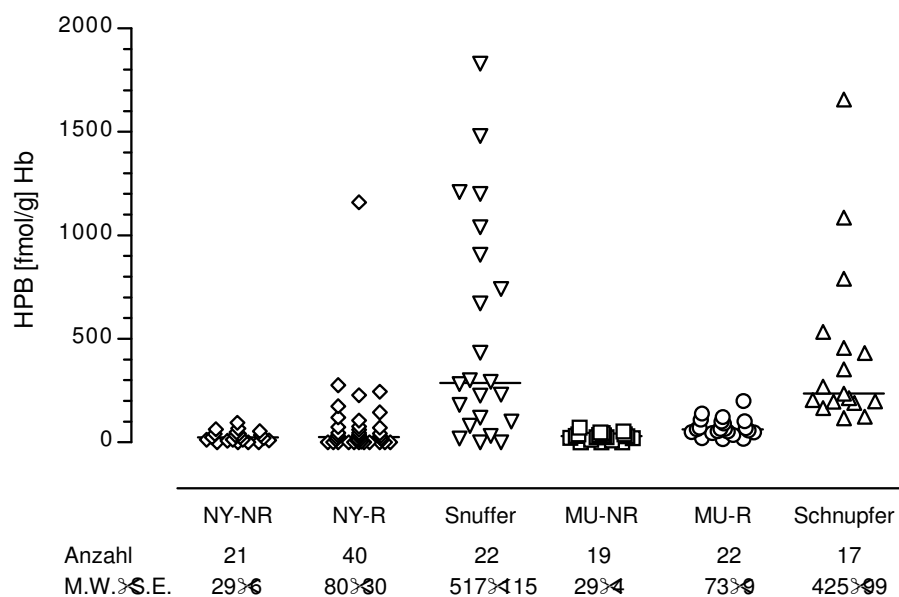


Abbildung 1-15: HPB-bspaltende Hämoglobinaddukte von Rauchern (R), Nichtrauchern (NR) und Benutzern von Mundtabaken (Snuff Dipper) aus New York [194] und aus München/Schrobenhausen (Schnupfer) [195]; die Linien zeigen die Medianwerte

Erste Ergebnisse der American Health Foundation in Valhalla, New York, waren jedoch enttäuschend (Abbildung 1-15). Anstelle der erwarteten, mehr als 100fachen Unterschiede hatten Raucher im Durchschnitt weniger als dreifach erhöhte Adduktwerte als Nichtraucher. Selbst die im Mittel fast 20fach höheren Werte der Benutzer von Mundtabaken (Snuff Dipper) überlappten mit ihrem Streubereich noch mit den Nichtrauchern. Bei Rauchern und Snuff Dippern war auch keine Korrelation zwischen den Konzentrationen der HPB-Addukte und des Cotinins gegeben [194]. Diese von unserer eigenen Arbeitsgruppe [195] bald darauf bestätigten Ergebnisse haben gezeigt, dass durch Bestimmung der HPB-abspaltenden Hämoglobinaddukte nicht einmal Raucher von Nichtrauchern zuverlässig unterschieden werden können. Eine Bestimmung der Passivrauchbelastung durch diesen Parameter war damit völlig unmöglich. Dies steht im krassen Gegensatz zu der Bestimmung des NNK-Metaboliten NNAL und seinen Glukuroniden im Urin, die erfolgreich für das Biomonitoring einer Belastung durch Tabak bzw. Tabakrauch eingesetzt werden kann [196,197].

Weitere Untersuchungen zu HPB-freisetzenden Addukten von Hämoglobin und DNA haben die unzureichende Spezifität dieser Addukte für das Rauchen bestätigt und lassen zwingend den Schluss zu, dass es weitere vom Tabak unabhängige Quellen geben muss. Die einzige bisher dafür in Frage kommende Quelle ist das Myosmin, welches einerseits nicht spezifisch für Tabakprodukte ist [70,71] und andererseits durch Nitrosierung zu NNN oder direkt zu HPB-Addukten führen kann [67,198]. Diese Addukte können wahrscheinlich auch durch Peroxidation von Myosmin entstehen [199]. Der direkte Nachweis dafür, dass Myosmin beim Menschen HPB-Addukte erzeugt, steht allerdings noch aus. Bei Ratten wurde im eigenen Arbeitskreis eine Erhöhung der HPB-abspaltenden Addukte am Hämoglobin und an der DNA von Ösophagus und Leber gesehen [200,201]. Auch die unerklärlich hohen Werte für NNN im Urin von einigen Nichtrauchern [202] könnten auf Myosmin zurückzuführen sein. Die Nitrosierung von Myosmin zu NNN und die Adduktbildung bei Ratten wurde allerdings von Hecht et al. [203] in Frage gestellt.

Neben den Nitrosaminen NNN und NNAL wurde auch das *N*'-Oxid von NNAL als möglicher Biomarker beschrieben [91]. Die spezifischen Addukte der α -Hydroxylierung von NNAL, die nach Hydrolyse PHB abspalten, wurden bisher nur im Tierversuch nachgewiesen [74]. Andere Metaboliten wie die Ketosäure und die Hydroxysäure sind zwar im Urin von Rauchern nachweisbar, haben aber als Biomarker für die NNK-Belastung keine Relevanz, da sie auch aus Nikotin gebildet werden [87,204]. Auch

die Methyladdukte haben beim Menschen keine Spezifität für die α -Hydroxylierung von NNK und NNAL.

Der direkte Nachweis der Nukleotidaddukte von HPB und PHB mit sensitiven HPLC-ESI-MS/MS-Methoden [205,206] gelang bisher nur bei Ratten, denen hohe Konzentrationen von NNK, NNAL oder NNN über das Trinkwasser gegeben wurde [207-210]. DNA-Addukte wurden in allen Zielorganen dieser TSNA gefunden: in Lunge, Leber, Nase, Mundhöhle, Ösophagus und Pankreas. Passend zu der Tatsache, dass NNK ein starkes Lungenkarzinogen für Nagetiere darstellt [74], konnten in Lungengewebe wesentlich höhere POB-DNA-Adduktlevel als in Lebergewebe gefunden werden [207,209].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 GC-MS-Systeme

System 1:

Autosampler:	A200S (Fisons Instruments, Manchester, UK)
GC:	Fisons Series 8060 (Fisons Instruments)
Injektor:	Split/Splitless-Injektor (Splitless-Modus), Temperatur 270 °C
Ionisationsgas:	Ammoniak 3.8 (Linde AG, Höllriegelskreuth)
Kopplung:	Transferline 250 °C
MS:	Autospec M 299 Ultima (Fisons Instruments)
Quellen-Modus:	Cl ⁻ , Rheniumfilament low EV, Temperatur 140 °C
Software:	Opus [®] Version 3.2 X (Fisons Instruments) MassLynx [™] Version 4.0 (Waters GmbH, Eschborn)
Trägergas:	Helium 5.0, Säulenkopfdruck 75 kPa, 0,85 ml/min, (Linde AG)
Trennsäule:	Factor Four VF-17ms, Ultra-Low-Bleed, 50 %-Phenyl-50 %-Dimethylpolysiloxanphase, L 30 m, ID 0,25 mm, df 0,25 µm (Varian Inc., Lake Forest, USA)

System 2:

GC:	Fisons Series 8000 Top (Fisons Instruments)
Injektor:	Split/Splitless-Injektor (splitless), Temperatur 220 °C
Kopplung:	Transferline 220 °C
MS:	MD 800 (Fisons Instruments)
Quellen-Modus:	El ⁺ , Wolframfilament, Temperatur 200 °C
Software:	Masslab [®] Version 1.4 (Finnigan, Manchester, UK)
Trägergas:	Helium 5.0, Säulenkopfdruck 80 kPa (Linde AG)
Trennsäule:	DB-5ms, (5 %-Phenyl)-methylpolysiloxanphase, L 30 m, ID 0,25 mm, df 0,25 µm, Polaritätsindex 8 (J&W Scientific Inc., Folsom, USA)
Vakuumpumpe:	Edwards High Vakuum Pump E2M2 Two Stage (Crawley, Sussex, UK)
Kühler:	Kühlmobil (Van der Heijden Labortechnik GmbH, Dörentrup)

2.1.2 Laborgeräte

Analysenwaage:	XS 205 DualRange (Mettler Toledo, Giessen)
Bidestillationsanlage:	Destamat (Heraeus-Kendro, Langensebold)

GC-Spritze:	Microliter Syringes 701N, 10 µl (Hamilton, Bonaduz, Schweiz)
Inkubator:	Inkubator 1000 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
Kühl- und Gefriergeräte:	Liebherr Premium (Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach a. d. Riss) AEG ARCTIS (Electrolux Hausgeräte Vertriebs GmbH, Nürnberg) IL Shin® Deep Freezer (ILSHIN LAB CO., LTD, Seoul Korea)
Laborpipetten:	Microman: 10 µl, 25 µl, 100 µl, 250 µl, 1000 µl (Gilson Inc., Middleton, USA) Pipetman 200 µl, 1000 µl, 5000 µl (Gilson)
Magnetrührer:	MAG-H (Bachofer, Reutlingen)
Messkolben:	Glas, 10 ml (Brand GmbH + CO KG, Wertheim)
Messpipetten:	Glas, 10 ml und 20 ml (Brand)
pH-Meter:	Digital pH Meter InoLab pH Level 1 (WTW GmbH, Weilheim)
Photometer:	LabelGuard™ Mikroliter Messzelle (Implen, München)
Plattformschüttler:	Polymax 1040 (Heidolph)
Reinstwasser- aufbereitungsanlage:	Millipak® Express (Millipore GmbH, Schwalbach)
SPE-Vakuumkammer:	Vac-Elut® (Analytichem International Inc., Harbor City, USA)
Stickstoff-Abblas- vorrichtung:	Feinmechanikerwerkstatt des Walther-Straub-Instituts
Trockenschrank:	Heraeus Function Line, Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc., Weltham, USA)
Überkopfmischer:	Test tube rotator (Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau)
Vakuumpumpe:	VNC 1 (Vaccubrand GmbH & Co. KG, Wertheim)
Vortex-Rüttler:	Vortex-Genie® 2 (Scientific Industries Inc., NY, USA)
Zeitmesser:	TR112 (Oregon Scientific, Neu-Isenburg)
Zentrifugen:	Hettich Zentrifugen Mikro 22 R / Universal 16 R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

DNA-Kit:	Invisorb® Spin Tissue Midi Kit (Invitek GmbH, Berlin)
Einmalhandschuhe:	Vasco® Sensitive (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
Einmalkanülen:	Einmal-Injektions-Kanüle 100 Sterican® (B. Braun)

Eppendorf-Tubes:	2 ml mit Graduierung, Safe-Lock (Eppendorf AG, Hamburg)
Einsätze für Wheaton-Gläser:	Mikroeinsetzung 100 µl, farblos mit Federn (Chromatographie Handel Müller, Fridolfing)
Präzisionswischtücher:	Kimtech® Science (Kimberly-Clark, Surrey, UK)
Pasteurpipetten:	Glas, 150 mm, ISO 9001 (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt)
pH-Indikatorpapier:	pH 6,4-8,0 Spezialindikator (Merck KGaA, Darmstadt)
Probensammelgefäße:	Falcon® Conical Tube, 15 und 50 ml, PS (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
Blut-Sammelgefäße:	Ammonium-Heparin-Röhrchen, 10 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Reagenzröhrchen:	Röhre mit Verschluss 101x16,5 mm, PP (Sarstedt)
Schleifpapier:	MICRO-MESH® 4000 und 8000 (Micro-Surface Finishing Products Inc., Wilton, USA)
SPE-Säulen:	Strata™-X 33u Polymeric Reversed Phase; 30 mg/1 ml Strata™-X-C 33u Cation Mixed Polymer; 60 mg/3 ml (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)
Wheaton-Gläser:	1,5 und 4,0 ml mit Schraubdeckel und Teflon-Septum (Chromatographie Handel Müller, Fridolfing)

2.1.4 Chemikalien

Ammoniak-Lösung	25 %, reinst (Merck KGaA, Darmstadt)
4-(Dimethylamino)pyridin	puriss. (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Acetonitril	HPLC Grade S (Rathburn Chemicals Ltd, Walkerburn, Schottland)
bidestilliertes Wasser	H ₂ O _{dd} aus hauseigener Bidestillationsanlage
Cotinin	Sigma-Aldrich
d ₃ -Cotinin	Toronto Research Chemicals, North York, Kanada
Dichlormethan	SupraSolv® für die GC (Merck)
Dimethylsulfoxid	>99,9 % zur Analyse (Merck)
Diol	Toronto Research Chemicals
d ₄ -Diol	Sondersynthese (Biochemisches Institut für Umweltcarcinogenese, Großhansdorf)
Eisessig	100 % wasserfrei (Merck)
Ethanol	Ethanol absolut p.A. (Merck)
Heptacosa	Referenzgas FC43 (SMS GmbH, Idstein)
HPB	Toronto Research Chemicals
d ₄ -HPB	Toronto Research Chemicals
Köstrolith	3 Å Molsieb (CWK GmbH, Bad Köstritz)

Lachssperma-DNA	Sigma-Aldrich
Methanol	SupraSolv® für die GC (Merck)
Myosmin	Toronto Research Chemicals
d ₄ -Myosmin	Toronto Research Chemicals
NaOH Micropills	Sigma-Aldrich
Natriumphosphat dibasisch	Sigma-Aldrich
n-Hexan	SupraSolv® für die GC (Merck)
Nikotin	Sigma-Aldrich
d ₃ -Nikotin	Toronto Research Chemicals
Pentafluorobenzoylchlorid	99 % (Sigma-Aldrich)
Phosphorsäure	85 % zur Analyse (Merck)
Pivalinsäureanhydrid	99 % (Sigma-Aldrich)
Reinstwasser	H ₂ O _{reinst} aus hauseigener Milliporanlage
Salzsäure	rauchend 37 % (Merck)
Trimethylaminhydrochlorid	98 % (Sigma-Aldrich)

2.1.5 Reagenzien

0,1 M Essigsäure	Mischen von 571,9 µl Eisessig mit Reinstwasser ad 100 ml.
Phosphat-Puffer	Lösen von 0,89g Natriumphosphat (dibasisch) in 8 ml bidest. Wasser mit Hitze. Nach Abkühlen Zugabe von bidest. Wasser ad 10 ml. Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit Hilfe von 85 %iger Phosphorsäure.
1 M Natronlauge	Lösen von 0,4 g Natriumhydroxid Micropills mit bidest. Wasser ad 10 ml.
1 M Salzsäure	Mischen von 8,3 ml 37 %iger Salzsäure mit Reinstwasser ad 100 ml.
5 %ige Ammoniak-Lösung	Mischen von 4,0 ml 25 %iger Ammoniak-Lösung mit 11,2 ml Methanol und 4,8 ml Reinstwasser
5 % Vol. Acetonitrilmischung	Mischen von 1 ml Acetonitril und 19 ml bidest. Wasser.
4 M Natronlauge	Lösen von 16,0 g Natriumhydroxid Micropills mit Reinstwasser ad 100 ml.
4 M Salzsäure	Mischen von 3,3 ml 37 %iger Salzsäure mit bidest. Wasser ad 10 ml.
Diol-Lösungen	Alle Diol-Lösungen werden mit Stickstoff überschichtet bei -20 °C gelagert. Lösen von 10 mg Diol in 1000 µl Dimethylsulfoxid (entspricht 10 µg/µl). Portionieren der Stammlösung zu je 100 µl in 1,5 ml Wheaton-Gläser.

	3 Verdünnungsschritte mit jeweils 10 µl mit Methanol ad 1000 µl ergeben 100, 1 und 0,01 ng/µl.
d ₄ -Diol-Lösungen	Alle d ₄ -Diol-Lösungen werden mit Stickstoff überschichtet bei -20 °C gelagert. Lösen von 28,2 mg d ₄ -Diol in 2,820 ml Methanol (entspricht 10 µg/µl). Portionieren der Stammlösung zu je 100 µl in 1,5 ml Wheaton-Gläser. 3 Verdünnungsschritte mit jeweils 10 µl mit Methanol ad 1000 µl ergeben 100, 1 und 0,01 ng/µl. 2 weitere Verdünnungsschritte mit jeweils 100 µl mit Methanol ad 1000 µl ergeben 1 und 0,1 pg/µl.
Elutionslösung	Mischen von 4 ml 25 %iger Ammoniak-Lösung mit 11,2 ml Methanol und 4,8 ml Reinstwasser.
HPB-Lösungen	Lösen von 200 ng HPB in 2,0 ml Hexan. Portionieren von je 50 µl in 1,5 ml Wheaton-Gläser, Abblasen des Lösemittels und lagern bei -20 °C (entspricht 5 ng pro Gefäß). Bei Bedarf Lösen von 5 ng HPB pro Gefäß in 1,0 ml Dichlormethan (entspricht 5 pg/µl).
d ₄ -HPB-Lösungen	Lösen von 200 ng d ₄ -HPB in 2,0 ml Hexan. Portionieren von je 50 µl in 1,5 ml Wheaton-Gläser, Abblasen des Lösemittels und lagern bei -20 °C (entspricht 5 ng pro Gefäß). Bei Bedarf Lösen von 5 ng d ₄ -HPB pro Gefäß in 1,0 ml Dichlormethan (entspricht 5 pg/µl).
Int. Standard-Mischung	Mischen von 50 µl einer d ₄ -Myosmin-Lösung (10 ng/µl) mit 150 µl einer d ₃ -Cotinin-Lösung (11,5 ng/µl), 10 µl einer d ₃ -Nikotin-Lösung (50 ng/µl) und 790 µl Dichlormethan. Endkonzentrationen: 0,5 ng/µl d ₄ -Myosmin, 1,725 ng/µl d ₃ -Cotinin und 0,5 ng/µl d ₃ -Nikotin.
Proteinase K – Lösung	Lösen der Proteinase K aus dem Invisorb® Spin Tissue Midi Kit in 1,5 ml Reinstwasser.
Reaktionsmischung	Lösen von 4 mg 4-(Dimethylamino)pyridin in 4 ml Acetonitril und Zugabe von 200 µl Pivalinsäureanhydrid.
TMA-Lösung	Spülen aller Reaktionsgefäße vor Benutzung mit n-Hexan. Lösen von 0,3 g Trimethylamin-HCl in 20 ml bidest. Wasser und Lösen von 0,2 g Natriumhydroxid Micropills in 5 ml bidest. Wasser. Mischen der beiden Lösungen und Stehenlassen für 10 min. 20 ml davon abnehmen und im Scheidetrichter mit 20 ml n-Hexan extrahieren. Zum Trocknen der org. Phase Zugabe von Köstrolith.

Vormischung 1	Mischen von 10 µl Pentafluorobenzoylchlorid mit 490 µl Dichlormethan.
Vormischung 2	Mischen von 40 µl Vormischung 1 mit 2 ml TMA-Lösung.
Wash Buffer	Mischen des Wash Buffers aus dem Invisorb® Spin Tissue Midi Kit mit 105 ml Ethanol absolut.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung des humanen Probenmaterials

2.2.1.1 Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin München

Nach Zuerkennung der ethisch-rechtlichen Unbedenklichkeit der Studie durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität München konnte mit der Sammlung der Gewebeproben begonnen werden.

Die Sammlung der Proben erwies sich als sehr zeitaufwendig, da nicht viele der frisch Verstorbenen die gewünschten Kriterien erfüllten. Für die Aufnahme in die Studie mussten die akut Verstorbenen volljährig und männlich sein. Besonders wichtig war aber, dass zwischen Eintritt des Todes und dem Zeitpunkt der Sektion ein möglichst geringer Zeitabstand lag, da das Pankreasgewebe durch zahlreiche Verdauungsenzyme wie Proteasen, Lipasen oder Nukleasen innerhalb kürzester Zeit autolytisch wird. Personen, die bereits länger als 72 Stunden tot waren, wurden daher grundsätzlich von der Studie ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren Gewebeerstörung durch äußere Einflüsse wie Verbrennung und Quetschung oder eine beschleunigte Verwesung durch Wärme am Auffundort. Die genauere Beurteilung fand gemeinsam mit dem ärztlichen Personal statt.

Die Probennahme erfolgte vor Öffnung des Darms, um eine bakterielle Kontamination durch Darminhalt zu vermeiden. Der untersuchende Rechtsmediziner entnahm ein etwa haselnussgroßes Gewebestück aus dem Pankreaskopf und füllte es in ein beschriftetes Probensammelgefäß. Zur Rauchstatusbestimmung wurde bevorzugt Urin verwendet. Mindestens 1,5 ml sollten für eine verlässliche Analyse vorhanden sein. War dies nicht der Fall, wurde Herzblut verwendet, welches in ein Ammonium-Heparin-Röhrchen überführt wurde. In einigen Fällen wurde das Gewebeprobenset zusätzlich durch Abschnitte der obersten 1-2 mm der Zehennägel ergänzt, um einen Langzeitmarker zur Rauchstatusbestimmung zu gewinnen.

Das Pankreasgewebe, der Urin und die Zehennägel wurden direkt nach Entnahme bei -80 °C tiefgefroren. Herzblut wurde zunächst für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Plasmafraktion wurde abpipettiert und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Zu jedem in die Studie aufgenommenen Fall wurde ein Fragebogen ausgefüllt. Auf diese Weise wurden die interne Probennummer, Sektionsnummer, Datum der Sektion, aber auch Angaben wie Größe und Gewicht des Verstorbenen, Todesursache, Todesdatum, Krebserkrankungen oder bekannter Diabetes dokumentiert. Auf eine vollständige und irreversible Anonymisierung wurde dabei geachtet. Durch polizeiliche Ermittlungen, sowie der Einschätzung durch das ärztliche Personal konnte meist vorab eine zutreffende Aussage über das Rauchverhalten notiert werden.

Es wurden insgesamt Gewebeprobensets von 105 frisch verstorbenen Personen im Zeitraum vom 3. November 2009 bis 2. März 2010 gesammelt.

2.2.1.2 Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin Solna, Stockholm

Für die Gewebeprobensammlung der rechtsmedizinischen Abteilung Solna erhielten wir ebenfalls ein positives Votum der dortigen Ethikkommission. Diese erlaubte zusätzlich zu der Gewebeentnahme für Forschungszwecke eine Befragung der Angehörigen zum genaueren Rauch- oder Snusverhalten des Verstorbenen, was sich zur Identifizierung der Snuser als äußerst nützlich erwies.

Um die Arbeit der Rechtsmedizin in Schweden zu vereinfachen, wurden leere, gekennzeichnete Probensammelgefäße sowie durchnummerierte Fragebögen verschickt. Die Fragebögen glichen im Grunde denen für die Münchner Probensammlung. Zusätzlich sollten jedoch Beruf und Wohnort angegeben werden.

Für die laboranalytische Bestimmung des Rauchstatus der frisch Verstorbenen wurden Urin und Zehennägel gesammelt. Die Probennahme des Pankreasgewebes wurde wie für die Münchner Gewebeproben beschrieben durchgeführt. Eine entsprechende Sammelanleitung lag für das medizinische Personal in der Sektion aus (siehe Anhang). Die Lagerung der Gewebeproben erfolgte bei -80 °C. Insgesamt wurden Gewebeprobensets von 20 frisch verstorbenen Rauchern, Nichtrauchern und Snusern gesammelt und anschließend auf Trockeneis in das Walther-Straub-Institut geschickt. Die Proben wurden direkt nach Erhalt bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Untersuchung des Pankreasgewebes auf HPB-freisetzende DNA Addukte

2.2.2.1 Isolierung der DNA

Für die Isolierung der Pankreas-DNA wurde der Invisorb® Spin Tissue Midi Kit verwendet. Das tiefgefrorene Pankreasgewebe wurde im Probengefäß bei Raumtemperatur aufgetaut und für die weitere Aufarbeitung in ein Eis-Wasser-Gemisch gestellt. Es wurden drei kleine Gewebestücke aus verschiedenen Bereichen des Pankreaskopfes herausgeschnitten, durch Schneiden zerkleinert und gemischt. Dann wurden 100 mg der Gewebemasse in ein Reagenzröhrchen eingewogen und sofort 2 ml Lysis-Puffer und 80 µl Proteinase K-Lösung zugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurden die Proben über Nacht im Plattformschüttler bei 52 °C inkubiert. Maximal 18 Stunden später war das Gewebe vollständig lysiert. Um die teilweise vorkommenden Fettphasen von der DNA-Lösung zu trennen wurde für 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert und die klare DNA-Lösung in ein neues Reagenzröhrchen pipettiert. Dann wurde 1 ml Binding Buffer T zugegeben und für ca. 30 s gevortext. Die Mischung wurde in einen Spin Filter überführt und für eine Minute bei 52 °C im Trockenschrank inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation des Spin Filters in einem im Invisorb® Spin Tissue Midi Kit mitgelieferten Röhrchen für 10 min bei 4000 rpm. Durch den Verlust der Hydrathülle konnte sich die DNA an das Filtermaterial binden, so dass nur das Lösemittel und Verunreinigungen abzentrifugiert wurden. Es folgten zwei Waschschriffe, wobei jeweils 3 ml Wash Buffer in den Spin Filter pipettiert und dann bei 4000 rpm für 5 min wieder abzentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Spin Filter für ca. 35 min bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet, um das Ethanol des Wash Buffers vollständig zu entfernen. Zur Elution der gereinigten DNA-Lösung wurde der Spin Filter in ein neues Röhrchen gesetzt, 500 µl des vorgewärmten Elution Buffers D zugegeben, 6 min bei 52 °C im Trockenschrank inkubiert und zuletzt für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert, wodurch die DNA von dem Filtermaterial eluiert wurde. Die so gewonnene DNA-Lösung wurde zur weiteren Aufarbeitung in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführt.

2.2.2.2 Gehaltsbestimmung und Reinheitsprüfung der DNA

Der Gehalt der DNA-Lösung wurde photometrisch bei 260 nm mit einer Mikroliter-Messzelle bestimmt. Für den Nullabgleich wurde reiner Elution Buffer D eingesetzt, welcher das Medium der DNA-Lösungen darstellt. Zur Messung wurden 4 µl der DNA-Lösung auf die Messzelle gegeben, ein Küvettendeckel mit Verdünnungsfaktor 10 (entspricht einer Schichtdicke von 1 mm) aufgesetzt und die optische Dichte gemes-

sen. Für Lösungen mit einer höheren DNA-Konzentration wurde ein Küvettendeckel mit Verdünnungsfaktor 50 (entspricht einer Schichtdicke von 0,2 mm) verwendet. Für die Berechnung der DNA-Konzentration wurde vorausgesetzt, dass eine optische Dichte von 1,0 einer DNA-Lösung der Konzentration 50 µg/ml entspricht.

Mit Hilfe der gemessenen Absorption lässt sich die Konzentration der DNA-Lösung durch folgende Formel berechnen:

$$c(DNA) = oD_{260} \times F \times 50 \mu\text{g} / \text{ml} \quad \text{Formel 2-1}$$

oD_{260} : optische Dichte bei 260 nm
 F: Verdünnungsfaktor des Küvettendeckels

Für die Reinheitsprüfung der DNA-Lösung wurden zusätzlich die optischen Dichten bei 230 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient von oD_{260}/oD_{230} dient als Maß für eine mögliche Verunreinigung durch Polysaccharide und sollte einen Betrag > 2 aufweisen. Als Maß für eine Verunreinigung durch Proteine wurde der Quotient oD_{260}/oD_{280} herangezogen, welcher einen Wert $> 1,7$ haben sollte.

Proben, die diesen Reinheitsanforderungen nicht entsprachen wurden von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen, da Verunreinigungen die Analyse stören würden.

2.2.2.3 Saure Hydrolyse der DNA und Extraktion von HPB

Die Freisetzung des HPB von der DNA erfolgte durch eine saure Hydrolyse. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 105 µl einer 4 M HCl angesäuert. Als interner Standard wurden 50 pg d_4 -HPB zugesetzt. Dann folgte die Hydrolyse bei 80 °C für 3 Stunden im Trockenschrank.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Hydrolysat durch zweimalige Extraktion mit jeweils 500 µl Dichlormethan aufgereinigt. Das HPB verblieb dabei in protonierter Form in der wässrigen Phase. Anschließend wurde das Hydrolysat durch Zugabe von 410 µl 1 M Natronlauge und 100 µl Phosphat-Puffer auf pH 7,4-7,5 eingestellt. Der pH-Wert wurde mit Indikatorpapier kontrolliert und gegebenenfalls mit 1 M Natronlauge oder 4 M Salzsäure korrigiert. Es erfolgte nun die eigentliche Extraktion von HPB, das im Neutralen als ungeladenes Molekül vorliegt. Es wurden 300 µl Dichlormethan zugegeben, 10 min im Überkopfmischer extrahiert und für eine saubere Phasentrennung 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die organische Phase, die nun den Analyten enthielt wurde in ein 1,5 ml Wheaton-Glas pipettiert. Für eine möglichst quantitative Extraktion wurde dieser Schritt dreimal wiederholt.

Im Anschluss wurde das Lösemittel schonend mit Stickstoff abgeblasen und die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Abbildung 2-1 zeigt eine Übersicht zur sauren Hydrolyse, zur Aufreinigung und Extraktion von HPB.

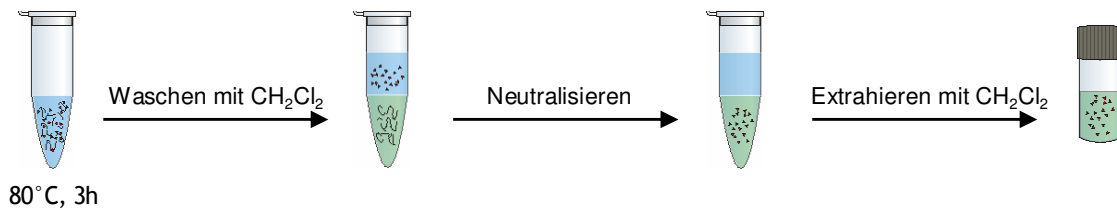


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der sauren Hydrolyse der DNA und Extraktion von HPB mit Dichlormethan

2.2.2.4 Derivatisierung von HPB

Mit einem Siedepunkt von über $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ist das native HPB nicht GC-gängig. Erst durch eine Derivatisierung mit Pentafluorobenzoylchlorid (PFBC) erhielt man einen Ester, der leichter flüchtig und dadurch der Gaschromatographie zugänglich war. Einen weiteren Vorteil des neuen Moleküls stellten die fünf Fluoratome dar, durch deren hohe Elektronegativität der hochsensitive NCI-Modus des Massenspektrometers verwendet werden konnte.

Bei der Additions-Eliminations-Reaktion des Alkohols HPB mit dem Säurechlorid PFBC entsteht Salzsäure. Um diese zu binden und so den Reaktionsfluss zu fördern wurde die Hilfsbase Trimethylamin (TMA) eingesetzt (Abbildung 2-2).

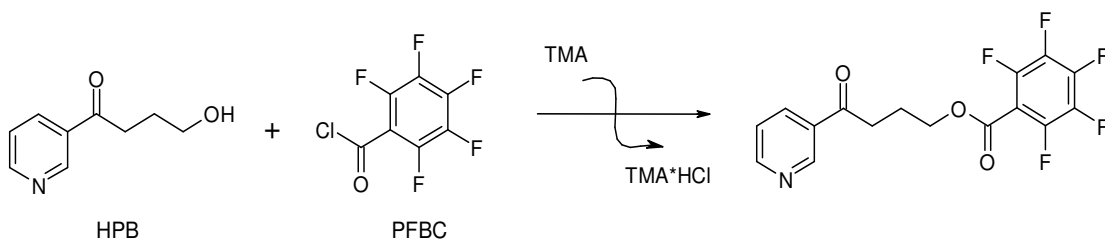


Abbildung 2-2: Reaktionsgleichung der Derivatisierung von HPB mit Pentafluorobenzoylchlorid (PFBC)

Das extrahierte und von Lösemittel befreite HPB wurde zunächst mit $120\text{ }\mu\text{l}$ Dichlormethan durch vortexen wieder in Lösung gebracht. Zum Starten der Reaktion wurden $130\text{ }\mu\text{l}$ Vormischung 2, welche bereits PFBC und TMA in geeigneter Konzentration enthielt, zugegeben und 30 s gevortext. Um eine hohe Ausbeute an derivatisiertem HPB sowie möglichst wenig Nebenprodukte zu erhalten, wurde die Mischung für 2 Stunden im Kühlschrank bei $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Zum Stoppen der Reaktion wurde die Probe mit einer Stickstoff-Abblasvorrichtung trockengeblasen. Anschließend konnte das Reaktionsprodukt mit $90\text{ }\mu\text{l}$ einer Hexan/

Dichlormethan-Mischung (Mischungsverhältnis 3:2) wieder gelöst und in einen Mikroeinsatz überführt werden. Nach vorsichtigem Abblasen des Lösemittels mit Stickstoff wurden die Proben bis zur GC-MS-Analyse bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5 Validierung der HPB-Analytik

Die Validierung einer Analysenmethode soll Auskunft darüber geben, ob sie für eine bestimmte Anwendung geeignet ist. Das Ziel einer Validierung ist die Methode objektiv zu charakterisieren und den Anwendungsbereich sowie die Limitierungen der Methode zu definieren. Wichtige Leistungsmerkmale der Analysenmethode zur Bestimmung HPB-freisetzender DNA-Addukte wurden bereits von Heppel [211] ausführlich in seiner Dissertation beschrieben und veröffentlicht [212]. Veränderungen in der Methode wie beispielsweise eine andere Zusammensetzung der Probenmatrix erforderten jedoch eine Neubestimmung einiger Validierungsparameter.

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze und der Linearität wurde eine Kalibriergerade aus zehn verschiedenen HPB-Verdünnungen mit konstanter Zugabe von d_4 -HPB als internen Standard erstellt.

Um eine möglichst praxisnahe Probenmatrix einzusetzen wurde zunächst eine Lösung mit Lachssperma-DNA und Elution Buffer D aus dem Invisorb® Spin Tissue Midi Kit hergestellt. Es wurden genau 44,0 mg Lachssperma-DNA in einen Messkolben eingewogen und ad 10 ml mit Elution Buffer D versetzt. Nach vollständigem Lösen der DNA wurde 1 ml dieser Stammlösung in einen neuen Messkolben pipettiert, ad 10 ml mit Elution Buffer D aufgefüllt und mehrfach gevortext. Die Konzentration der Lachssperma-DNA-Lösung betrug 440 µg/ml und entsprach damit der durchschnittlichen DNA-Konzentration aus den Pankreasproben der Rechtsmedizin München. Anschließend wurden 12 Eppendorf-Tubes mit je 500 µl Lachssperma-DNA-Lösung gefüllt.

Im nächsten Schritt wurden zwei Stammlösungen hergestellt. 5 ng d_4 -HPB wurden in 1000 µl Dichlormethan gelöst (entspricht 5 pg d_4 -HPB/µl) und 200 ng HPB in 2000 µl Dichlormethan (entspricht 100 pg HPB/µl).

Aus der HPB-Stammlösung wurde eine HPB-Verdünnungsreihe wie im Pipettierschema in Tabelle 2-1 beschrieben hergestellt. Die DNA-Lösungen wurden in aufsteigender Konzentration mit je 10 µl einer HPB-Verdünnung versetzt. Von der Lösung des internen Standards d_4 -HPB wurden ebenfalls je 10 µl dazu pipettiert. So enthielten die Proben HPB in aufsteigender und den internen Standard d_4 -HPB in konstanter Konzentration. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Aliquot der DNA-Lösung nur mit 10 µl inter-

nen Standard versetzt (Blindwert mit internem Standard), ein weiteres Aliquot wurde als Blindwert ohne internen Standard weiterverarbeitet. Alle Proben durchliefen nun den kompletten Analysengang entsprechend dem Laborprotokoll.

Tabelle 2-1: Pipettierschema zur Herstellung einer HPB-Verdünnungsreihe für die Bestimmung von Nachweisgrenze und Linearität

Volumen aus vorheriger Verdünnung [μl]	Volumenzugabe DCM [μl]	Endkonzentration HPB-Lösung [$\text{pg}/\mu\text{l}$]
30	570	5,0
480	120	4,0
450	150	3,0
500	100	2,5
480	120	2,0
450	150	1,5
400	200	1,0
300	300	0,5
240	360	0,2
300	300	0,1

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die Probenreihen, die den kompletten Analysengang durchliefen, durch einen direkt derivatisierten d_4 -HPB-Standard ergänzt. Dieser wurde am selben Tag wie der interne Standard der Proben pipettiert und gleichzeitig mit den Proben derivatisiert. Die Mittelwerte der Peakflächen der internen Standards aus sechs beispielhaften Probenreihen wurden durch die zugehörige Peakfläche des direkt derivatisierten d_4 -HPB-Standards geteilt. Aus diesen sechs Werten konnte die durchschnittliche Wiederfindung mit Standardfehler berechnet werden. Der Vorteil dieser Bestimmungsmethode der Wiederfindung liegt darin, dass sie nicht nur zu einem einzigen Zeitpunkt ermittelt wurde, sondern zu mehreren verschiedenen Zeitpunkten verteilt über einen größeren Zeitraum und daher die tatsächliche Wiederfindung im Laboralltag besser widerspiegeln kann.

2.2.3 Diol-Analytik

2.2.3.1 Zweifache Derivatisierung von Diol

Aufgrund einer inakzeptablen progressiven Peakverbreiterung des einfach derivatisierten Diols wurde eine anschließende zweite Derivatisierung zur Veresterung der freien und vermutlich störenden Alkoholgruppe an Position C1 basierend auf der Arbeit von Kao und Giese [213] entwickelt.

Die durch 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) basenkatalysierte Esterbildung (Abbildung 2-3) des einfach derivatisierten Diols und Pivalinsäureanhydrid (PA) verlief nach einem Additions-Eliminations-Mechanismus und ließ ein Molekül mit einem hervorragenden chromatographischen Trennverhalten entstehen.

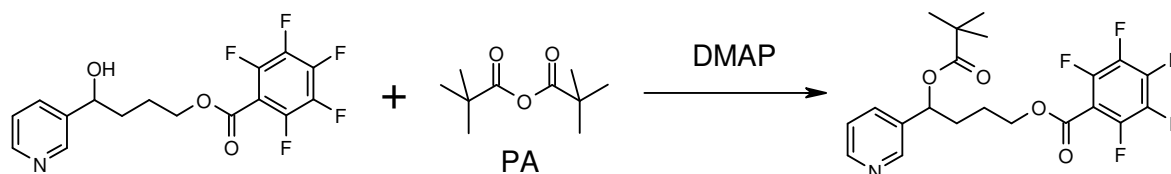


Abbildung 2-3: Esterbildung aus einfach derivatisiertem Diol mit Pivalinsäureanhydrid (PA) unter Basenkatalyse mit 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP)

Die erste Derivatisierung des Diols mit Pentafluorobenzoylchlorid (PFBC) und Trimethylamin (TMA) als Hilfsbase erfolgte auf die gleiche Art wie oben für die Derivatisierung von HPB beschrieben.

Für die zweite Derivatisierung wurde zunächst ein Reaktionsgemisch hergestellt. Dazu wog man 4 mg DMAP in ein 4 ml Wheaton-Glas und pipettierte 4 ml Acetonitril dazu. Das DMAP wurde in Acetonitril durch Vortexen vollständig gelöst. Dieser Lösung wurden 200 μ l Pivalinsäureanhydrid zugemischt.

Genau 300 μ l dieser Reaktionsmischung wurden in das Wheaton-Glas mit dem trockenen einfach derivatisierten Diol gegeben und eine Minute lang gevortext. Unter stetiger 20-minütiger Bewegung auf einem Plattformschüttler fand dann die Esterbildung bei Raumtemperatur statt.

Zum Stoppen der Reaktion wurden 50 μ l Methanol zupipettiert und sofort gemischt. Dabei reagierte das bei der Reaktion unverbrauchte Pivalinsäureanhydrid mit dem Methanol, welches im Überschuss zugegeben wurde, sofort ab.

Zur Entfernung des Lösemittels wurde die Probe für ca. 40 min in eine Stickstoff-Abblasvorrichtung gestellt. Das Syntheseprodukt neigte zum Ausbilden einer festen kristallinen Oberfläche, unter welcher sich häufig noch feuchtes Material befand. Die restlichen schwer flüchtigen Lösemittelreste mussten deshalb vorsichtig per Hand mit einem leichten Stickstoffstrom entfernt werden.

Im nächsten Schritt reinigte man das zweifach derivatisierte Diol durch Extraktion auf. Dazu wurden 300 μ l eines auf pH 7,4 eingestellten Phosphatpuffers sowie 500 μ l Hexan zu der trockenen Probe pipettiert. Durch Schütteln und Vortexen im Wechsel

für 2 min wurden die beiden Phasen fein dispergiert. Für eine anschließende saubere Phasentrennung wurde die Probe 3 min lang bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Hexan-Phase, die den Analyten enthielt, wurde abpipettiert und in ein 1,5 ml Wheaton-Glas überführt. Man pipettierte erneut 500 μ l Hexan zu der wässrigen Phase, so dass der Ausschüttelvorgang und die Zentrifugation wiederholt werden konnten. Die Hexan-Phasen wurden vereinigt und anschließend schonend mit Stickstoff abgeblasen. Die Probe wurde mit 90 μ l einer Hexan/Dichlormethan-Mischung (Mischungsverhältnis 9:1) wieder aufgelöst und in einen Mikroinsert überführt. Nach vorsichtigem Abblasen des Lösemittels mit Stickstoff wurden die Proben bis zur GC-MS-Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3.2 Extraktion des Diols

Zur Simulation einer hydrolytischen Spaltung und anschließender Extraktion des Diols wurde als Probenmatrix eine Lösung von Lachssperma-DNA in Elution Buffer D der Konzentration 440 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Die gewählte DNA-Konzentration entsprach damit jener der isolierten DNA aus den Pankreasproben der Rechtsmedizin München.

Zunächst wurde die DNA-Lösung durch 105 μ l einer 4 M HCl angesäuert und mit einer definierten Menge Diol bzw. d_4 -Diol versetzt. Dann wurden die Proben in den $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ heißen Trockenschrank gestellt. Nach 3 Stunden Inkubationszeit wurden die Proben bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mit 300 μ l bidestilliertem Wasser verdünnt. Zum Einstellen des pH-Werts auf pH 7,4-7,5 wurden 100 μ l Phosphat-Puffer und 410 μ l 1 M Natronlauge zugegeben. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Indikatorpapier kontrolliert und gegebenenfalls mit 1 M Natronlauge oder 4 M Salzsäure korrigiert.

Für die Extraktion des Diols kamen Umkehrphasen-SPE-Säulchen mit einer Füllmenge von 30 mg und einem Fassungsvermögen von 1 ml zum Einsatz. Abbildung 2-4 zeigt die Oberflächenmodifizierung des polymeren Säulenmaterials und die möglichen Interaktionsarten mit dem Analyten.

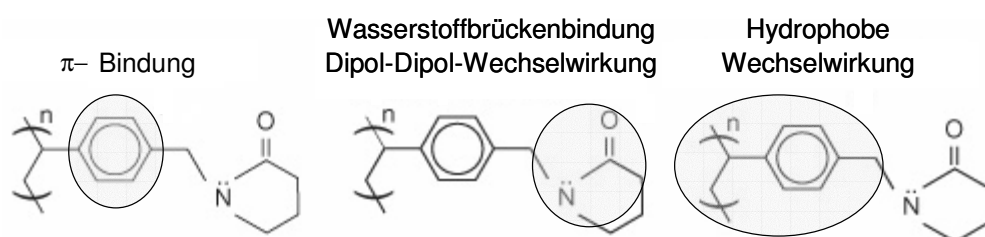


Abbildung 2-4: Darstellung des verwendeten SPE-Materials mit verschiedenen Interaktions-Prinzipien

Die Säulchen wurden zunächst durch Auftragen von Lösemitteln steigender Polarität konditioniert: 1 ml Dichlormethan, 1 ml Methanol, 2 ml bidestilliertes Wasser. Dann wurde die verdünnte und neutralisierte Diol-Lösung aufgetragen und mittels halbgeöffneter Hähne nur sehr langsam abgelassen, damit der Analyt genügend Möglichkeit zur Bindung an das Säulenmaterial erhielt. Danach wurden die Säulchen durch Auftragen von 1 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Zur Elution wurde 1 ml einer 5 % Vol. Acetonitrilmischung auf die Säule gegeben. Die Durchflussgeschwindigkeit erfolgte in diesem Schritt wieder sehr langsam mit halbgeöffneten Hähnen, um die gute Löslichkeit des Diols im Elutionsmittel auszunutzen. Das Eluat wurde in 1,5 ml Wheaton-Gläsern aufgefangen und nach beendeter Elution sofort verschlossen. Für keinen der Schritte war ein Anlegen eines Vakuums nötig, die Durchflussgeschwindigkeit betrug je nach verwendetem Lösemittel ca. 5 Tropfen/min.

Um das extrahierte Diol von Elutionsmittel zu befreien und so den nachfolgenden Derivatisierungsschritten zugänglich zu machen, wurden die Proben in eine Stickstoff-Abblasvorrichtung gestellt und für ca. 4 Stunden unter konstantem Stickstoffstrom und anfänglicher Wärmezugabe von 40 °C getrocknet.

2.2.3.3 Validierung der Diol-Analytik

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze und der Linearität der Methode zur Diol-Analytik wurde eine Kalibrierungsgerade aus zehn verschiedenen Diol-Mengen mit konstanter Zugabe von d_4 -Diol als internen Standard erstellt. Die pipettierten Diol-Mengen betragen 1 ,2 ,5 ,10 ,20 ,50 ,100 ,200 ,300 und 400 pg. Die Menge des jeweils zugegebenen deuterierten Diols betrug 400 pg. Zur Kontrolle wurde die Reihe durch zwei Blindwerte ergänzt. Einer davon wurde mit 400 pg des internen Standards versetzt, der andere wurde als reiner Blindwert ohne jegliche Diol-Zugabe weiterverarbeitet. Das Lösemittel Methanol wurde vorsichtig für 20 Sekunden mit Hilfe einer Stickstoff-Abblasvorrichtung entfernt. Dann folgten die zwei Derivatisierungen wie oben beschrieben und zuletzt die Messung per GC-MS.

2.2.4 Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin

Für die Rauchstatus-Bestimmung der frisch Verstorbenen wurden die Tabakalkaloide Nikotin und Myosmin, sowie das Stoffwechselprodukt Cotinin in Urin, Blutplasma und Zehennägeln gemessen. Mit den Messergebnissen, die durch die Angaben aus den Fragebögen ergänzt wurden, konnte eine Einteilung in die Gruppen Nichtraucher, reine Raucher, reine Snuser und Snuser/Raucher-Mischform erfolgen.

2.2.4.1 Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin aus Urin und Blutplasma

Die tiefgefrorenen Urin- und Plasmaproben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Falls eine sichtbare Trübung durch denaturierte Proteine oder abgeschilfertes Blasenepithel vorhanden war, wurden die Proben für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. 1 bis 2 ml des Überstandes wurden in ein neues Reagenzröhrchen pipettiert, wobei man das genaue Volumen notierte. Jede Probenreihe wurde zur laufenden Kontrolle der Methode durch einen wässrigen Standard und einen Blindwert ergänzt. Für den wässrigen Standard wurden 2 ml Reinstwasser verwendet. Zu den Proben und den 2 ml Reinstwasser wurden dann je 8 µl der Int. Standard-Mischung gegeben. Der Blindwert bestand aus 2 ml Reinstwasser ohne jegliche Standard-Zugabe. Die Proben wurden anschließend durch Zupipettieren des doppelten Probenvolumens 0,1 M Essigsäure verdünnt und angesäuert. Auftretende Niederschläge konnten durch Zentrifugieren bei 4000 rpm für 10 min entfernt werden.

Für die folgende Festphasenextraktion wurden Kationenaustausch-SPE-Säulchen verwendet. Diese wurden dreimal mit je 2,0 ml 5 %iger Ammoniak-Lösung und anschließend einmal mit 3,0 ml Methanol konditioniert. Das Säulenmaterial wurde mit 3,0 ml 0,1 M Essigsäure equilibriert. Die Probenaufgabe erfolgte mit Hilfe einer Pasteurpipette. Anschließend wurden die SPE-Säulchen mehrfach gewaschen, einmal mit 3,0 ml 1 M Salzsäure und zweimal mit 3,0 ml Methanol. Die Durchflussgeschwindigkeit der verschiedenen Lösungen wurde durch ein leichtes Vakuum bei 60-100 Tropfen/min gehalten. Das Säulenbett durfte nicht trockenlaufen. Erst nach dem letzten Waschschritt wurde das Säulenmaterial für 3 min unter vollem Vakuum (ca. 400 mbar) getrocknet.

Im nächsten Schritt legte man je 100 µl 4 M Natronlauge in 4 ml Wheaton-Gläser vor. Auf die Säulchen wurden 2 ml des Elutionsmittels (5 %ige Ammoniak-Lösung) gegeben. Nach ca. 1 min Wartezeit wurden die Hähne geöffnet und die Analyten konnten von den Säulchen eluiert werden. Das Eluat wurde mit den vorbereiteten Wheaton-Gläsern aufgefangen und dadurch sofort stark alkalisiert.

Um das Eluat einzuengen und von Methanol und Ammoniak zu befreien, wurden die Proben für ca. 30 min mit Stickstoff abgeblasen. Für die anschließende Flüssig-Flüssig-Extraktion pipettierte man die restliche wässrige Phase in ein 2 ml Eppendorf-Tube, gab 500 µl Dichlormethan zu und schüttelte es 2 min lang. Danach wurden die Proben für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, um eine saubere Phasentrennung zu erhalten. Die organische Phase wurde mit Hilfe eines Direktverdrängers abpipettiert

und durch eine mit Natriumsulfat gestopfte und zuvor mit 500 µl Dichlormethan gespülte Pasteurpipette in ein 1,5 ml Wheaton-Glas gegeben. Für eine möglichst große Ausbeute wiederholte man den Vorgang dieser Flüssig-Flüssig-Extraktion noch zweimal.

Die vereinigten Dichlormethan-Phasen konnten dann mit Stickstoff auf etwa 100 µl eingeengt werden. Es folgte eine Zugabe von 1,0 ml Hexan und kurzes Vortexen. Nun wurden die Proben durch vorsichtiges Abblasen mit Stickstoff auf 20 µl reduziert und direkt in 100 µl Mikroensätze überführt. Bis zur GC-MS-Analyse lagerten die Proben nie länger als eine Woche bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, um Lösemittelverluste zu vermeiden.

Eine Übersicht des Ablaufs der Analyse zeigt Abbildung 2-5.

Die Validierung der Methode wurde von Schütte-Borkovec in ihrer Dissertation bereits ausführlich beschrieben und publiziert [192,214].

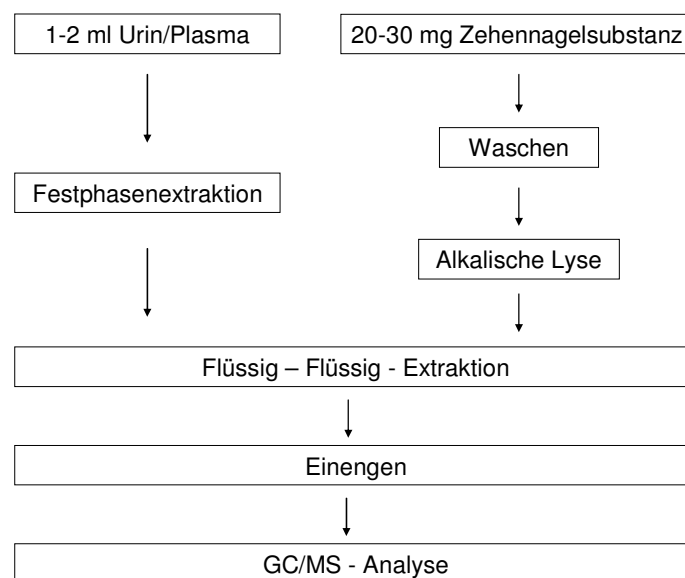


Abbildung 2-5: Vereinfachtes Schema zur Darstellung der Analyse von Cotinin, Myosmin und Nikotin aus Urin, Blutplasma und Zehennägeln

2.2.4.2 Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin aus Zehennägeln

Die Analyse von Cotinin, Nikotin und Myosmin aus Zehennägeln diente als Langzeitmarker des Tabakkonsums.

Die Abschnitte der Zehennägel wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut, zur Reinigung mit 2 ml Dichlormethan versetzt und 2 Stunden mit geschlossenem Deckel inkubiert. Danach wurde das Lösemittel abpipettiert und vorsichtig mit Stickstoff abgeblasen. Zur vollständigen Entfernung des Dichlormethans stellte man die Proben

10 min lang bei 50 °C mit offenem Deckel in den Trockenschrank. Dann wurden die Proben zur Lyse des Keratins mit 500 µl 1 M Natronlauge versetzt und über Nacht bei 50 °C im Trockenschrank stehengelassen.

Nach der Inkubationszeit war die Nagelsubstanz vollständig aufgelöst. Nach Abkühlen für ca. 15 min bei Raumtemperatur wurden 8 µl der Int. Standard-Mischung zupipettiert. Danach folgten eine Flüssig-Flüssig-Extraktion und eine Aufkonzentrierung der Analytenlösung wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben. Eine schematische Darstellung des Analysengangs zeigt Abbildung 2-5.

2.2.5 GC-MS-Analysen

2.2.5.1 GC-MS-Analyse zur HPB-Bestimmung

Das derivatisierte HPB wurde zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 10 µl einer Hexan/Dichlormethan-Mischung (Mischungsverhältnis 3:2) versetzt und eine Minute gevortext um den Analyten vollständig zu lösen. Mit einer GC-Spritze wurde dann genau 1 µl dieser Lösung in das GC-MS-System injiziert.

Bei dem verwendeten GC-MS-System handelte es sich um einen Gaschromatographen Fisons Series 8060, der an ein hochauflösendes doppelfokussierendes Sektorfeldmassenspektrometer Autospec M 299 Ultima gekoppelt war.

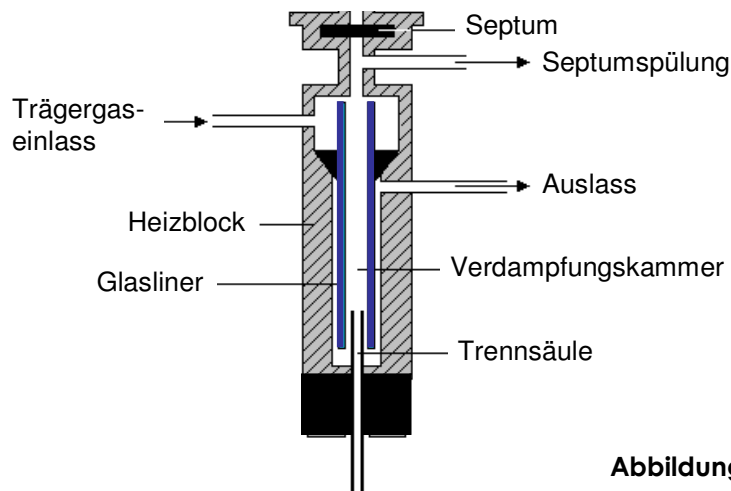


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung eines Split/Splitless-Injektors

Wegen der geringen Analytenmenge bot sich die Messung im Splitless-Modus an. Abbildung 2-6 zeigt den Aufbau eines Split/Splitless-Injektors. Während der Probeninjektion sowie eine Minute danach blieben das Trärgas-Auslassventil und das Ventil zur Septumspülung geschlossen. Sofort nach der Injektion verdampfte die Probe aufgrund der hohen Linertemperatur von 270 °C. Die gasförmige Probe gelangte

so nahezu vollständig auf die Trennsäule. Durch das Öffnen des Auslassventils nach einer Minute konnten überschüssige Lösemitteldämpfe sowie weniger flüchtige Bestandteile aus dem Glasliner entfernt werden und belasteten weder Liner noch Trennsäule. Das geöffnete Ventil zur Septumspülung lässt vergleichsweise wenig Trägergas durch, hat aber durch das Sauberhalten des Trägergasstroms von flüchtigen Septumbestandteilen oder kondensierten Probenbestandteilen eine große Bedeutung für die Lebensdauer der Trennsäule.

Als GC-Säule kam eine Factor Four VF-17ms Säule zum Einsatz. Als Trägergas diente Helium der Qualität 5.0, das mit einem Säulenkopfdruck von 75 kPa auf die Trennsäule geführt wurde. Die Heliumauslassgeschwindigkeit betrug bei 50 °C Ofentemperatur ca. 0,85 ml/min. Der Säulenofen wurde mit dem folgenden Temperaturprogramm aufgeheizt:

1 min bei 50 °C halten,
mit 25 °C/min auf 180 °C heizen,
mit 12 °C/min auf 250 °C heizen,
mit 25 °C/min auf 300 °C heizen,
6 min bei 300 °C halten.

Die Temperatur der Transferline betrug 250 °C um eine Kondensation der Analyten zu verhindern.

Als Ionisationsgas wurde Ammoniak der Qualität 3.8 mit einem Vordruck von 0,5 bar verwendet. Ammoniak hat im Vergleich zu anderen Ionisationsgasen den Vorteil, dass es weniger Rückstände auf dem Filament hinterlässt und so dessen Lebensdauer nicht verkürzt. Der Quellendruck wurde durch die Zufuhr des Ammoniaks bestimmt und betrug ca. $1,5 \times 10^{-5}$ mbar. Es wurde ein spezielles Spitzen-Filament aus Rhenium verwendet, das nur einen geringen Filamentstrom benötigt und eine niedrige Quellentemperatur von 140 °C erlaubt. Der Emissionsstrom wurde auf 0,9-1,0 mA und die Elektronenenergie auf ca. 40 eV eingestellt. Es wurde im negativ-chemischen Ionisationsmodus (NCI) gemessen.

Das Massenspektrometer wurde vor Beginn jeder Messreihe getunt. Dabei wurden die Einstellungen von Ionisationsgasdruck, Elektronenenergie und aller elektromagnetischen Linsen und Schlitze so optimiert, dass eine möglichst hohe Signalintensität sowie eine Auflösung von 5 k bei 10 %iger Peakhöhe des Massenfragments m/z 414 des Referenzgases Heptacosan erreicht wurde.

Das derivatisierte HPB fragmentierte in der Quelle zu spezifischen einfach negativ geladenen Ionen, die mit 5 kV aus der Quelle heraus beschleunigt wurden.

Wie Abbildung 2-7 zeigt, erfolgte die Auftrennung dieser Ionen nach ihren Massen durch zwei elektrische und ein magnetisches Feld. In dem ersten elektrischen Feld wurde der beschleunigte Ionenstrom fokussiert. Im folgenden Magnetfeld wurden die Teilchen des Ionenstroms nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis gemäß den physikalischen Gesetzen (Magnetfeldwirkung auf bewegte Ladungen) unterschiedlich stark abgelenkt und im zweiten elektrischen Feld konnten die Ionen bezüglich ihrer Richtungs- und Energieverteilung korrigiert werden.

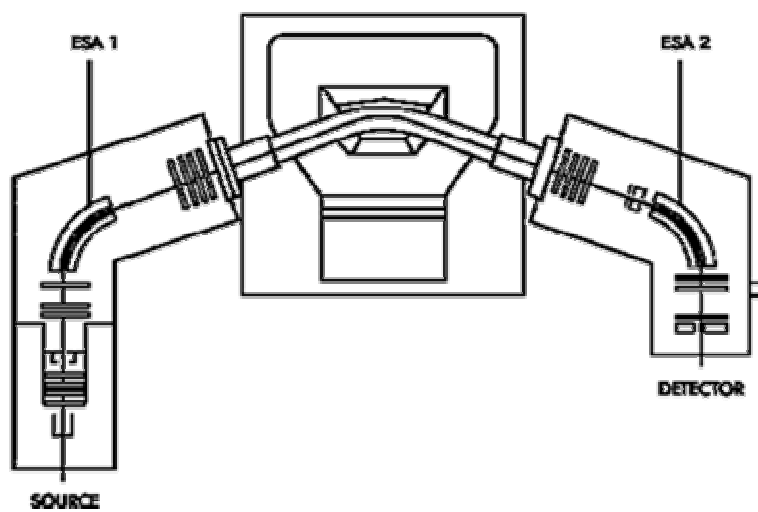


Abbildung 2-7: Vereinfachte Darstellung des Massenspektrometers Autospec M 299 (Quelle: Waters GmbH)

Zur Detektion prallten die Ionen am Ende des Flugrohrs auf die mit einem Photomultiplier verbundene Phosphorplatte. Das eintreffende Signal wurde verstärkt und in elektrischen Strom umgewandelt. Mit Hilfe einer geeigneten Software konnte dann ein Chromatogramm erstellt werden.

Die Messungen von HPB und dem internen Standard d_4 -HPB erfolgten im Single-Ion-Monitoring (SIM)-Modus. Dabei wurden mit hoher Empfindlichkeit ganz bestimmte Massen aufgezeichnet. Für die HPB-Bestimmung wurde die Massenspur m/z 359, für d_4 -HPB m/z 363 und als Lockmasse zur online-Kalibrierung das Fragment des Referenzgases Heptocosa mit m/z 414 erfasst. Die Dwell-time betrug für die Analytenmassen 50 ms und für die Lockmasse 40 ms.

Im Gegensatz zum SIM-Modus steht der Scan-Modus, mit dem substanzspezifische Massenspektren erstellt werden können. Hier wird ein großer Massenbereich mit geringerer Empfindlichkeit und Auflösung erfasst.

Zur Berechnung des HPB-Gehalts wurde vorausgesetzt, dass sich der Analyt und der deuterierte Standard während des gesamten Analysegangs chemisch und physikalisch annähernd gleich verhalten. Das bedeutet beispielsweise, dass sie im gleichen Ausmaß extrahiert und derivatisiert werden.

Der Detektor registriert jedes eintreffende Ion. Die Größe der Peakfläche im Chromatogramm entspricht somit der Stoffmenge des Analyten. Durch die bekannte, zugegebene Masse an deuteriertem Standard, lässt sich mit Hilfe von Formel 2-2 die Masse des HPB errechnen.

$$m(\text{HPB}) = \frac{(A[\text{HPB}] - A_{\text{BW}}[\text{HPB}]) \times M[\text{HPB}] \times m[d_4 - \text{HPB}]}{(A[d_4 - \text{HPB}] - A_{\text{BW}}[d_4 - \text{HPB}]) \times M[d_4 - \text{HPB}]} \quad \text{Formel 2-2}$$

$$\begin{aligned} M[\text{HPB}] &= 165,194 \text{ g/mol} \\ M[d_4\text{-HPB}] &= 169,225 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

Durch Einbeziehen der DNA-Menge kann das Ergebnis in pg/mg DNA bzw. fmol/mg DNA angegeben werden.

2.2.5.2 GC-MS-Analyse zur Diol-Bestimmung

Die GC-MS-Analyse von zweifach derivatisiertem Diol entspricht weitestgehend der von derivatisiertem HPB (siehe Kapitel 2.2.5.1). Unterschiede ergeben sich lediglich in der Wahl des Lösemittelgemisches sowie der Quelltemperatur. Zum schnellen und vollständigen Lösen der Probe wurde eine Hexan/Dichlormethan-Mischung mit einem Mischungsverhältnis 9:1 verwendet. In der Quelle des Massenspektrometers wurde das zweifach derivatisierte Diol nur in geringem Ausmaß fraktioniert. Der Großteil der Substanz erreichte den Analysator als unfraktioniertes einfach negativ geladenes Molekülion und ergab im Spektrum den Molekülpeak. Die Quelltemperatur wurde auf 160 °C erhöht, weil dadurch die Ausbeute an unfraktionierten Analyten stieg. Die Berechnung der Diol-Konzentration erfolgte analog der Berechnung der HPB-Konzentration (Formel 2-3).

$$m(\text{Diol}) = \frac{(A[\text{Diol}] - A_{\text{BW}}[\text{Diol}]) \times M[\text{Diol}] \times m[d_4 - \text{Diol}]}{(A[d_4 - \text{Diol}] - A_{\text{BW}}[d_4 - \text{Diol}]) \times M[d_4 - \text{Diol}]} \quad \text{Formel 2-3}$$

$$\begin{aligned} M[\text{Diol}] &= 167,208 \text{ g/mol} \\ M[d_4\text{-Diol}] &= 171,232 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

2.2.5.3 GC-MS-Analyse zur Cotinin-, Nikotin- und Myosminbestimmung

Die vorbereitete Hexanlösung wurde zuerst auf Raumtemperatur gebracht und gevortext. Von 20 µl Probenlösung wurde genau 1 µl mit Hilfe eines automatischen Probengebers injiziert. Das verwendete GC-MS-System bestand aus einem Gaschromatographen Fisons Series 8000, der an ein Quadrupol-Massenspektrometer Fisons MD 800 gekoppelt war.

Auch die Tabakalkaloide wurden, wie oben für HPB beschrieben, im Splitless-Modus gemessen. Die Linertemperatur betrug 200 °C. Zur Trennung der Analyten wurde eine DB-5ms Säule verwendet. Als Trägergas diente Helium der Qualität 5.0, das mit einem Säulenkopfdruck von 80 kPa in den Injektor geführt wurde. Bei 50 °C Ofentemperatur betrug die Trägergasgeschwindigkeit 0,95 ml/min. Der Säulenofen wurde mit folgendem Temperaturprogramm geladen:

- 1 min bei 50 °C halten,
- mit 15 °C/min auf 170 °C heizen,
- mit 7,5 °C/min auf 210 °C heizen,
- mit 15 °C/min auf 300 °C heizen,
- 5 min bei 300 °C halten.

Die Transferline zwischen Gaschromatograph und Massenspektrometer wurde auf 220 °C geheizt um eine Kondensation der Analyten zu vermeiden. Durch ein Wolframfilament wurden in der Quelle des Massenspektrometers Elektronen erzeugt, deren Elektronenenergie 70 eV betrug. Die Messung wurde im Elektronenstoßionisationsmodus (EI) bei einer Quellentemperatur von 200 °C durchgeführt. Die Analyten fragmentierten dabei zu einfach positiv geladenen Ionen, die aus der Quelle heraus beschleunigt und anschließend durch elektrische Linsen fokussiert wurden. Danach passierten die Ionen einen Quadrupol-Massenfilter (Abbildung 2-8), der aus vier parallel liegenden Stabelektroden besteht. Diese sind gegenüberliegend paarweise an eine variable, jeweils entgegengesetzt gepolte Gleichspannungsquelle angeschlossen. Durch zusätzliche Überlagerung mit einer hochfrequenten Wechselspannung entsteht ein dreidimensionales elektrisches Feld. Nur Ionen einer definierten Masse und entsprechend stabiler Wellenbahn können das Trennfeld passieren und den Detektor erreichen. Durch einen schnellen Wechsel der angelegten Spannungen können Scans abgefahren werden oder mehrere verschiedene Massen analysiert werden. Bei der hier beschriebenen Analyse betrug die Dwell-time für alle Ionen 60 ms. Es wurde im SIM-Modus gemessen.

Die Cotinin-Bestimmung erfolgte über die spezifischen Massenfragmente des Cotinins m/z 98 und des deuterierten internen Standards m/z 101, die Nikotin-Bestimmung analog über m/z 84 und m/z 87, die Myosmin-Bestimmung über m/z 118 und m/z 122.

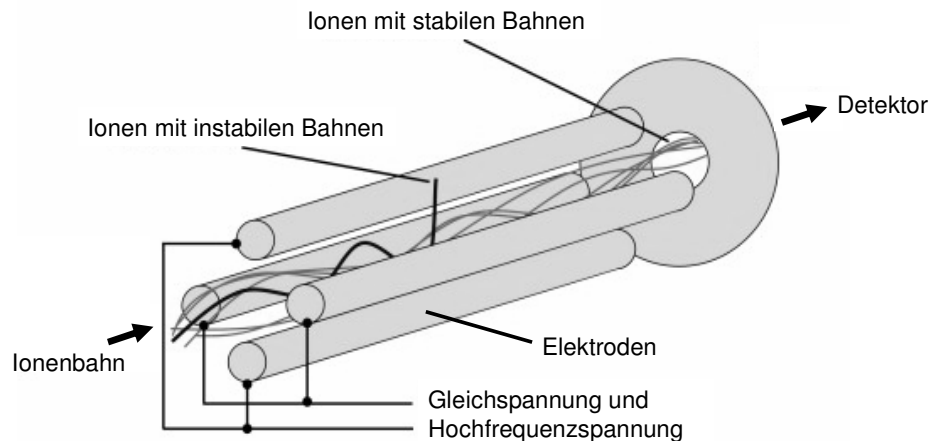


Abbildung 2-8: Schema eines Quadrupol-Massenfilters

Zur Berechnung von Cotinin, Nikotin und Myosmin wurde die Fläche des entsprechenden Ions mit der molaren Masse des Analyten und der Masse des zugesetzten internen Standards multipliziert. Dieser Wert wurde durch die Peakfläche, sowie der molaren Masse des internen Standards und dem eingesetzten Volumen an Plasma oder Urin, beziehungsweise der eingesetzten Masse der Nagelsubstanz geteilt.

Formel 2-4 zeigt die Berechnung am Beispiel der Analyse von Nikotin aus Urin.

$$c(\text{Nic}) = \frac{(A[\text{Nic}] - A_{\text{BW}}[\text{Nic}]) \times M[\text{Nic}] \times m[d_3 - \text{Nic}]}{(A[d_3 - \text{Nic}] - A_{\text{BW}}[d_3 - \text{Nic}]) \times M[d_3 - \text{Nic}] \times V(\text{Urin})} \quad \text{Formel 2-4}$$

$$\begin{aligned} M[\text{Nic}] &= 162,232 \text{ g/mol} \\ M[d_3 - \text{Nic}] &= 165,208 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

Der Analytengehalt wurde für Urin und Plasma in ng/ml und im Fall von Nagelsubstanz in ng/g angegeben.

2.2.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die Programme Microsoft® Office Excel 2003 und GraphPad Prism V.4.01 verwendet. Für alle Datenreihen wurden Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD = standard deviation), Standardfehler (SE = standard error) und Mediane berechnet. Analyseergebnisse, die unter der Nachweisgrenze (LOD) lagen, wurden durch den Wert Null ersetzt. Werte zwischen

Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ), wurden mit dem halben Wert der LOQ ausgewertet. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Ergebnisse als Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben.

Alle Prüfungen auf Normalverteilung, Korrelationsanalysen, statistische Vergleiche sowie die graphischen Darstellungen wurden mit GraphPad Prism erstellt.

Vorraussetzung für die Anwendung geeigneter statistischer Tests ist die Kenntnis über die Streuung oder Verteilung der gefundenen Daten. Hierfür erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test. Wurde keine Gauß- oder Normalverteilung gefunden, kamen für Korrelationsanalysen der Spearman-Rank-Test und für statistische Vergleiche der Mann-Whitney-Test (für ungepaarte Daten) oder der Wilcoxon-Test (für gepaarte Daten) zur Anwendung. Normalverteilte Datenreihen wurden mit dem gepaarten oder ungepaarten t-Test auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft. Die Korrelationsanalysen für normal verteilte Datenreihen wurden nach Pearson durchgeführt. Für alle Test wurde ein Konfidenzintervall von 95 % gewählt.

Sind die Ergebnisse als Boxplot dargestellt, so entspricht die waagerechte Linie innerhalb des Rechtecks bzw. der Box dem Median der Datenreihe. Die unteren und oberen Begrenzungen der Box markieren die 25- bzw. 75-Perzentile. Somit liegen 50 % aller Messwerte innerhalb des Rechtecks und 50 % außerhalb. Die außerhalb der Box vertikal angeordneten Enden der Spannweitenlinien (Whisker) markieren die 5- und 95-Perzentile.

Als Säulendiagramm dargestellte Ergebnisse zeigen den Mittelwert und den Standardfehler. Die obere Begrenzung der Säule entspricht dabei dem Mittelwert, die Spannweitenlinie dem Standardfehler.

3 Ergebnisse

3.1 Herkunft und Charakterisierung des humanen Probenmaterials

3.1.1 Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin München

Die 105 Gewebeprobensets stammten ausschließlich von volljährigen, akut verstorbenen Männern, die zur Sektion in die Rechtsmedizin München eingeliefert wurden.

Der Todeszeitpunkt konnte für 41 frisch Verstorbene genau rekonstruiert werden. Die durchschnittliche Zeitdifferenz zwischen Todeszeitpunkt und Gewebeentnahme lag bei $35,9 \pm 2,9$ Stunden. In 62 Fällen wurden Auffundzeitpunkt und -datum bestimmt, die mittlere Zeitdifferenz zwischen Auffinden der Leiche und Gewebeentnahme betrug $33,2 \pm 2,2$ Stunden. Dabei wurde in keinem Fall eine Zeitdifferenz von 72 Stunden überschritten.

Die Verstorbenen wurden meist direkt nach der Einlieferung in die Rechtsmedizin bei 4 °C bis zur Sektion aufbewahrt. Nur in Ausnahmefällen wurde sofort mit der rechtsmedizinischen Untersuchung begonnen.

Die Todesursachen der Verstorbenen wurden in Gruppen zusammengefasst (Tabelle 3-1). Der Tod durch Folgen von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sticht dabei als häufigste Todesursache hervor. Wie zu erwarten sind von dieser Todesursache vermehrt ältere Menschen betroffen. So unterscheidet sich das durchschnittliche Alter dieser Gruppe mit $65,0 \pm 2,1$ Jahren signifikant vom Durchschnittsalter aller frisch Verstorbenen aus der Studie ($54,0 \pm 1,7$ Jahre; $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu steht die sehr junge Gruppe der Toten durch Betäubungsmittelvergiftungen mit einem Durchschnittsalter von nur $34,5 \pm 1,7$ Jahren. Hier besteht ein hochsignifikanter Unterschied im Vergleich zum mittleren Durchschnittsalter aller Verstorbenen ($p < 0,0001$).

Tabelle 3-1: Todesursachen der frisch Verstorbenen aus der Rechtsmedizin München

Todesursache	Anzahl	Anteil in Prozent
Herz-Kreislauf-System	33	31,4
Unfall	18	17,1
Betäubungsmittelintoxikation	18	17,1
Suizid	15	14,3
Alkoholintoxikation	9	8,6
Sonstige (bspw. Krebs, Infektionen)	12	11,4

Im Rahmen der rechtsmedizinischen Untersuchung werden üblicherweise zuvor bestehende Erkrankungen der Verstorbenen dokumentiert. So wurde beispielsweise bei acht Verstorbenen eine Krebserkrankung notiert. Drei der Krebskranken hatten bereits Metastasen, in einem Fall befanden sich diese im Pankreaskopf. Des Weiteren wurden fünf Typ-2 Diabetiker und ein Typ-1 Diabetiker identifiziert. Je zwei Verstorbene litten zu Lebzeiten an Hepatitis, Pankreatitis oder Pankreasfibrose.

Der Rauchstatus konnte bei 102 der 105 Verstorbenen durch Cotinin-Bestimmung in Urin, Plasma oder Zehennägeln ermittelt werden. Zusätzliche Hinweise wie Einschätzungen zum Rauchverhalten durch das ärztliche Personal und Informationen aus polizeilichen Ermittlungen wurden durch die Cotininbestimmung bestätigt. Die Verstorbenen konnten in 52 Raucher und 50 Nichtraucher unterschieden werden. Angaben zu Alter, Größe und Gewicht waren für 103 Fälle vorhanden (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Übersicht der Charakteristika der Verstorbenen aus der Rechtsmedizin München unter Berücksichtigung des Rauchstatus (MW \pm SE)

	Gesamt N = 103	Raucher N = 52	Nichtraucher N = 50
Alter [J.]	54,0 \pm 1,7	48,3 \pm 2,2	60,8 \pm 2,4
Gewicht [kg]	80,6 \pm 1,8	78,0 \pm 2,7	83,5 \pm 2,5
Größe [cm]	175,3 \pm 0,6	175,5 \pm 0,9	175,1 \pm 0,9
BMI [kg/m ²]	26,1 \pm 0,6	25,1 \pm 0,7	27,3 \pm 0,9

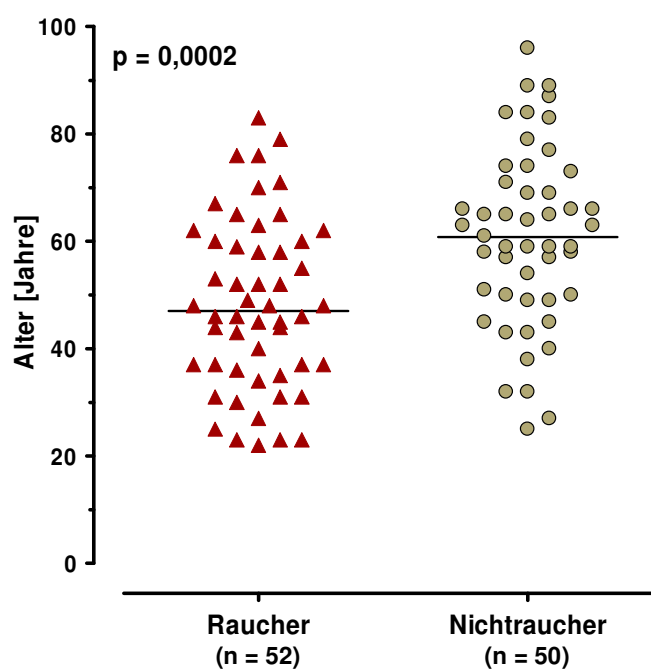


Abbildung 3-1: Altersvergleich von Rauchern und Nichtrauchern der Verstorbenen aus der Rechtsmedizin München; die Linien stellen die Medianwerte dar

Hinsichtlich Gewicht, Größe oder Body-Mass-Index ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Rauchstatus. Es konnte lediglich ein Trend zu einem höheren Körpergewicht bei Nichtrauchern beobachtet werden. Wie Abbildung 3-1 zeigt, waren die Raucher nach Prüfung mit dem t-Test jedoch signifikant jünger, als die Nichtraucher (48,3 vs. 60,8 Jahre; $p=0,0002$).

3.1.2 Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin Solna, Stockholm

In der Rechtsmedizin Solna, Stockholm wurden 20 Gewebeprobensets von 13 Männern und 7 Frauen gesammelt. Ein vollständiges Gewebeprobenset bestand aus Pankreaskopfgewebe, Urin, Zehennägeln und einem ausgefüllten Fragebogen.

Der Zeitraum zwischen Tod bzw. Auffindung der Leiche und Sektion lag im Durchschnitt bei zwei Tagen. So wie auch in München wurden die Verstorbenen bis zur rechtsmedizinischen Untersuchung gekühlt aufbewahrt.

Die Todesursachen waren überwiegend nicht natürlicher Art: Es handelte sich in sechs Fällen um Tod durch Unfall, in vier Fällen um Suizid, je zwei Personen starben an Betäubungsmittelmissbrauch oder Alkoholintoxikation und eine Verstorbene erlag einer Arzneimittelintoxikation. Nur vier Personen starben an einer natürlichen Todesart wie Herzinfarkt, Herzversagen und bakterielle Pneumonie. Für einen Verstorbenen konnte die Todesursache nicht aufgeklärt werden.

Durch die Möglichkeit der Angehörigenbefragung konnten genauere Informationen zu Ernährungsgewohnheiten, Erkrankungen, Rauch- und Snusverhalten der frisch Verstorbenen gesammelt werden. Zwei der 20 Verstorbenen ernährten sich zuvor rein vegetarisch. Es gab insgesamt vier Fälle von Diabetes mit jeweils zwei Typ-1- und Typ-2 Diabetikern. Zwei Personen litten in ihrer Vergangenheit an einer Krebserkrankung, galten jedoch vor ihrem Versterben als geheilt. Eine Person hatte zum Zeitpunkt des Todes Blasenkrebs. Einer der frisch Verstorbenen litt an Hepatitis, ein weiterer hatte eine Pankreasfibrose. Zu Wohnort und Beruf wurden ebenfalls Angaben gemacht, die an dieser Stelle jedoch nicht weiter ausgeführt werden sollen.

Unter den Verstorbenen dieser Studie befanden sich sieben Raucher, sechs Personen, für die kein Tabakkonsum bekannt war und sieben Verwender von Snus. Fünf der sieben Snuser konsumierten auch Zigaretten. Teilweise konnten Informationen durch Angehörige der Raucher zum individuellen Tabakkonsum gesammelt werden. Die Angaben variierten zwischen einem halben und zwei Päckchen pro Tag. Für die Snuser wurde nur eine klare Angabe mit fünf Dosen pro Woche gemacht.

Die Verwender von Snus waren alle bis auf eine Ausnahme männlichen Geschlechts. Die Gruppe der sieben Raucher setzte sich aus drei Männern und vier Frauen zusammen, die Gruppe der Nichtraucher aus vier Männern und zwei Frauen. Die Cotinin-Messungen von Urin und Zehennägeln zur Einschätzung des Rauch- oder Snusstatus stimmten mit den gesammelten Informationen aus den Fragebögen vollständig überein.

Alter, Gewicht, Größe und Body-Mass-Index wurden für alle 20 frisch Verstorbenen dokumentiert und in Tabelle 3-3 unter Berücksichtigung des Geschlechts dargestellt.

Tabelle 3-3: Übersicht der Charakteristika der frisch Verstorbenen aus der Rechtsmedizin Solna, Stockholm (MW \pm SE)

	Gesamt N = 20	Frauen N = 7	Männer N = 13
Alter [J.]	47,0 \pm 4,2	49,6 \pm 6,4	45,6 \pm 5,5
Gewicht [kg]	81,3 \pm 4,0	72,6 \pm 5,1	86,0 \pm 5,1
Größe [cm]	175,2 \pm 2,1	166,0 \pm 1,3	180,2 \pm 2,1
BMI [kg/m ²]	26,4 \pm 1,0	26,3 \pm 1,8	26,4 \pm 1,3

Ein deutlich signifikanter Unterschied fand sich wie erwartet beim Vergleich der Körpergröße von Männern und Frauen ($p < 0,001$). Bezüglich des Alters, des Gewichts und des Body-Mass-Index bestanden zwischen den Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede.

3.2 Untersuchung des humanen Pankreasgewebes auf HPB-freisetzende DNA-Addukte

3.2.1 Isolierung und Bestimmung der DNA aus Pankreasgewebe

Von den 105 gesammelten Pankreasgewebeproben der Rechtsmedizin München konnte aus 71 Proben DNA isoliert werden, die den Reinheitsanforderungen (siehe Kapitel 2.2.2.2) entsprach. Da die DNA-Isolierung stets im doppelten Ansatz durchgeführt wurde, konnten zusätzlich 47 saubere DNA-Lösungen als Duplikate für weitere Analysen zurückgelegt werden. Pankreasgewebe, aus dem keine reine DNA gewonnen werden konnte, wurde ein weiteres Mal unter vermehrter Zugabe von „Proteinase K“ und „Wash Buffer“ aus dem Invisorb® Spin Tissue Midi Kit gemäß dem Protokoll zur DNA-Isolierung aufbereitet. Erst wenn auch dann die erhaltene DNA-Lösung verunreinigt war, wurde die Pankreasprobe von weiteren Versuchen ausgeschlossen. DNA-Lösungen, welche die Reinheitsanforderungen nur knapp

verfehlten, wurden weiter aufgereinigt. Dazu bearbeitete man die DNA-Lösung analog einer lysierten Gewebeprobe gemäß dem Protokoll zur DNA-Isolierung und erhielt auf dieser Weise meist eine DNA-Lösung mit geringem Gehaltsverlust, aber ausreichender Reinheit.

Aus den 20 Pankreasgewebeproben, die aus der Rechtsmedizin Stockholm stammten, konnte in 15 Fällen eine saubere DNA gewonnen werden. Weiterhin wurden sechs DNA-Lösungen als Duplikate hergestellt. Eine Übersicht zu Herkunft, Anzahl, Einwaage und Ausbeute aller Gewebeproben zeigt Tabelle 3-4.

Tabelle 3-4: Isolierung der DNA aus Pankreasgewebe; MW \pm SD

Herkunft	Anzahl	Einwaage [mg]	absolute Ausbeute [μg]	relative Ausbeute [% der Einwaage]
München	118	101,0 \pm 5,5	209,0 \pm 97,8	0,21 \pm 0,09
Stockholm	21	106,9 \pm 2,9	187,5 \pm 91,4	0,18 \pm 0,09

Der Ausschlussgrund für DNA-Lösungen war neben der selteneren Proteinverunreinigung die Verunreinigung durch Polysaccharide, welche auf das Vorhandensein von Bakterien hinweisen. Das Vorkommen von Bakterien in Pankreasgewebe ist leicht erklärbar, wenn man bedenkt, dass nach dem Tod des Menschen sämtliche Abwehrvorgänge zum Erliegen kommen und Darmbakterien aus dem räumlich nahe gelegenen Duodenum direkt durch den Ductus pancreaticus in die Bauchspeicheldrüse einwandern.

Ein weiteres Problem stellt die schnelle Zersetzung des Pankreasgewebes durch Autolyse dar. Pankreasenzyme, die zur Verdauung von Nahrungsbestandteilen synthetisiert werden, liegen im lebenden Organismus in inaktiven Vorstufen (sog. Zymogene) in der Bauchspeicheldrüse vor. Proteaseinhibitoren und eine kurze Verweildauer schützen vor einer Aktivierung der Zymogene. Erst beim Eintreffen des Pankreassaftes im Dünndarm werden sie durch Spaltung aktiv und helfen bei der Verdauung des Nahrungsbreis. Nach dem Tod fallen verschiedene Schutzfaktoren weg und so entstehen aus den Zymogenen bereits im Pankreasgewebe aktive Enzyme wie Lipasen, Proteasen und Desoxyribonukleasen. Diese führen direkt zum Abbau von Gewebestrukturen und DNA. Warme Temperaturen am Todes- oder Auffundort des Verstorbenen begünstigen die Zersetzungsprozesse.

Je kürzer also die Zeitspanne zwischen Tod und Probennahme war, desto größer war auch die Wahrscheinlichkeit der Gewinnung einer ausreichend sauberen DNA-Lö-

sung. Es ist wenig überraschend, dass fast 80 % der Gewebeproben, aus denen keine saubere DNA isoliert werden konnte, von Verstorbenen stammten, von denen lediglich Auffunddatum und -zeitpunkt bekannt waren. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen erfolgreich und nicht erfolgreich isolierter DNA in Bezug auf die Zeitdifferenz zwischen Tod bzw. Auffinden der Leiche und Sektion bestand jedoch nicht. Beim Vergleich des Alters der Verstorbenen von denen reine bzw. verunreinigte DNA erhalten wurde, zeigt sich ein signifikanter Unterschied (Abbildung 3-2).

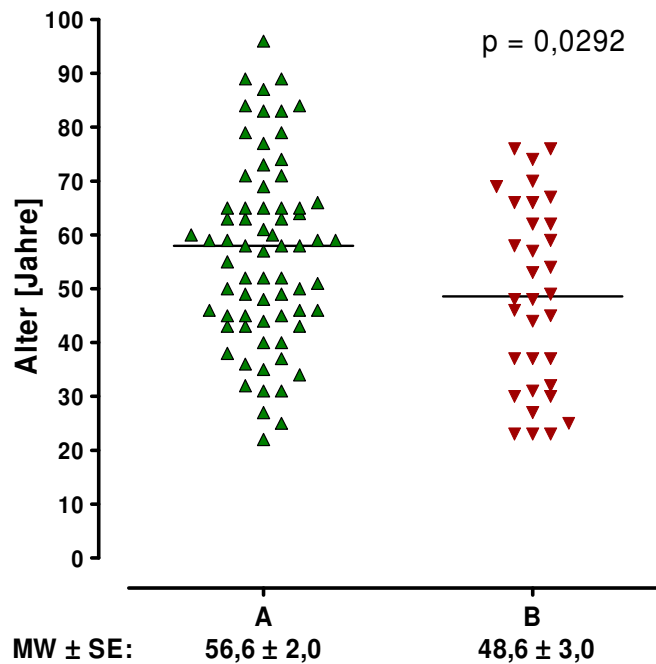


Abbildung 3-2: Altersvergleich der Verstorbenen aus deren Pankreasgewebe erfolgreich (A) und nicht erfolgreich (B) DNA isoliert wurde; die Linien stellen die Medianwerte dar

Vermeehrt waren es Verstorbene höheren Alters, aus deren Pankreasgewebe die DNA-Isolierung gelang. Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass sie oft natürlichen Todes wie zum Beispiel an Herzinfarkt oder Schlaganfall starben und in vielen Fällen noch selbst oder durch Angehörige ein Rettungsdienst alarmiert werden konnte. Jüngere Menschen starben durchschnittlich öfter an einer Betäubungsmittel- oder Alkoholintoxikation und wurden erst zu einem nicht genau rekonstruierbaren Zeitpunkt nach dem Versterben aufgefunden. Je länger der Todeszeitpunkt zurücklag, desto wahrscheinlicher war es, dass das Pankreasgewebe bereits durch beginnende Autolyse zersetzt war, selbst wenn ein offensichtliches Vorhandensein von Fäulnis durch das ärztliche Personal ausgeschlossen werden konnte.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen erfolgte mit Hilfe einer photometrischen Messung. Es ergaben sich keine Verluste der Prüflösung, da das

eingesetzte Prüfvolumen von 4 µl nach erfolgter Messung wieder zurück pipettiert werden konnte. Abbildung 3-3 zeigt ein beispielhaftes UV/VIS-Spektrum einer DNA-Lösung, die aus Pankreasgewebe gewonnen wurde.

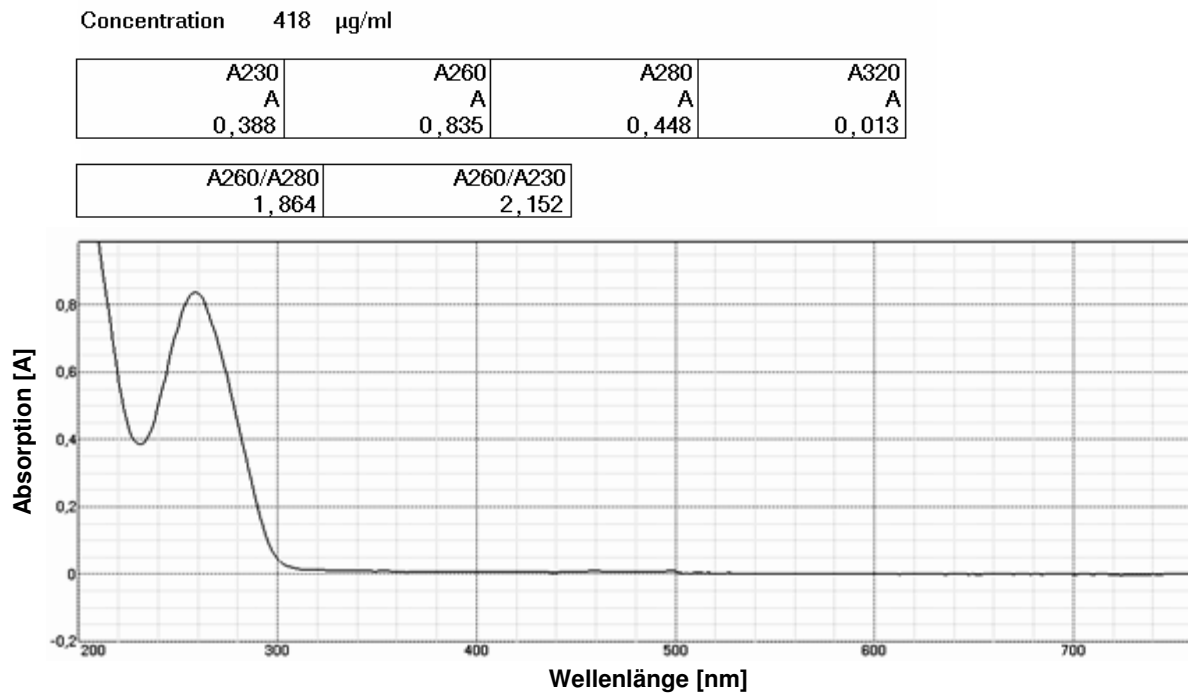


Abbildung 3-3: Typisches UV/VIS-Spektrum einer Pankreas-DNA-Lösung mit Angabe der Absorptionen verschiedener Wellenlängen, den Quotienten zur Reinheitsbestimmung und dem errechneten Gehalt

Wenn beide DNA-Lösungen aus dem doppelten Ansatz einer Gewebeprobe den Reinheitsanforderungen entsprachen wurden sie vereinigt, gründlich vermischt, wieder exakt auf die Probengefäße verteilt und erneut vermessen. Auf diese Weise konnten im Idealfall pro Pankreasgewebe zwei homogene DNA-Lösungen hergestellt werden.

3.2.2 Analytik von HPB

3.2.2.1 Identifizierung von HPB

Zur eindeutigen Identifizierung von derivatisiertem HPB wurde ein Massenspektrum im Scan-Modus aufgenommen. Dazu verwendete man einen Mikroliter einer Standard-Lösung der Konzentration 100 pg/µl. Um alle relevanten Fragment-Ionen zu erfassen, wurde ein Massenbereich von 100 bis 400 Dalton gewählt. Die negativ-chemische Ionisation führt als weiche Ionisationsart zu einer geringen Fragmentierung des Analyten, die sich im Hinblick auf eine eindeutige Substanzzuordnung als günstig erweist. Im Massenspektrum zeigt sich bei m/z 359 das Molekülion $[M^-]$ mit relativ großer Intensität. Das Fragment m/z 167 zeigt ein Pentafluorobenzoyl-Ion, das beim Zerfall

des Analyten entsteht. Wie in Abbildung 3-4 gezeigt, sind beide Fragmente mit der Struktur von derivatisiertem HPB vereinbar. Der interne deuterierte Standard d_4 -HPB wurde auf die gleiche Weise wie HPB derivatisiert und im Massenspektrometer im gleichen Ausmaß fragmentiert. Das zugehörige Molekülion $[M^-]$ erscheint wie erwartet bei m/z 363.

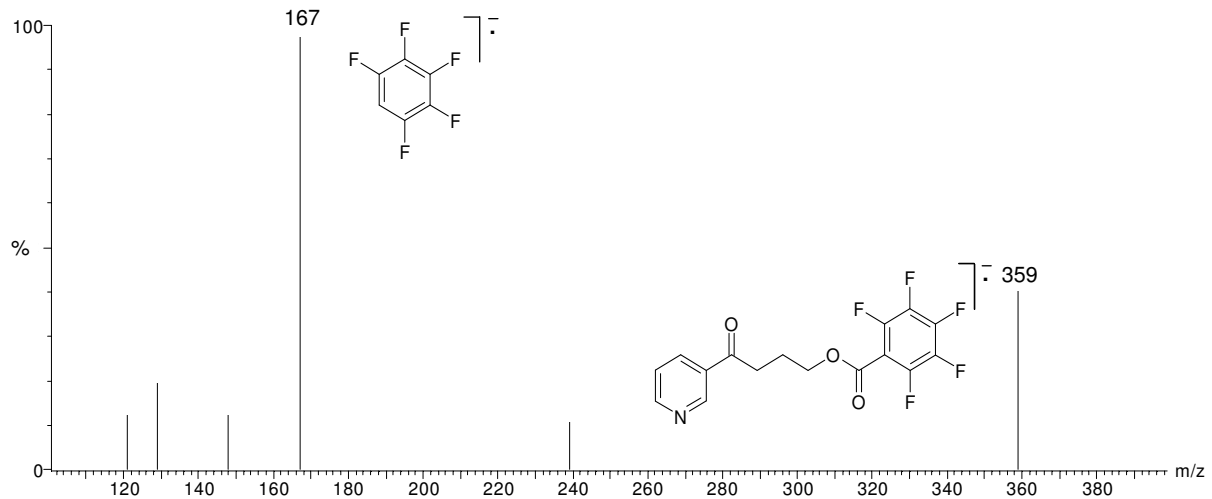


Abbildung 3-4: Massenspektrum von 100 pg eines derivatisierten HPB-Standards

3.2.2.2 Bestimmung von Linearität, Nachweisgrenze und Wiederfindung

Um die Linearität und die Nachweisgrenze der Methode zu definieren, wurde eine Kalibriergerade angefertigt. Dazu wurde Lachssperma-DNA in „Elution Buffer D“ aus dem Invisorb® Spin Tissue Midi Kit gelöst, HPB wurde in aufsteigender, der interne Standard d_4 -HPB in konstanter Menge zugegeben. Alle Proben durchliefen den kompletten Analysengang entsprechend dem Laborprotokoll und wurden mit Hilfe eines Autosamplers in das GC-MS injiziert und vermessen.

Wie Abbildung 3-5 zeigt, wurde der Quotient aus den Peakflächen von HPB und dem internen Standard d_4 -HPB gebildet und gegen die Konzentration der jeweiligen Probe aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression betrug 0,99.

Die Nachweisgrenze eines analytischen Verfahrens wird allgemein als die kleinste Substanzmenge bezeichnet, die gerade noch zuverlässig nachgewiesen werden kann. Da kein Blindwert bei den Messungen auftrat, konnte die in der chromatographischen Praxis übliche Methode zur Bestimmung der Nachweisgrenze verwendet werden: Die Bestimmung der Konzentration, bei der die Mindestanforderung eines Signal-Rausch-Verhältnisses von 3:1 erfüllt ist.

Bei Durchlaufen des kompletten Analysengangs konnte so eine Nachweisgrenze von 3,3 fmol HPB/ μ l ermittelt werden. Bezogen auf die verwendete DNA-Konzentration von 440 μ g/ml betrug sie 149,1 fmol HPB/mg DNA entsprechend 24,6 pg HPB/mg DNA.

Da die Bestimmung von Linearität und Nachweisgrenze lediglich eine Momentaufnahme darstellt, dienen die Ergebnisse zur Einschätzung der Grenzen dieser analytischen Methode und keinesfalls zur Festlegung von allgemein gültigen Richtwerten. Die Messempfindlichkeit des GC-MS-Systems unterliegt grundsätzlich geringen Schwankungen, die beispielsweise aus Druckänderungen der Ionisationsquelle, dem täglichen Tuning oder dem Alter des Filaments resultieren.

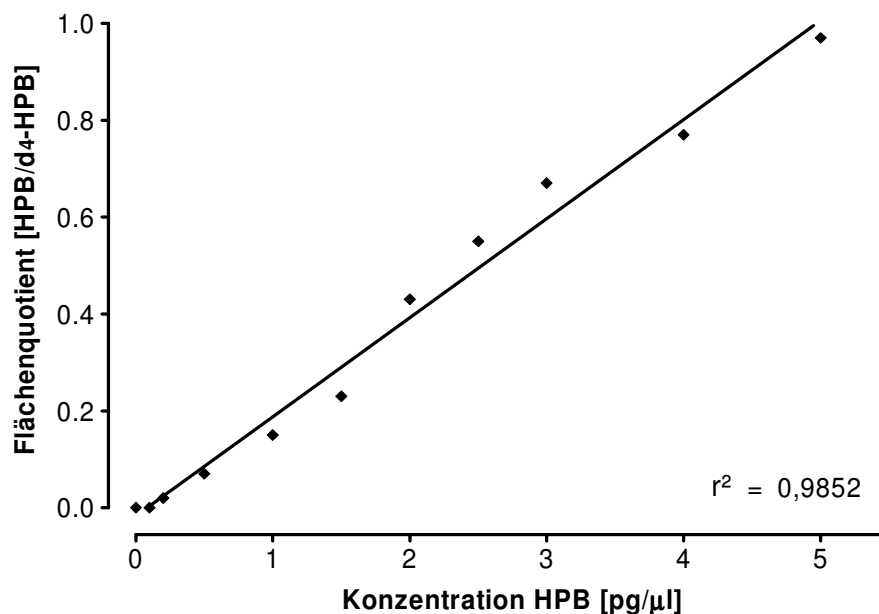


Abbildung 3-5: Kalibriergerade der Verdünnungsreihe zur Bestimmung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten mit Angabe des Bestimmtheitsmaßes der linearen Regression

Die Wiederfindungsrate wurde aus dem Mittel des internen Standards von sechs beispielhaften Probenreihen und dem jeweils zugehörigen direkt derivatisierten d₄-HPB-Standard berechnet. Sie betrug $74,5 \pm 11,4$ % (MW \pm SD).

Die Bestimmung von Tages- und Wochenpräzision wurde in der Dissertation von Heppel [211] beschrieben. Je sechs Aliquote der DNA aus Leber einer NNK-behandelten Ratte wurden für die Analyse verwendet. Die Variationskoeffizienten betragen für die Tagespräzision 2,68 % und für die Wochenpräzision 3,05 %.

3.2.2.3 Untersuchung auf HPB-freisetzende DNA-Addukte

Insgesamt 86 Pankreaskopfgewebeproben von 36 Rauchern, 46 Nichtrauchern und 4 Snusern, aus denen erfolgreich DNA isoliert werden konnte, wurden auf HPB-freisetzende DNA-Addukte getestet. Es wurde in keiner von 69 Pankreasgewebeproben, die aus der Rechtsmedizin München stammten, HPB nachgewiesen. Nur in zwei Proben wurde der Analyt zunächst gefunden. Beide Gewebeproben stammten von Rauchern, deren Leberfunktion durch Alkoholismus oder Hepatitis eingeschränkt war. Die gefundenen Addukt mengen lagen jedoch mit 58 und 23 fmol/mg DNA weit unterhalb der ermittelten Nachweisgrenze von 149,1 fmol HPB/mg DNA. Bei Wiederholung der gesamten Analyse aus den zwei Gewebeproben konnte kein HPB mehr gefunden werden. Auch in den 15 Pankreasgewebeproben, die aus der Rechtsmedizin Stockholm stammten, wurden keine HPB-freisetzenden DNA-Addukte gefunden.

Abbildung 3-6 zeigt die Chromatogramme eines starken Rauchers sowie die Leerprobe der zugehörigen Probenreihe. In der Massenspur des HPB ist ebenso wie in dem Leerwert kein Analyt zu finden.

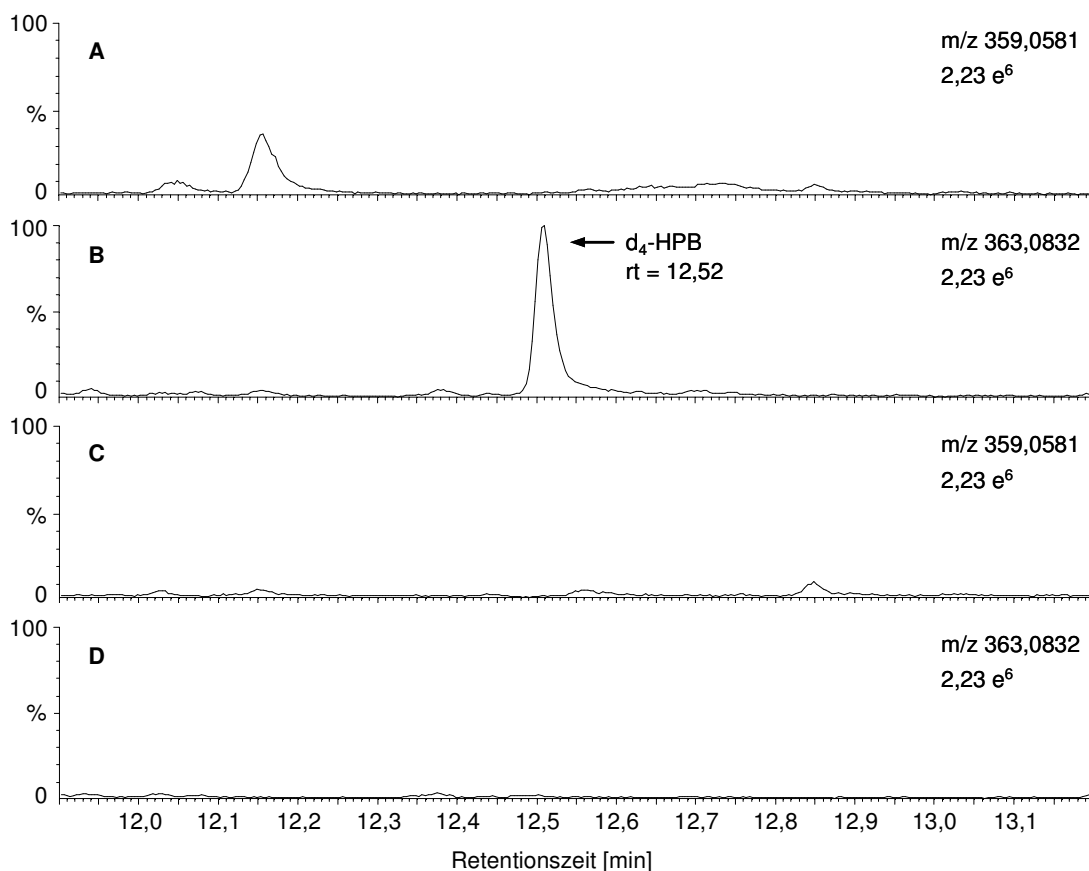


Abbildung 3-6: GC-MS-Chromatogramme einer Pankreasgewebeprobe (A und B: Massenspuren von HPB und dem internen Standard d_4 -HPB) und eines Leerwerts (C und D: Massenspuren von HPB und dem internen Standard d_4 -HPB)

3.3 Methodenentwicklung der Diol-Analytik

3.3.1 Versuche mit einfach derivatisiertem Diol

Zunächst wurden 2 ng 1-(3-Pyridyl)-1,4-butandiol (Diol) auf die gleiche Weise wie HPB derivatisiert, um die Flüchtigkeit und die Elektronegativität der Verbindung zu erhöhen (Abbildung 3-7).

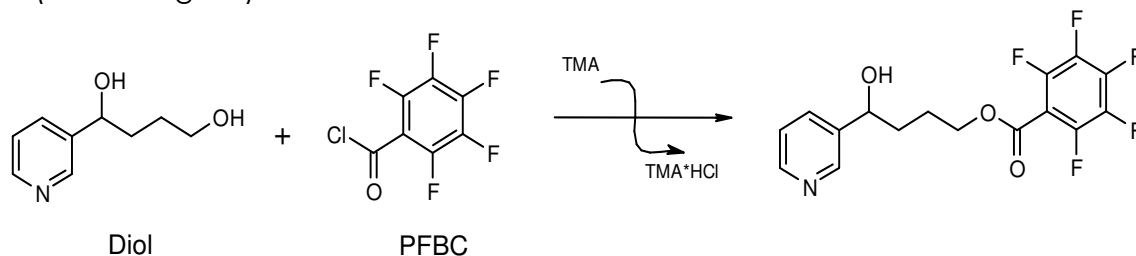


Abbildung 3-7: Reaktionsgleichung der Derivatisierung von 1-(3-Pyridyl)-1,4-butandiol (Diol) mit Pentafluorobenzoylchlorid (PFBC)

Das derivatisierte Diol wurde auf eine Konzentration von 200 pg/μl verdünnt und im Scan-Modus des GC-MS analysiert (Abbildung 3-8). Das Hauptfragment bei m/z 341,6 lässt sich mit der Struktur des derivatisierten Diols nach Abspaltung eines Fluoratoms $[M-F]^-$ vereinbaren. Das Fragment bei m/z 165,5 stellt ein typisches Abspaltungsprodukt von Pentafluorobenzoylestern dar. Damit konnte gezeigt werden, dass die oben beschriebene Esterbildung stattfindet.

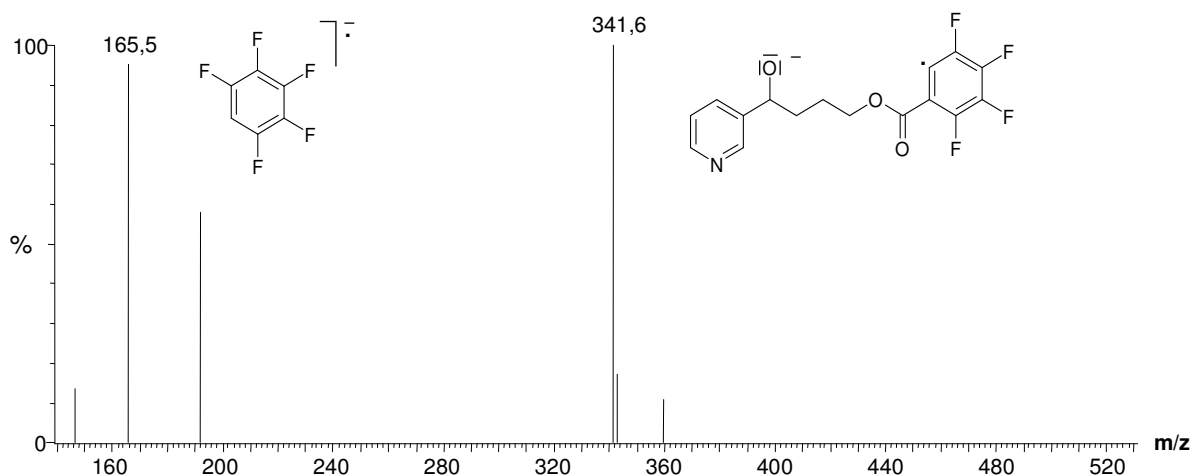


Abbildung 3-8: Massenspektrum von 200 pg eines einfach derivatisierten Diol-Standards mit typischen Zerfallsfragmenten

Das einfach derivatisierte Diol zeigte bei Verwendung einer neuen GC-Säule des Typs Factor Four VF-17ms ein gutes chromatographisches Verhalten mit ausreichend schmalen Peaks. Nach mehrmaligem Einspritzen ließ sich jedoch eine starke Peak-

verbreiterung von bis zu 2 min beobachten, die in der chromatographischen Praxis inakzeptabel ist (Abbildung 3-9).

Die Trennleistung der Säule ließ nach jedem chromatographischen Lauf mit dem neuen Molekül sichtbar nach. Dieses Phänomen konnte für das derivatisierte HPB nicht beobachtet werden und so wurde vermutet, dass die Ursache in der freien Hydroxylgruppe des derivatisierten Diols zu finden ist, denn nur in dieser einzigen funktionellen Gruppe unterscheidet sich der neue Analyt von derivatisiertem HPB. Es ist möglich, dass der Säulenfilm nach mehrfacher Benutzung schnell altert und reaktive Bindungsstellen entstehen, mit welchen die Hydroxylgruppe des derivatisierten Diols interagiert und so die Trennleistung sinkt.

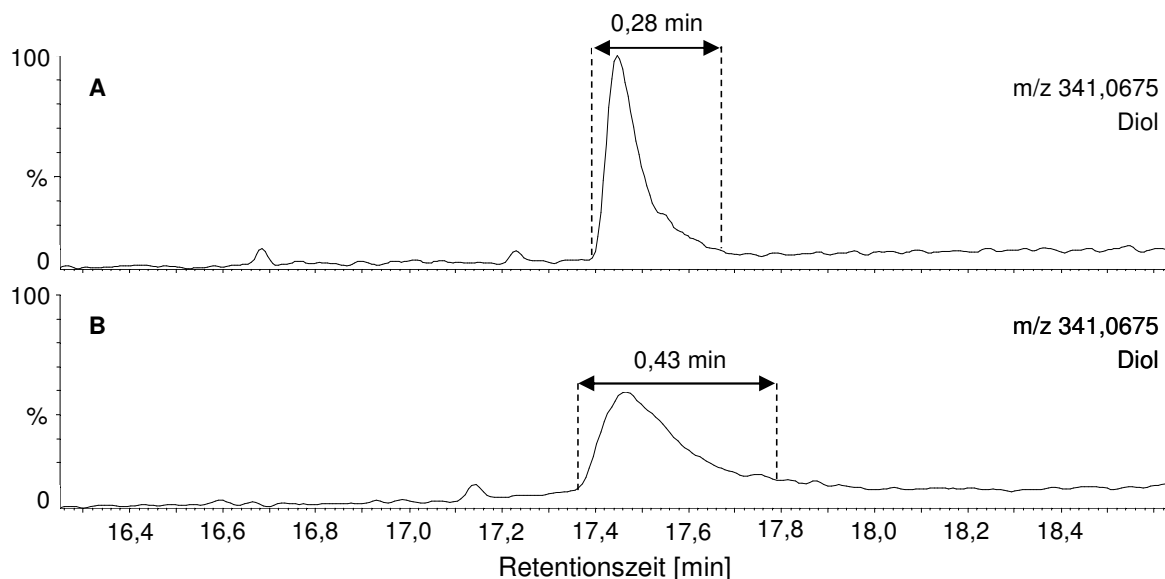


Abbildung 3-9: Chromatogramme eines einfach derivatisierten Diol-Standards mit zunehmenden „Tailing“ des Peaks von Lauf A zum Folgelauf B

Versuche zur Regeneration der Säule durch Ausheizen bei 300 °C über Nacht oder Kürzen der Säulenenden blieben daher ohne Erfolg. Eine mögliche Ursache des Problems durch eine verstärkte Retention der Substanz im Glasliner konnte ausgeschlossen werden, indem man ihn gründlich gereinigt und silyliert sowie unsilyliert getestet hatte. Ein störender Einfluss der verwendeten Lösemittelmischung aus Hexan und Dichlormethan konnte durch Testen verschiedener Lösemittelanteile ebenfalls ausgeschlossen werden.

In der Folge wurde eine Ultra-Low-Bleed-Säule höchster Qualität (50 %-Phenyl-50 %-Dimethylpolysiloxanphase) eingebaut und getestet. Auch hiermit konnte keine dauerhaft gute Trennleistung erzielt werden. Des Weiteren wurden Säulen mit verschie-

denen Trennfilmen wie 5 %-Phenylpolysiloxan, 100 %-Dimethylpolysiloxan oder Polyethylenglykol untersucht. Keine der Säulen zeigte einen Vorteil gegenüber der für die HPB-Analytik routinemäßig verwendeten Säule.

Als letzter Versuch wurde zum Blockieren der freien Bindungsstellen ein acetonischer Tabakextrakt hergestellt, der in konzentrierter Form in das GC-MS-System injiziert wurde. Ein anschließender chromatographischer Lauf des einfach derivatisierten Diols ergab zwar einen schmalen Peak, die Wirkung ließ jedoch schon im nachfolgenden Lauf drastisch nach. Ein Zumischen von Tabakextrakt zum Diol-Standard ergab chromatographische Läufe mit vielen Störpeaks und Peaküberlagerung und war damit ebenfalls nicht praxistauglich. Allgemein ließ die Behandlung der Trennsäule mit dem Tabakextrakt die Säule wesentlich schneller altern und ist daher für häufige Anwendung nicht zu empfehlen.

3.3.2 Identifizierung des zweifach derivatisierten Diols

Um eine Bestimmung des Diols mittels GC-MS zu ermöglichen, wurde nach einer Veresterung der primären Alkoholgruppe mit Pentafluorobenzoylchlorid und Trimethylamin eine Veresterung der zuvor störenden freien Alkoholgruppe mit Pivalinsäureanhydrid und Dimethylaminopyridin durchgeführt. Als Grundlage für diese zweite Derivatisierung diente eine Methode zur Bestimmung von N7-(2'-Hydroxyethyl)guanin mittels GC-MS nach Kao et al. [213]. Auch hier wurde im letzten Schritt einer dreistufigen Reaktion eine freie Alkoholgruppe der DNA-Base derivatisiert.

Zur Identifizierung wurde ein Massenspektrum eines zweifach derivatisierten Diol-Standards (25 ng/μl) im Scan-Modus aufgenommen (Abbildung 3-10). Durch die geringe Fragmentierungsneigung lässt sich mit großer Intensität das Moleküllion $[M^-]$ bei m/z 445 finden. Das Fragment bei m/z 167 zeigt ein Pentafluorobenzoylion, das typischerweise beim Zerfall dieses Moleküls entsteht. Der zugehörige Standard d_4 -Diol wurde auf die gleiche Weise derivatisiert und zeigte im Scan ebenfalls mit großer Intensität ein Moleküllion $[M^-]$ bei m/z 449. Zur weiteren Identifizierung dienten die Retentionszeiten von Diol und d_4 -Diol, wobei der deuterierte Standard mit einer geringen zeitlichen Versetzung im Chromatogramm erscheint.

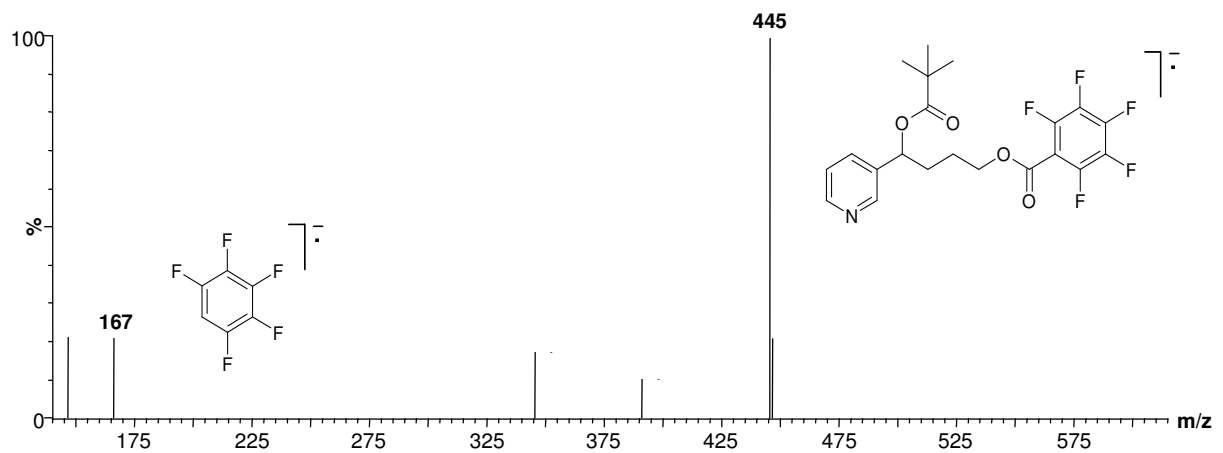


Abbildung 3-10: Massenspektrum des zweifach derivatisierten Diols

Im Gegensatz zu einfach derivatisiertem Diol zeigte der zweifache Ester des Diols keinerlei Peakverbreiterung. Schmale Peakbreiten von ca. 4 s blieben während der gesamten Versuche mit dem Analyten erhalten. Abbildung 3-11 zeigt die Chromatogramme des Tagesstandards, der aus Verdünnungen der vier derivatisierten Verbindungen HPB, d_4 -HPB, Diol und d_4 -Diol gemischt wurde. Die Massenspuren von Diol und d_4 -Diol weisen besonders niedrige, von Störsignalen freie Grundlinien auf.

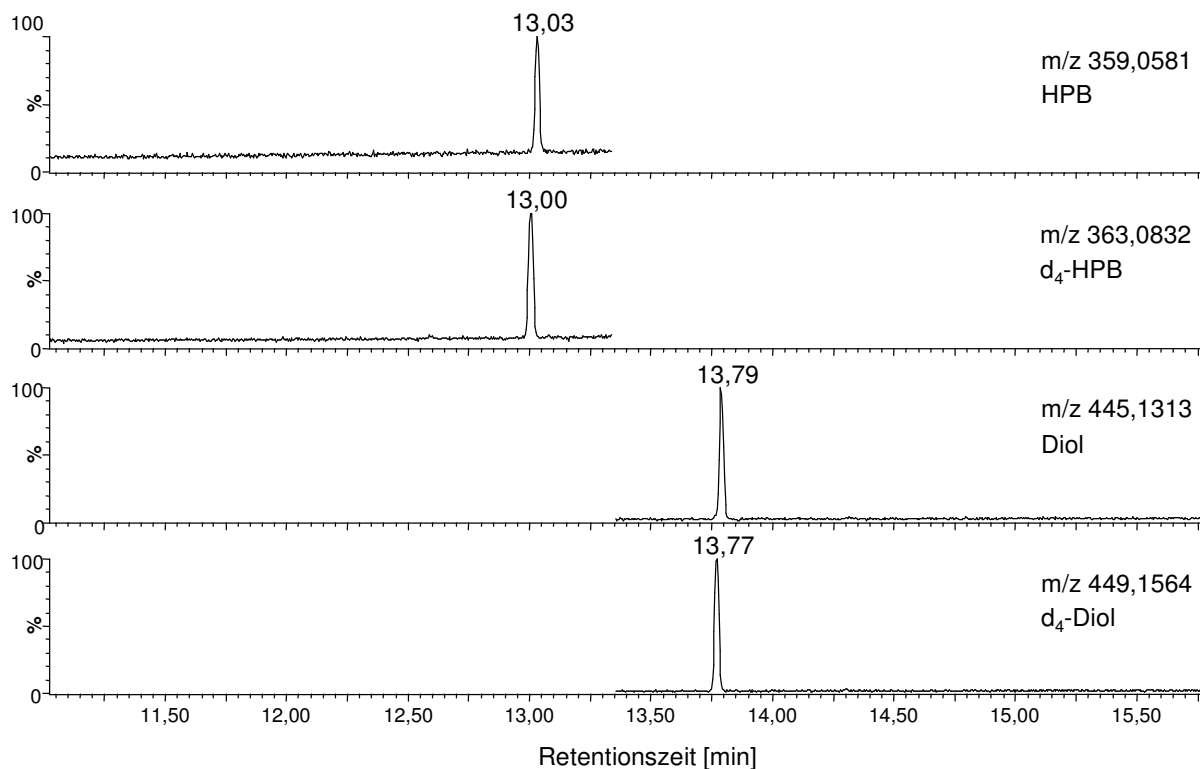


Abbildung 3-11: Chromatogramme des Tagesstandards mit geringfügigen Unterschieden der Retentionszeiten der deuterierten und nicht deuterierten Moleküle

3.3.3 Optimierung der Diol-Derivatisierung

Nach einer ersten erfolgreichen Zweifach-Derivatisierung von Diol wurde die Methode durch Veränderung verschiedenster Versuchsparameter hinsichtlich Ausbeute und Präzision optimiert. Zusätzlich wurde versucht, den zeitlichen Aufwand für die Durchführung der Analysen zu verkürzen.

Die Methode nach Kao et al. [213] sieht Acetonitril, ein Lösemittel mit einem geringen Dampfdruck von 97 hPa als Reaktionsmedium für die Derivatisierung vor. Mit dem Ziel die Trocknungszeit nach der Reaktion unter konstantem Stickstoffstrom zu verkürzen, wurde getestet, ob der Einsatz des Lösemittels Dichlormethan mit einem höheren Dampfdruck von 470 hPa ebenfalls möglich wäre. Abbildung 3-12 zeigt, dass die Derivatisierung grundsätzlich stattfindet, die Ausbeute an Reaktionsprodukt jedoch nur etwa halb so groß ist. Für weitere Versuche wurde daher als Reaktionsmedium Acetonitril verwendet.

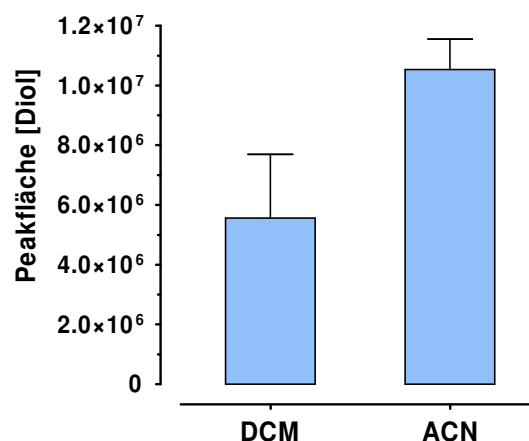


Abbildung 3-12: Vergleich von Dichlormethan (DCM) und Acetonitril (ACN) als Lösungsmittel für die Derivatisierung von 10 ng/μl Diol (DCM: $5,6 \times 10^6 \pm 2,1 \times 10^6$; ACN: $11,0 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^6$; MW ± SE, n=3)

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion nach der Derivatisierung dient der Trennung des Analyten von Reaktionsnebenprodukten und nicht verbrauchten Ausgangsstoffen, welche die Analyse mittels GS-MS stören würden. Kao et al. [213] verwendeten in einer zweistufigen Extraktion Wasser und Hexan, wobei der Analyt quantitativ in der organischen Phase angereichert wird. Zur Verbesserung der Extraktion von zweifach derivatisiertem Diol wurden verschiedene Lösemittelsysteme getestet. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Versuche mit zweifacher Extraktion sowie identischen Lösemittelvolumina durchgeführt. Die Verwendung von Hexan und Phosphatpuffer (pH 7,4) erwies sich gegenüber allen anderen getesteten Extraktionssystemen als überlegen (Abbildung 3-13). Durch die hohe Konzentration an Salzionen

steigt die Polarität des Wassers und bietet somit ein geringeres Lösevermögen für unpolare Stoffe. Eine stärkere Anreicherung des Analyten in der Hexan-Phase wird dadurch ermöglicht.

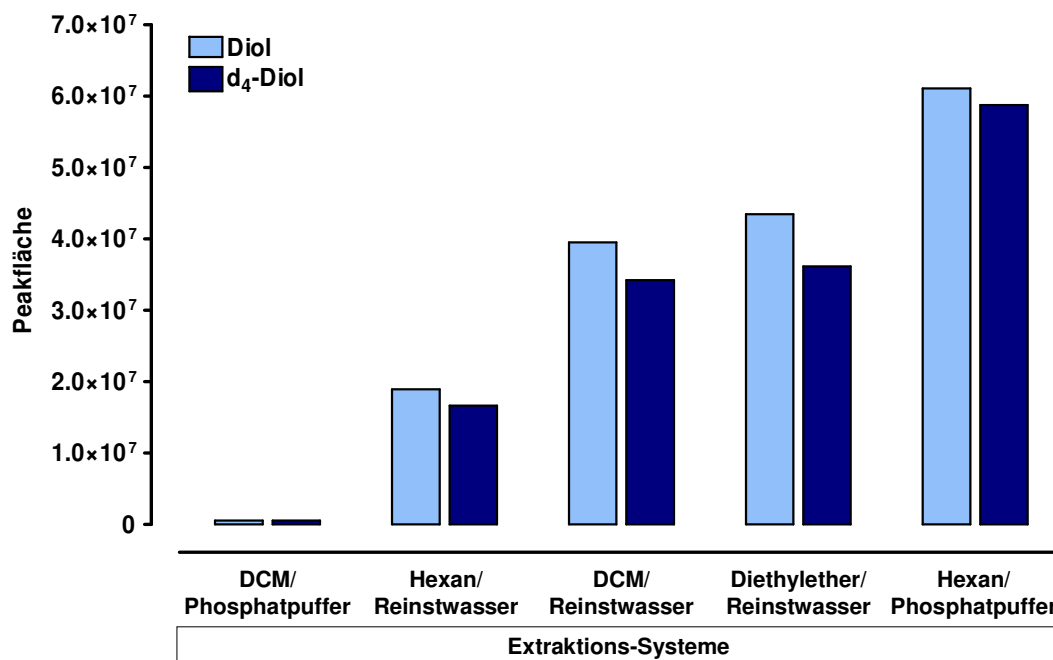


Abbildung 3-13: Einfluss der Extraktion mit verschiedenen Lösemitteln auf die Peakfläche von 10 ng zweifach derivatisiertem Diol und d₄-Diol

Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine zweifache Extraktion für eine quantitative Analyten-Ausbeute ausreichend ist. Die nach der ersten, zweiten und dritten Extraktion gewonnen organischen Hexan-Phasen wurden dazu einzeln weiterverarbeitet und vermessen. Tabelle 3-5 zeigt, dass schon während der ersten Extraktion rund 94 % des synthetisierten Moleküls in der organischen Phase zu finden sind. Ein zweiter Extraktionsschritt bringt weitere 5 % Ausbeute. In einer dritten Extraktion wird lediglich eine Ausbeute von 1 % erreicht und ist damit verzichtbar.

Tabelle 3-5: Extraktionsausbeute (%) von zweifach derivatisiertem Diol mit Hexan und Phosphatpuffer

	Versuch 1	Versuch 2
1. Extraktion	94,9	93,0
2. Extraktion	3,6	6,5
3. Extraktion	1,5	0,5

Die Reaktionsdauer der zweiten Derivatisierung konnte deutlich verkürzt werden. Während Kao et al. [213] eine sehr lange Derivatisierungszeit von 20 Stunden anga-

ben, wurden mit nur 20 min gute Ergebnisse erzielt. Längere Reaktionszeiten von 60 oder 90 min verringerten sogar die Ausbeute an derivatisiertem Diol.

Die Mengenverhältnisse der Komponenten der Reaktionsmischung wurden dagegen nicht verändert. Verschiedene Pivalinsäureanhydrid-Anteile brachten im Versuch keinen Vorteil gegenüber der von Kao et al. [213] angegebenen Mischung.

Um die Präzision der Methode zu verbessern, wurden Versuche mit Methanol als Stoppreagenz durchgeführt. Als Grundlage diente hierfür die Vorschrift zur Derivatisierung aromatischer Amine mit Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) [215], wonach 50 µl Methanol zugegeben werden, um nach beendeter Reaktionszeit überschüssiges HFBA zu entfernen. Unter der Annahme, dass auch Pivalinsäureanhydrid mit Methanol unter Entstehung von Pivalinsäuremethylester vollständig umgesetzt wird, pipettierte man nach 20-minütiger Derivatisierungszeit 50 µl Methanol zur Reaktionsmischung. Auf diese Weise konnte nicht nur eine Verbesserung der Präzision beobachtet werden, es ergaben sich fast neunfach größere Peakflächen (Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: Peakflächen von 10 pg zweifach derivatisiertem Diol ohne und mit Zugabe von 50 µl Methanol nach der zweiten Derivatisierung

	Versuch 1	Versuch 2
ohne Methanolzugabe	2,52 e ⁶	1,83 e ⁶
mit Methanolzugabe	22,42 e ⁶	16,32 e ⁶

Als weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Diol-Analytik wurde der Einfluss der Quelltemperatur untersucht. In der Quelle des Massenspektrometers wird der Analyt durch negativ chemische Ionisation zu einem gewissen Anteil fraktioniert, registriert wird jedoch nur das unfraktionierte einfach negativ geladene Molekül. Das Ausmaß des Zerfalls hängt unter anderem von der Quelltemperatur ab. Durch eine Temperatursteigerung von 140 °C auf 160 °C konnte eine deutliche Zunahme der Peakintensität beobachtet werden.

3.3.4 Versuche zur Extraktion des Diols

Als Grundlage für die Versuche zur Extraktion wurde angenommen, dass die Freisetzung des Diols von der DNA durch eine vermutete, große strukturelle Ähnlichkeit zu HPB-DNA-Addukten ebenfalls durch Hydrolyse möglich ist. Vor der eigentlichen Extraktion wurde daher stets eine saure bzw. alkalische Hydrolyse durchgeführt, um sich späteren, realen Reaktionsbedingungen anzupassen.

Erste Versuche mit saurer Hydrolyse und anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan nach Vorbild der HPB-Extraktion brachten mit Wiederfindungsraten zwischen 1 und 10 % keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die Erhöhung des pH-Wertes auf pH 10 brachte eine maximale Wiederfindungsrate von etwa 28 %. Die zwei Alkoholgruppen verleihen dem Molekül eine relativ große Polarität. Die bessere Löslichkeit in wässrigen verglichen mit organischen Lösemitteln ist dadurch leicht erklärbar. Zusätzlich zu der geringen Wiederfindung wiesen die Chromatogramme viele Störpeaks in unmittelbarer Nähe des Analyten auf.

Im Vergleich zu Versuchen mit Flüssig-Flüssig-Extraktion brachten nachfolgende Versuche mit SPE-Säulchen bessere Ergebnisse. Verwendet wurden hierfür Umkehrphasen-SPE-Säulchen, die speziell für aromatische Verbindungen mit hydrophoben sowie hydrophilen Eigenschaften geeignet sind. Für alle Versuche mit den SPE-Säulchen wurde eine Lösung von Lachssperma-DNA (440 µg DNA/ml Elutionspuffer) mit den Analyten versetzt um mögliche Wechselwirkungen der DNA mit dem Säulenmaterial (wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen) zu berücksichtigen.

Zunächst wurden Versuche mit vorgeschalteter alkalischer Hydrolyse durchgeführt. Die alkalische Hydrolyse bei pH 14 aus der Dissertationsschrift von Hölzle [216] bietet den Vorteil einer kurzen Hydrolysedauer von nur einer Stunde. Die anschließende Elution wurde mit vorheriger pH-Wert-Einstellung auf pH 7,5; pH 8,5; pH 10 und pH 14 zunächst mit einer 10 %igen Acetonitril-Wasser-Mischung durchgeführt. Alle Eluate zeigten im GC-MS-Chromatogramm das Vorhandensein von Diol und d₄-Diol, welche zuvor der DNA-Lösung in gleichen Mengen von je 500 pg zugegeben wurden. Es konnte damit gezeigt werden, dass die Substanzen Diol und d₄-Diol an das Säulenmaterial binden. Die pH-Wert-Korrektur auf pH 7,5 und 8,5 ergab im Vergleich zu den höheren pH-Werten 10 und 14 Chromatogramme mit wesentlich weniger Störpeaks im Bereich des Analyten.

In einem nächsten Versuch wurde eine Elutionsreihe mit vier verschiedenen Acetonitril-Wasser-Mischungen (5-20 %ig) mit einem d₄-Diol-beladenen SPE-Säulchen getestet. Es wurde je 1 ml Elutionsmittel verwendet. Der Versuch zeigt, dass der Großteil des Diols bereits in der Fraktion der 5 %igen Acetonitril-Wasser-Mischung zu finden ist (Abbildung 3-14). Außerdem wurde deutlich, dass vor der Elution des Analyten ein Waschschriff mit 1 ml bidestilliertem Wasser möglich wenn nicht sogar unerlässlich ist, da die Chromatogramme ohne diesen Schritt eine hohe Grundlinie und viele Störpeaks aufweisen.

Weitere Versuche zur Extraktion des Diols bestätigten, dass die Bindung des Diols an das SPE-Material nur relativ schwach ist: Wurden zwei Waschschr itte mit je 1 ml bidest. Wasser durchgeführt, waren die resultierenden Peakflächen im direkten Vergleich zu Proben mit einem Waschschr itt nur etwa halb so groß.

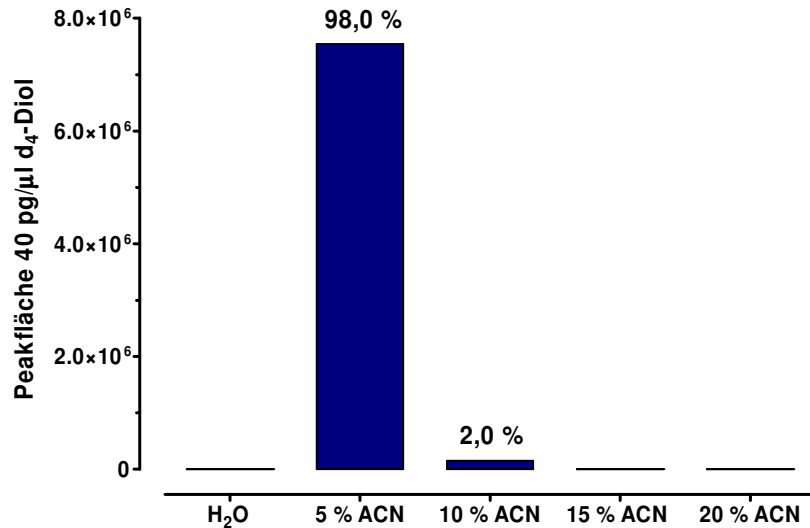


Abbildung 3-14: Resultierende Peakflächen der Elution von 400 pg d₄-Diol von einer Umkehrphasen-SPE-Säule unter Verwendung von verschiedenen Elutionsmitteln mit steigendem Acetonitrilanteil

Zur Verbesserung der sehr mühsamen Trocknung des wässrigen Eluats wurden weitere Elutionsmittel (z.B. Ethylacetat, Methanol, Dichlormethan) allein oder im Gemisch getestet. Bezogen auf Wiederfindung und Güte des Chromatogramms brachte jedoch die 5%ige Acetonitril-Wasser-Mischung die besten Ergebnisse. Abbildung 3-15 zeigt die deutlich geringere Ausbeute, wenn statt einer 5%igen Acetonitril-Wasser-Mischung eine Methanol-Acetonitril-Mischung (1:1) als Elutionsmittel verwendet wird.

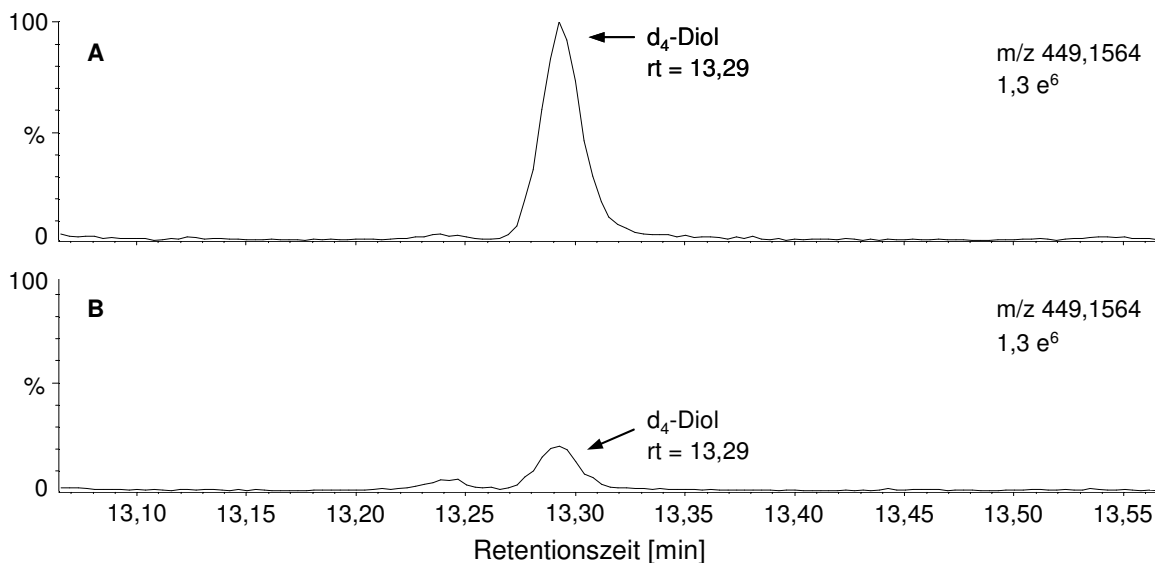


Abbildung 3-15: Chromatogramme von 40 pg zweifach derivatisiertem d₄-Diol; A: Elution mit 5 % Vol. Acetonitrilmischung; B: Elution mit MeOH/ACN (1:1)

3.3.5 Validierung der Diol-Analytik

Zur Bestimmung von Linearität und Nachweisgrenze der Methode zur Diol-Analytik wurde eine Kalibriergerade mit aufsteigenden Diol-Mengen und konstanter Zugabe von d_4 -Diol als internen Standard erstellt. Der untersuchte Konzentrationsbereich betrug 0,1-40 pg/ μ l Diol. Alle Proben der Verdünnungsreihe wurden gemäß dem Laborprotokoll zweifach derivatisiert und mit Hilfe des Autosamplers in das GC-MS injiziert und analysiert.

Aus den resultierenden Peakflächen von Diol und dem deuterierten Standard d_4 -Diol wurde der Quotient gebildet und gegen die Konzentration der entsprechenden Probe aufgetragen (Abbildung 3-16). Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression betrug für den untersuchten Konzentrationsbereich 0,9993.

Die Nachweisgrenze bezeichnet die kleinste Substanzmenge, die mit der verwendeten analytischen Methode gerade noch zuverlässig nachgewiesen werden kann. Da bei den Messungen kein Blindwert zu beobachten war, konnte eine in der chromatographischen Praxis übliche Methode zur Bestimmung der Nachweisgrenze angewendet werden. Es wurde die Diol-Konzentration bestimmt, bei der die Mindestanforderung eines des Signal-Rausch-Verhältnisses von 3:1 erfüllt war. Sie betrug 0,19 pg/ μ l entsprechend 1,15 fmol/ μ l. Wie bei der Methodvalidierung von HPB gilt auch hier die Einschränkung, dass die Messempfindlichkeit des GC-MS-Systems grundsätzlich Schwankungen unterliegt und daher die gefundenen analytischen Grenzen nicht allgemein übertragbar sind.

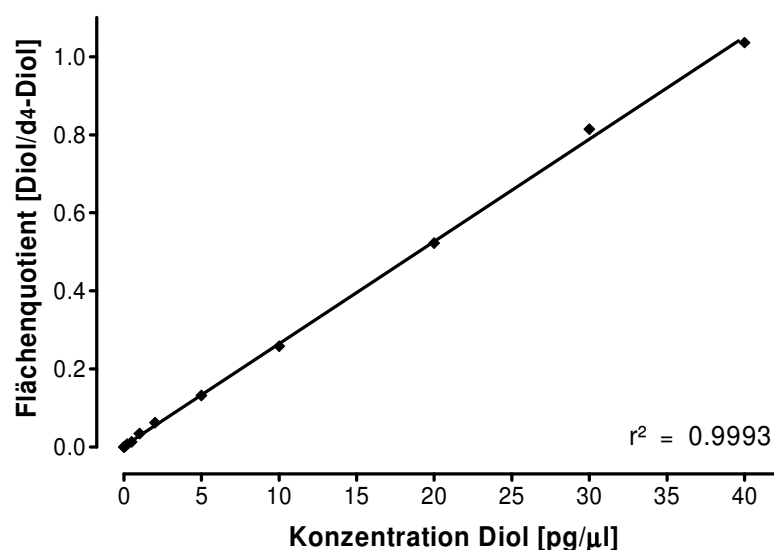


Abbildung 3-16: Kalibriergerade der Verdünnungsreihe des zweifach derivatisierten Diols mit Angabe des Bestimmtheitsmaßes der linearen Regression

3.4 Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin

3.4.1 Identifizierung von Cotinin, Nikotin und Myosmin

Die Identifizierung der Tabakalkaloide Cotinin, Nikotin und Myosmin mittels GC-MS im El^+ -Modus wurde von Schütte-Borkovec [214] bereits ausführlich beschrieben. Es wurden Massenspektren der drei Tabakalkaloide sowie deren deuterierte Verbindungen im Scan-Modus aufgenommen und mit entsprechenden Referenzspektren auf Übereinstimmung geprüft. Zusätzlich wurden zur Identifizierung die Retentionszeiten der Analyten im Chromatogramm herangezogen, wobei die deuterierte Substanz üblicherweise ein bis zwei Sekunden früher von der Trennsäule eluiert.

Im Folgenden werden die typischen Fragmentierungsmuster von Cotinin, Nikotin und Myosmin beschrieben, die durch Elektronenstoßionisation entstehen. Die deuterierten Verbindungen dieser Tabakalkaloide, die als interne Standards eingesetzt werden, zeigen nahezu identische Fragmentierungsreaktionen.

3.4.1.1 Fragmentierung von Cotinin

Durch Elektronenstoßionisation entsteht aus Cotinin zu einem relativ großen Anteil das einfach positiv geladene Molekülion bei m/z 176. Den intensivsten Peak im Massenspektrum (sog. Basispeak) bildet das Fragmention m/z 98. Weitere Hauptfragmente können auf den Massen 118, 119 und 147 beobachtet werden (Abbildung 3-17).

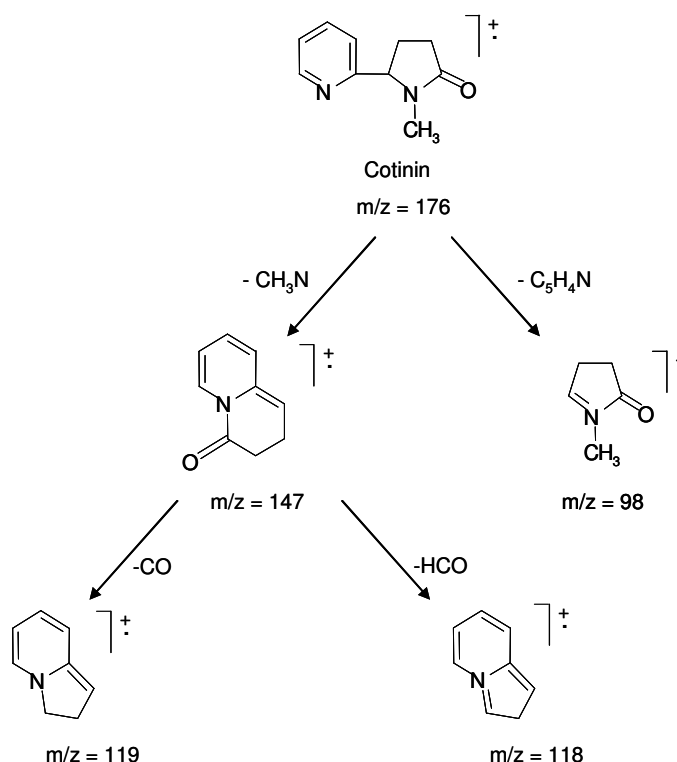


Abbildung 3-17: Fragmentierungsschema von Cotinin

3.4.1.2 Fragmentierung von Nikotin

Durch Elektronenstoßionisation zerfällt der Großteil des Nikotins in die Hauptfragmente m/z 84, 119, 133 und 134 (Abbildung 3-18), wobei das Fragmentation der Masse 84 den Basispeak darstellt. Das Molekülion von Nikotin zeigt sich wie erwartet beim Masse-Ladungs-Verhältnis 162.

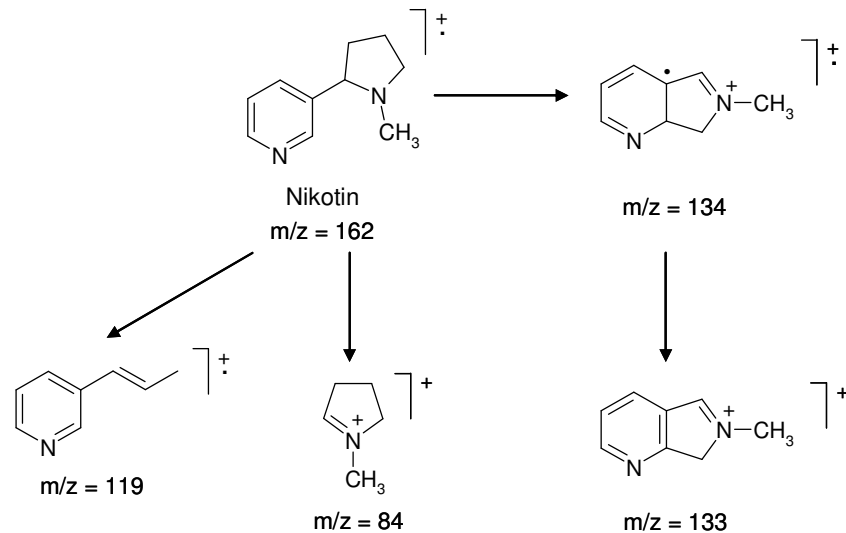


Abbildung 3-18: Fragmentierungsschema von Nikotin

3.4.1.3 Fragmentierung von Myosmin

Das Molekülion weist ein Masse-Ladungs-Verhältnis von 146 auf (Abbildung 3-19). Der Basispeak ist auf das mesomeriestabilisierte Fragmentation der Masse 118 zurückzuführen. Ein weiteres typisches Hauptfragment findet sich bei m/z 145.

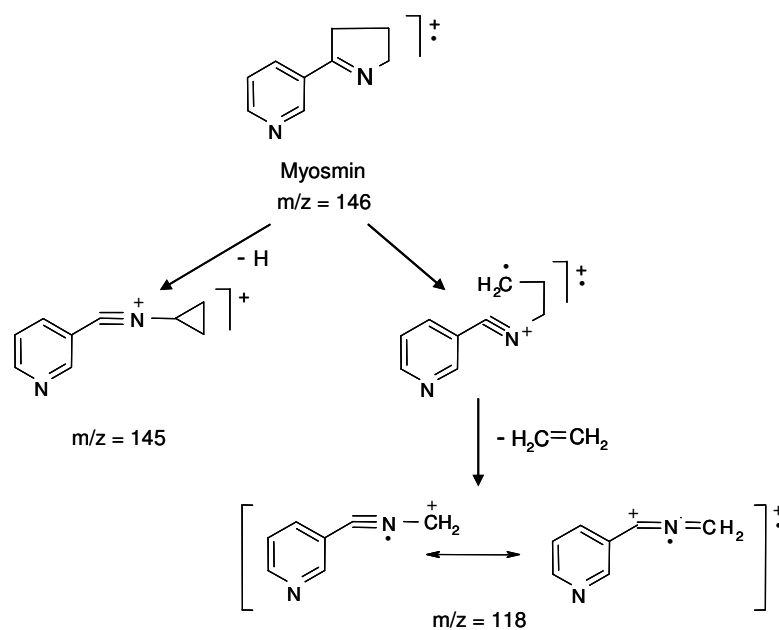


Abbildung 3-19: Fragmentierungsschema von Myosmin

3.4.2 Validierungsergebnisse der Methoden zur Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin aus verschiedenen Biomatrices

Die Validierung der GC-MS-Methoden zur Bestimmung der Tabakalkaloide Cotinin, Nikotin und Myosmin wurde im Rahmen der Promotion von Schütte-Borkovec durchgeführt und veröffentlicht [192,214].

Stellvertretend für Plasma, Speichel und Zehennägel wurden als Probenmatrices Kälberserum und synthetisch hergestelltes Keratinpulver verwendet. Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde das Kälberserum mit 0,2-3 ng/ml Cotinin und 0,01-2 ng/ml Myosmin versetzt. Das Keratinpulver wurde mit je 0,02-5 ng/g Cotinin und Nikotin sowie 0,001-2 ng/g Myosmin versetzt. Die Nachweisgrenzen, Wiederfindungsraten und Ergebnisse von Präzision und Linearität sind in den Tabellen 3-7 und 3-8 wiedergegeben.

Wie in der chromatographischen Praxis üblich, wurde die Bestimmungsgrenze (LOQ, limit of quantification) als der dreifache Wert der Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) definiert. Für die Berechnungen der Analyseergebnisse wurden Werte, welche unter der LOD lagen mit Null ersetzt und Werte, welche zwischen der LOD und der LOQ lagen durch den halben Betrag der LOQ ersetzt.

Tabelle 3-7: Validierung der Bestimmung von Cotinin und Myosmin in Speichel und Plasma

		Cotinin	Myosmin
Nachweisgrenze (LOD)	[ng/ml]	0,05	0,0012
Wiederfindung	[%]	91 ± 12	93 ± 10
Tagespräzision	Variationskoeffizient [%]	7,5	14,8
Wochenpräzision	Variationskoeffizient [%]	3,7	17,9
Linearität	Bestimmtheitsmaß [r ²]	0,98	0,99

Tabelle 3-8: Validierung der Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin in Zehennägeln

		Cotinin	Nikotin	Myosmin
Nachweisgrenze (LOD)	[ng/g]	35	20	10
Wiederfindung	[%]	97 ± 4	98 ± 11	102 ± 4
Tagespräzision	Variationskoeffizient [%]	13,3	4,4	14,5
Wochenpräzision	Variationskoeffizient [%]	8,7	8,0	8,0
Linearität	Bestimmtheitsmaß [r ²]	0,97	0,99	0,98

3.4.3 Cotinin, Nikotin und Myosmin in Zehennägeln

Es wurden 36 Zehennagelproben auf Cotinin, Nikotin und Myosmin untersucht. 16 Proben stammten aus der Rechtsmedizin München (12 Nichtraucher und 4 Raucher). 20 Proben wurden von der Rechtsmedizin Stockholm erhalten (6 Nichtraucher, 7 Raucher und 7 Verwender von Snus). Fünf der sieben Snuser konsumierten laut Angaben der befragten Angehörigen aber auch Zigaretten.

Ein Vergleich der Zehennagelproben aus München und Stockholm mit dem Mann-Whitney-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Nikotinoidkonzentrationen. Für die weitere Auswertung wurde daher nicht nach Herkunft der Proben unterschieden (Abbildung 3-20).

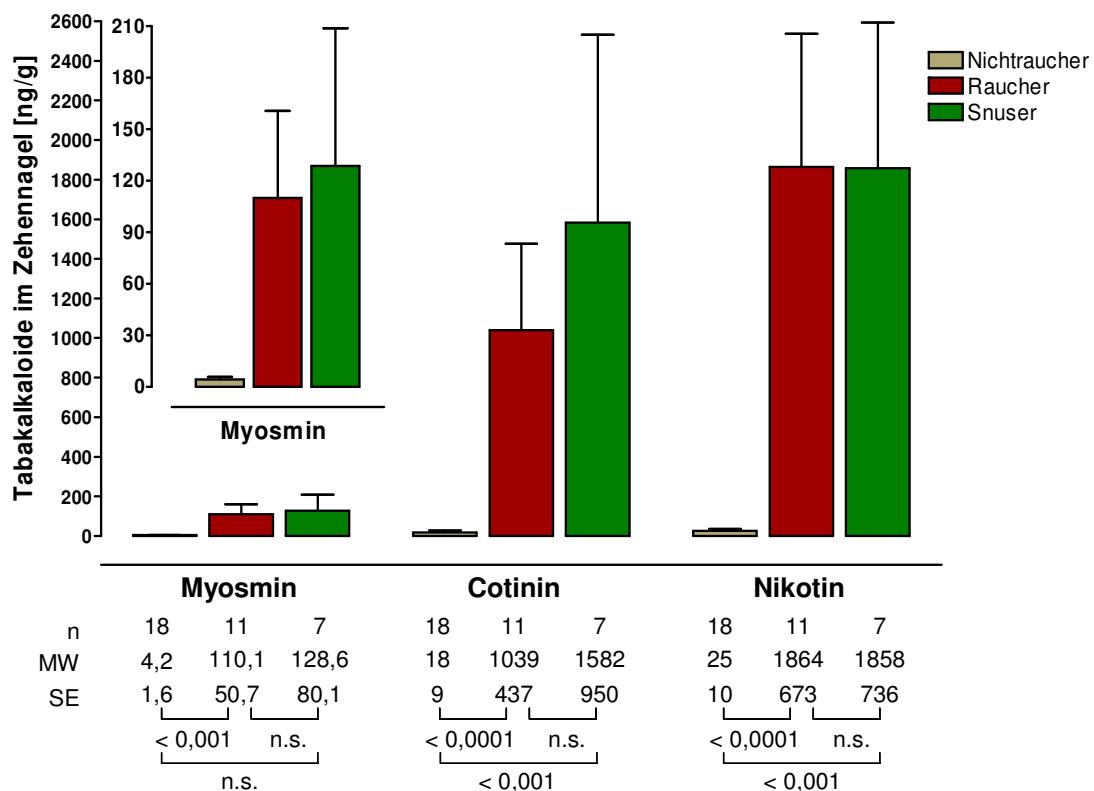
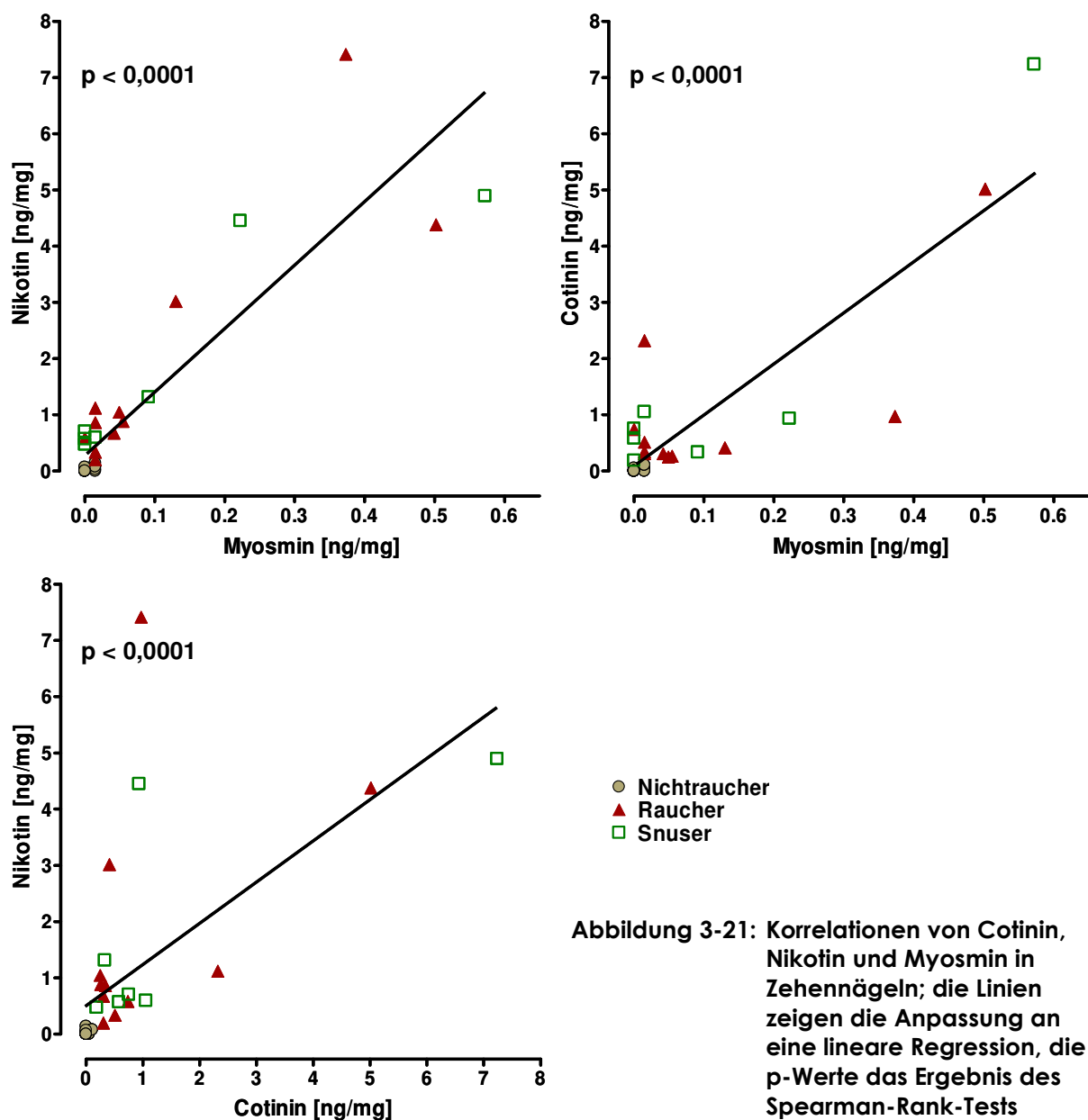


Abbildung 3-20: Myosmin, Cotinin und Nikotin in Zehennägeln von Nichtrauchern, Rauchern und Snusern; die Vergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet

Cotinin konnte in allen Zehennagelproben von Rauchern und Snusern nachgewiesen werden. Bei den Nichtrauchern waren nur in 4 von 18 Proben kleine Mengen von Cotinin im Bereich des LOQ zu finden, alle weiteren Werte der Nichtraucher lagen unter dem LOD von 35 ng/g. Die Cotininkonzentrationen waren in den Zehennägeln der Raucher durchschnittlich 58mal höher als bei Nichtrauchern (1039 ng/g vs. 18 ng/g; $p < 0,0001$). Snuser zeigten 88fach höhere Cotininmengen im Vergleich zu Nichtrauchern (1582 ng/g vs. 18 ng/g, $p < 0,001$). Die durchschnittlich etwa 1,5fach

höheren Cotininkonzentrationen der Snuser im Vergleich zu den Rauchern erreichten jedoch keine Signifikanz.

Nikotin wurde in allen Zehennagelproben von Rauchern und Snusern gefunden. In 7 Proben der 18 Nichtraucher konnten geringe Nikotinkonzentrationen nachgewiesen werden, die Werte der 11 restlichen Nichtraucher lagen unter dem LOD von 20 ng/g. Raucher hatten eine 75fach höhere Nikotinbelastung als Nichtraucher (1864 ng/g vs. 25 ng/g; $p < 0,0001$), Snuser zeigten 74fach höhere Nikotinkonzentrationen im Vergleich zu Nichtrauchern (1858 ng/g vs. 25 ng/g; $p < 0,001$). Die Nikotinkonzentrationen bei Rauchern und Snusern unterschieden sich nicht.



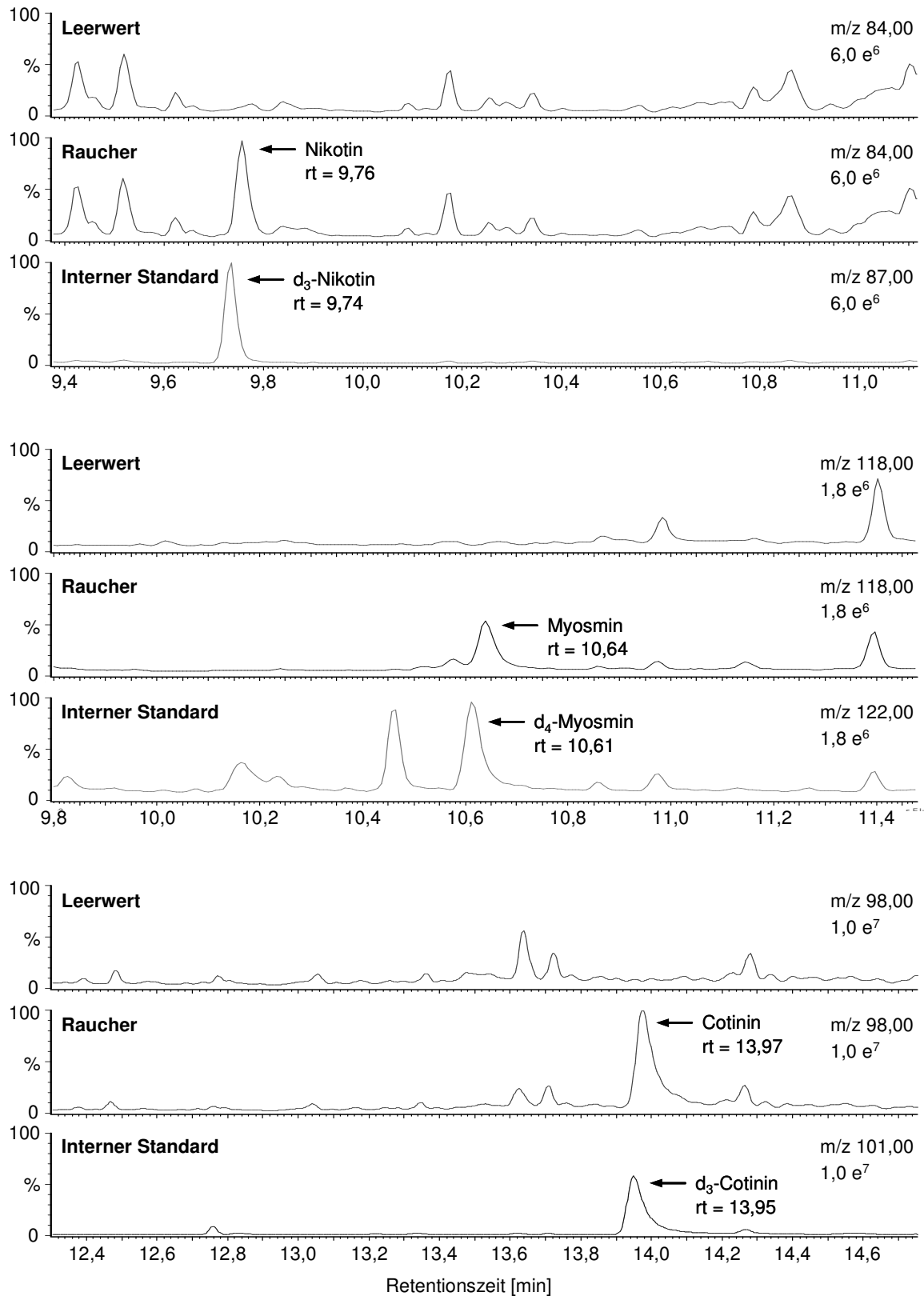


Abbildung 3-22: Chromatogramme von Nikotin, Myosmin und Cotinin in Zehennägeln eines Rauchers mit den zugehörigen internen deuterierten Standards und einem Leerwert

Myosmin wurde in deutlich geringeren Mengen als Cotinin und Nikotin gefunden, die Werte sind daher in Abbildung 3-20 vergrößert dargestellt. Das Alkaloid war in den Zehennägeln von 10 der 11 Raucher, 4 der 7 Snuser und nur 5 der 18 Nichtraucher nachweisbar. Alle anderen Werte lagen unterhalb des LOD von 10 ng/g. Die mittlere Konzentration von Myosmin war in den Zehennägeln der Raucher 26fach größer als bei den Nichtrauchern (110,1 ng/g vs. 4,2 ng/g; $p < 0,001$). In den Zehennägeln der Snuser (128,6 ng/g) wurden etwa 31fach höhere Myosminkonzentrationen gefunden als bei Nichtrauchern, der Vergleich erreicht jedoch keine Signifikanz. Der Unterschied zwischen Rauchern und Verwendern von Snus erreichte für Myosmin genauso wie für Cotinin und Nikotin kein Signifikanzniveau.

Die Konzentrationen von Cotinin, Nikotin und Myosmin in den Zehennägeln aller Proben zeigten hochsignifikante Korrelationen (Abbildung 3-21).

Die Abbildung 3-22 zeigt Chromatogramme der Zehennagelprobe eines Rauchers und eines Leerwertes. Die Massenspuren wurden im SIM-Modus aufgenommen.

3.4.4 Cotinin, Nikotin und Myosmin in Plasma

Die Quantifizierung von Cotinin in Plasma und Urin dient der Überprüfung des Rauchverhaltens. Zur Einteilung der frisch Verstorbenen in die Gruppen Raucher und Nichtraucher wurde für die Messungen aus Plasma ein Cut-off-Wert von 10 ng/ml Cotinin angewendet [188].

Für die Untersuchung der Nikotinoide aus Plasma standen insgesamt 70 Blutproben von 105 frisch Verstorbenen (67 %) aus der Rechtsmedizin München zur Verfügung. Durch die Cotininanalyse konnten 31 Raucher (44 %) und 39 Nichtraucher (56 %) bestimmt werden (Abbildung 3-23).

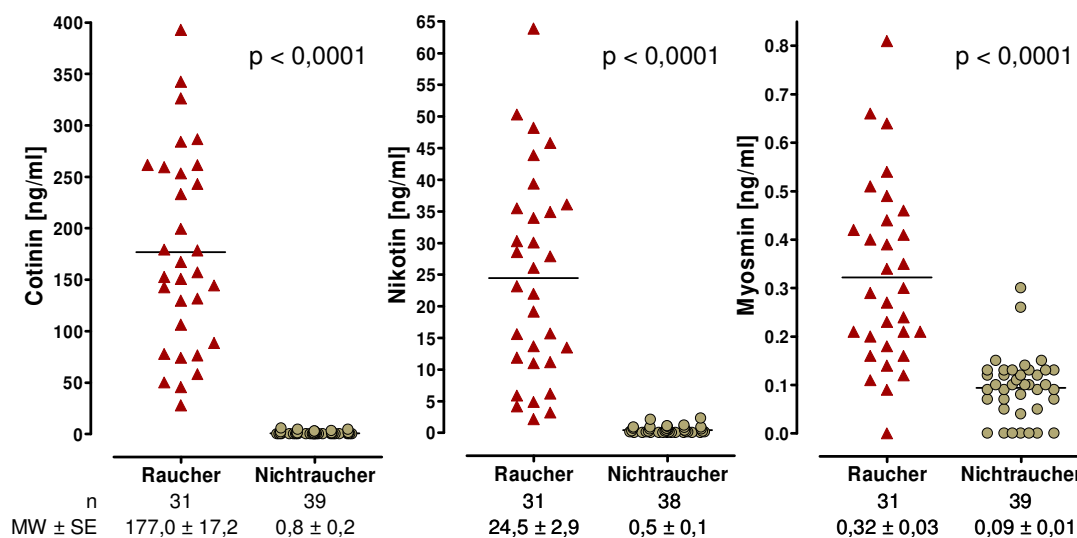


Abbildung 3-23: Vergleich von Cotinin, Nikotin und Myosmin in Plasma von Rauchern und Nichtrauchern; die p-Werte zeigen das Ergebnis des Mann-Whitney-Tests

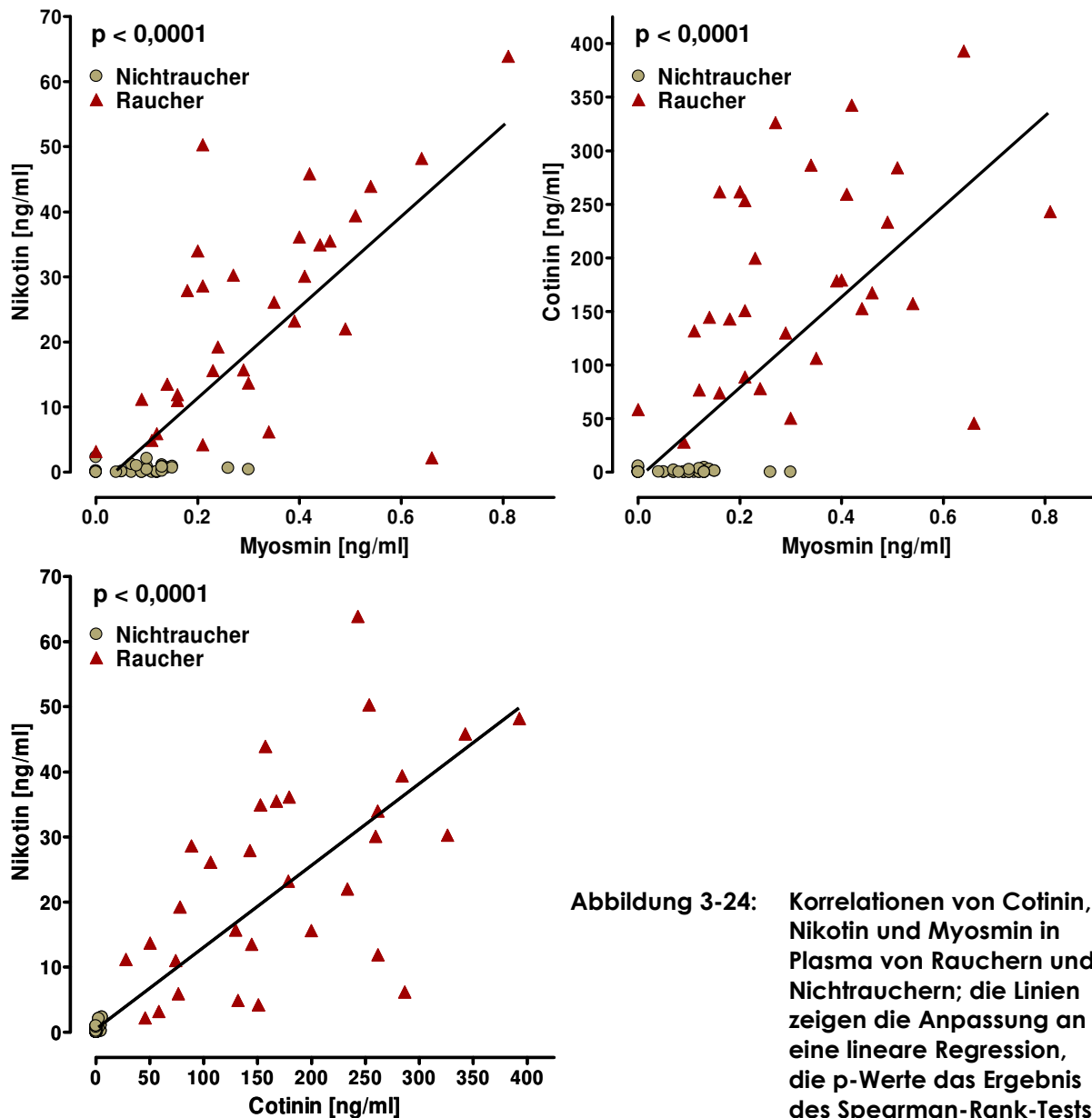
Cotinin konnte im Plasma aller Raucher und bei 19 von 39 Nichtrauchern nachgewiesen werden. Die Cotininkonzentration erreichte bei Rauchern durchschnittlich ein 221fach höheres Niveau als bei Nichtrauchern (177,0 vs. 0,8 ng/ml; $p < 0,0001$).

Das Tabakalkaloid Nikotin wurde bei allen Rauchern nachgewiesen. Wegen Überlagerung mit einem Störpeak war es bei einem Nichtraucher nicht auswertbar. Bei 28 der restlichen 38 Nichtraucher lag es jedoch über der Nachweisgrenze. Nikotin kam im Plasma der Raucher mit durchschnittlich 24,5 ng/ml in siebenfach geringerer Konzentration vor als Cotinin (177,0 ng/ml). Es zeigt sich dennoch ein 49facher Unterschied zwischen den Nikotinmengen im Plasma der Raucher und der Nichtraucher (24,5 vs. 0,5 ng/ml; $p < 0,0001$).

Myosmin wurde mit nur einer Ausnahme bei allen Rauchern und bei 32 von 39 Nichtrauchern im Plasma gefunden. Raucher wiesen im Vergleich zu Nichtrauchern

nur eine 3,6fach höhere Myosminkonzentration auf. Obwohl sich die Werte von Rauchern und Nichtrauchern deutlich überlappen, ergibt sich dennoch ein hochsignifikanter Unterschied (0,32 vs. 0,09 ng/ml; $p < 0,0001$).

Die Konzentrationen von Cotinin, Nikotin und Myosmin in Plasma von Rauchern und Nichtrauchern wiesen hochsignifikante Korrelationen auf (Abbildung 3-24).



Auch bei getrennter Betrachtung der Nikotinoidkonzentrationen von Rauchern und Nichtrauchern zeigen sich mit Ausnahme von Myosmin und Cotinin für Nichtraucher signifikante Korrelationen (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: Korrelationen zwischen den Nikotinoiden im Plasma unter Berücksichtigung des Rauchstatus, die p-Werte stellen das Ergebnis des Spearman-Rank-Tests und des Tests nach Pearson (*) dar.

	Raucher (*)			Nichtraucher		
	Nikotin	Cotinin	Myosmin	Nikotin	Cotinin	Myosmin
Nikotin	-	$p = 0,0006$	$p = 0,0003$	-	$p = 0,0008$	$p = 0,0065$
Cotinin	-	-	$p = 0,0264$	-	-	$p = 0,9815$

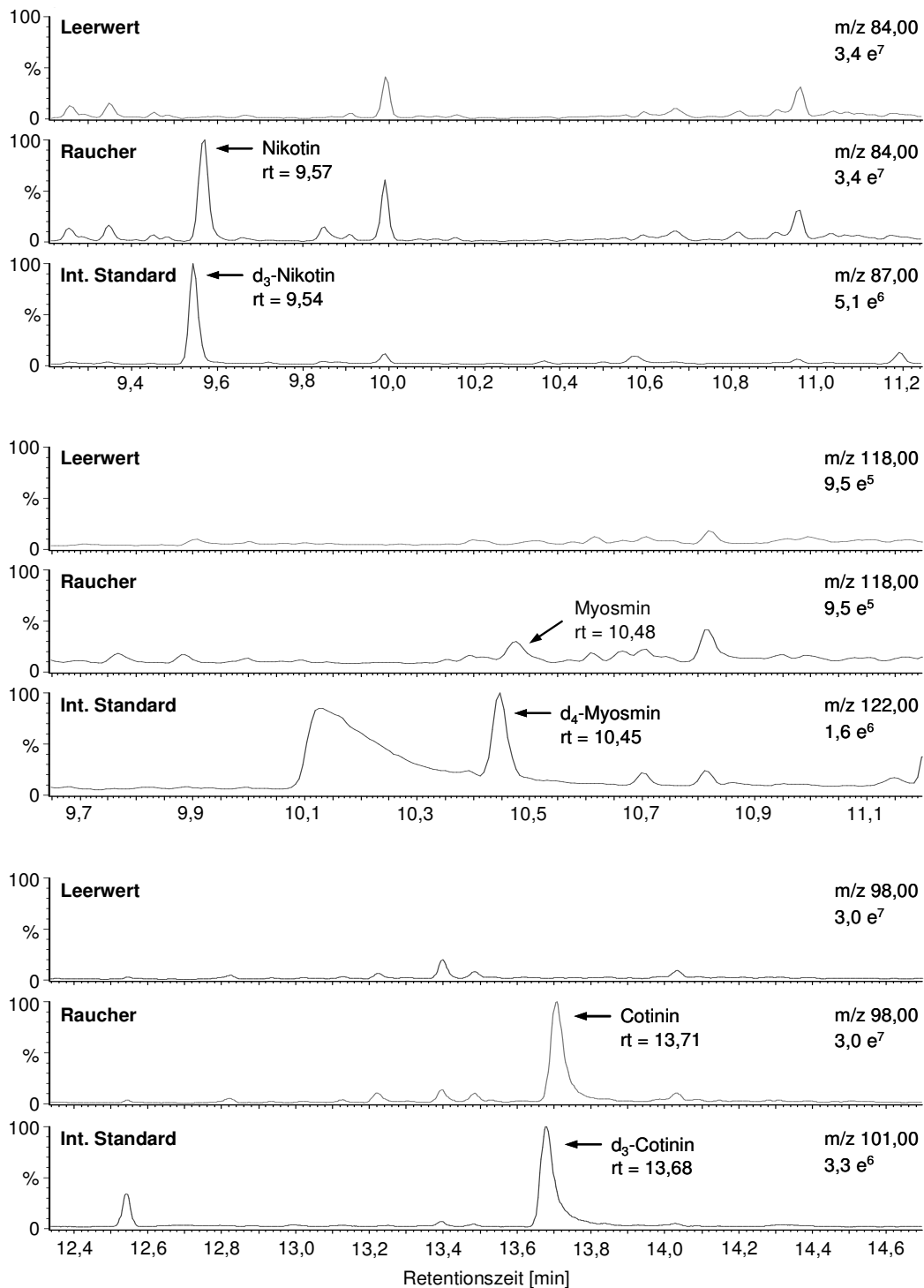


Abbildung 3-25: Chromatogramme von Nikotin, Myosmin und Cotinin aus dem Plasma eines Rauchers mit den zugehörigen internen Standards und einem Leerwert

Abbildung 3-25 zeigt beispielhaft die Chromatogramme aus Plasma eines Rauchers und eines Leerwertes. Die Massenspuren wurden im SIM-Modus aufgenommen.

Für die 31 Raucher und 39 Nichtraucher aus deren Plasma die Nikotinoide bestimmt wurden, standen 28 (90 %) bzw. 26 (67 %) Blutalkoholkonzentrationen (BAK) zur Verfügung. Die Raucher hatten einen durchschnittlichen BAK von $0,58 \pm 0,18 \text{ ‰}$, die Nichtraucher $0,21 \pm 0,12 \text{ ‰}$.

Zum Vergleich der Myosmin- und Blutalkoholkonzentrationen wurden die Verstorbenen in zwei Gruppen eingeteilt: Gruppe A hatte zum Zeitpunkt der Sektion keinen nachweisbaren Blutalkohol. Im Blut der Gruppe B konnte dagegen Ethanol quantifiziert werden ($\text{BAK} \geq 0,01 \text{ ‰}$). Abbildung 3-26 zeigt, dass Verstorbene mit nachweisbarem BAK doppelt so hohe Myosminkonzentrationen aufweisen als nüchterne Verstorbene ($0,32$ vs. $0,15 \text{ ng/ml}$; $p=0,0015$ im Mann-Whitney-Test). Bei alleiniger Betrachtung der Raucher schwächt sich dieser Unterschied ab ($p=0,0314$), für Nichtraucher ist er nicht mehr statistisch erfassbar ($p=0,2230$).

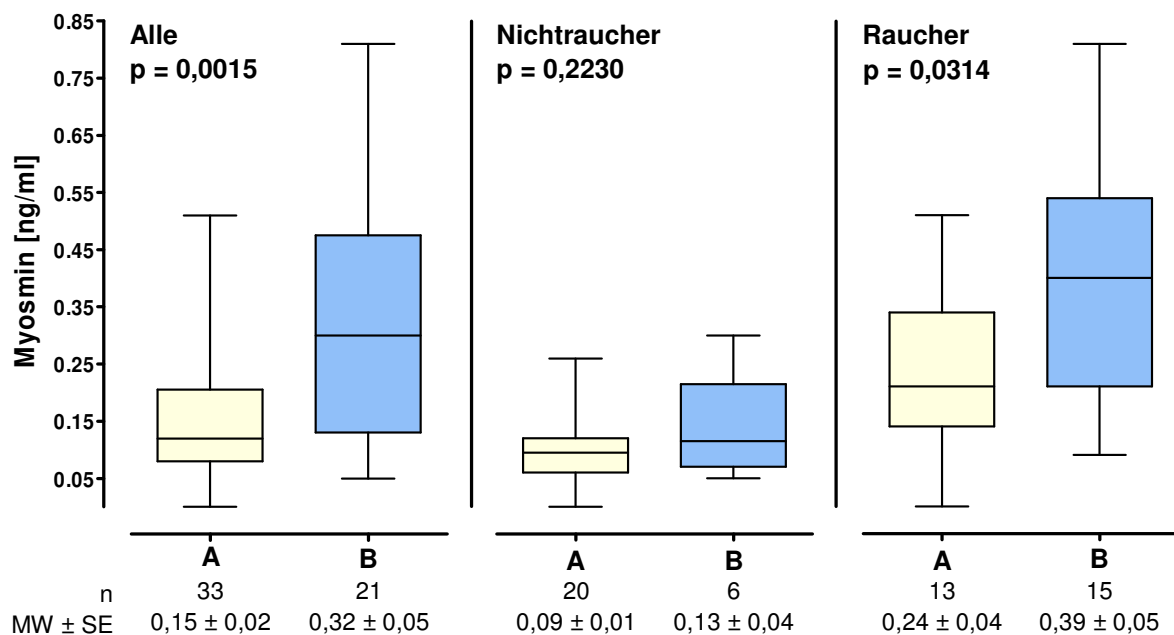


Abbildung 3-26: Vergleich der Myosminkonzentrationen von frisch Verstorbenen ohne (A) und mit (B) Blutalkohol

Zwischen den Myosmin- und Blutalkoholkonzentrationen besteht eine signifikante Korrelation ($p=0,0046$; Abbildung 3-27), die sich bei getrennter Betrachtung von Rauchern und Nichtrauchern jedoch verliert. Dies gilt auch, wenn die Korrelationsanalyse auf die Verstorbenen mit einem $\text{BAK} \geq 0,01 \text{ ‰}$ aus Gruppe B beschränkt wird.

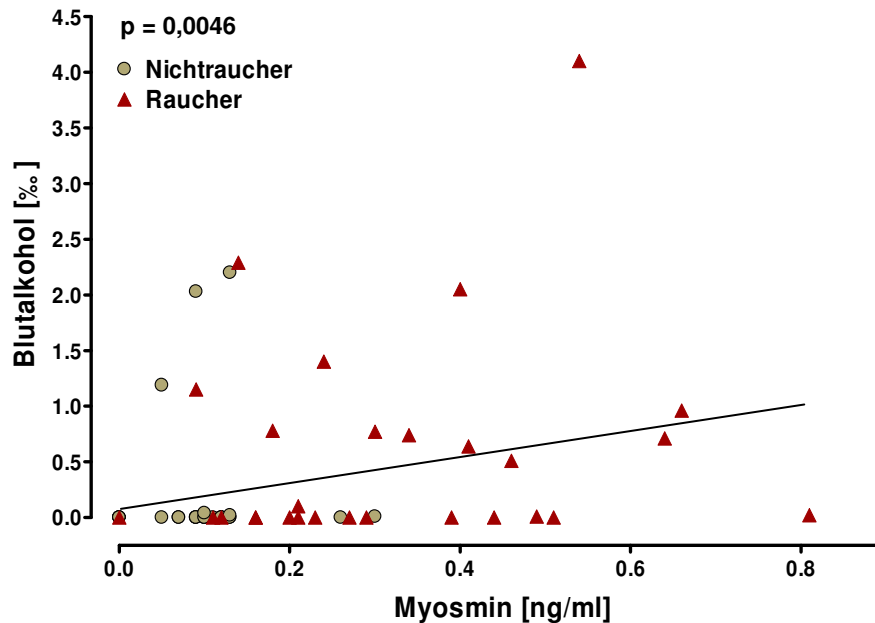


Abbildung 3-27: Korrelationen von Myosmin und Blutalkoholkonzentration von Rauchern und Nichtrauchern in Plasma; die Linien zeigen die Anpassung an eine lineare Regression, der p-Wert das Ergebnis des Spearman-Rank-Tests

3.4.5 Cotinin, Nikotin und Myosmin in Urin

Zur Untersuchung der Nikotinoide aus Urin konnten insgesamt 52 Urinproben von frisch Verstorbenen verwendet werden. 35 dieser Proben wurden in der Sektion der Rechtsmedizin München und 17 in der Rechtsmedizin Solna, Stockholm gesammelt. Durch die Bestimmung von Cotinin konnten die Verstorbenen in die Gruppen Raucher und Nichtraucher eingeteilt werden. Als Grenzwert diente ein Cut-off von 50 ng/ml [188]. Mit Hilfe der Aussagen von Angehörigen sowie der Bestätigung dieser Informationen durch die Cotinin-Analytik, wurden sieben Proben der Snuser-Gruppe zugeteilt. Fünf der sieben Snuser konsumierten neben Snus auch Zigaretten. Eine Übersicht zu Herkunft, Einteilung und den durchschnittlichen Nikotinoidkonzentrationen der Urinproben zeigt Tabelle 3-10.

Tabelle 3-10: Übersicht von Cotinin, Nikotin und Myosmin aus Urin von frisch Verstorbenen unter Berücksichtigung des Rauchstatus und der Herkunft (ng/ml; MW ± SE)

	Rechtsmedizin München		Rechtsmedizin Stockholm		
	Raucher (n = 23)	Nichtraucher (n = 12)	Raucher (n = 6)	Snuser (n = 7)	Nichtraucher (n = 4)
Cotinin	437,0 ± 44,8	5,7 ± 2,2	285,1 ± 84,7	432,8 ± 69,7	0,0 ± 0,0
Nikotin	54,6 ± 5,7	6,2 ± 3,4	78,9 ± 18,5	115,9 ± 29,9	0,0 ± 0,0
Myosmin	2,41 ± 0,44*	0,10 ± 0,02	2,15 ± 0,60	2,27 ± 0,69	0,10 ± 0,02

*Myosmin, n = 21: ein Ausreißer (Test nach Grubbs) wurde von der Auswertung ausgeschlossen, ein weiterer Wert stand aus analytischen Gründen nicht zur Verfügung.

Ein Vergleich der Urinproben aus München und Stockholm mit dem Mann-Whitney-Test zeigte bezüglich der gefundenen Konzentrationen der Nikotinoide keinen signifikanten Unterschied. Für die weitere Auswertung wurde daher nicht nach Herkunft der Proben unterschieden (Abbildung 3-28).

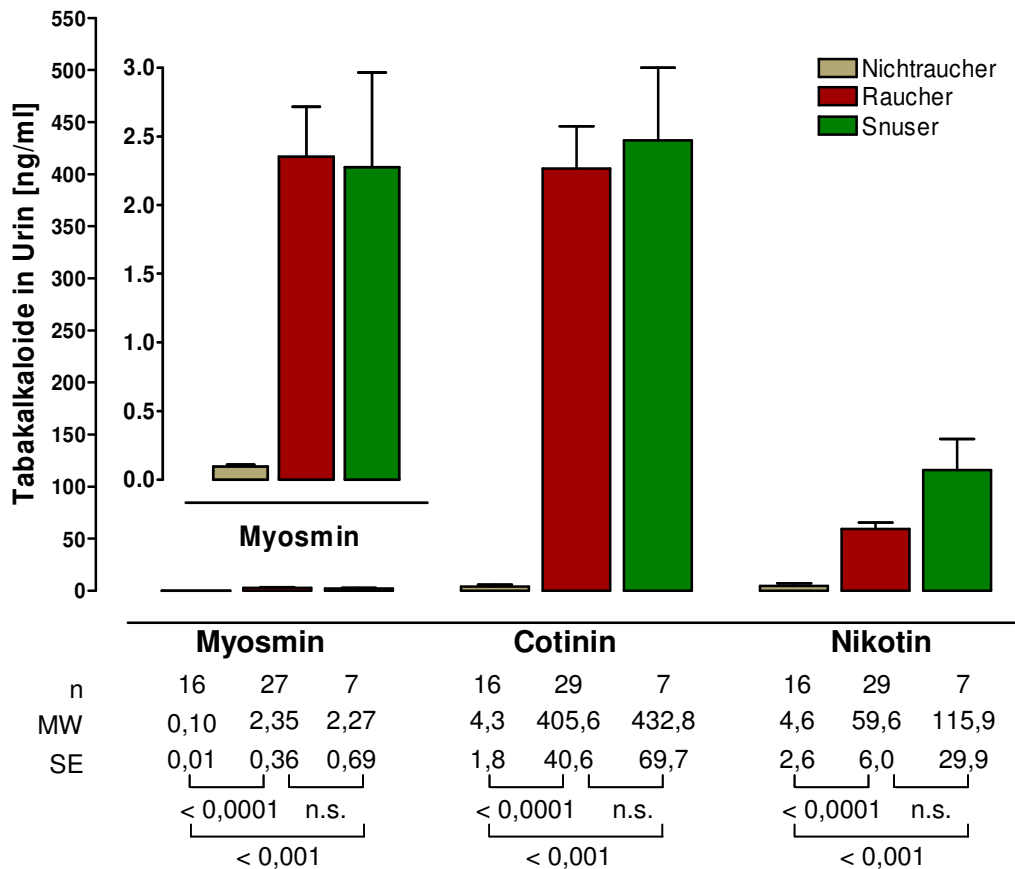


Abbildung 3-28: Vergleichende Darstellung von Myosmin, Cotinin und Nikotin in Urin von Nichtrauchern, Rauchern und Snusern; die Vergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet

Cotinin wurde in allen Urinproben der Raucher, Snuser sowie bei 9 von 16 Nichtrauchern gefunden. Die Cotininkonzentrationen der Raucher betragen durchschnittlich das 94fache der Nichtraucher (405,6 ng/ml vs. 4,3 ng/ml; $p < 0,0001$). Snuser zeigten etwa 100fach höhere Cotininmengen im Vergleich zu Nichtrauchern (432,8 ng/ml vs. 4,3 ng/ml, $p < 0,001$). Die sehr ähnlichen Cotininwerte der Raucher und der Snuser erreichten keine statistische Signifikanz.

Auch Nikotin wurde in allen Urinproben von Rauchern und Snusern gefunden, allerdings in deutlich geringeren Mengen. In 10 der 16 Nichtraucherproben konnte ebenfalls Nikotin nachgewiesen werden. Urin von Rauchern zeigte eine fast 13fach höhere Nikotinkonzentration als Urin von Nichtrauchern (59,6 ng/ml vs. 4,6 ng/ml; $p < 0,0001$). Die durchschnittliche Nikotinkonzentration der Snuser-Proben betrug sogar das

25fache im Vergleich zu Urinproben von Nichtrauchern (115,9 ng/ml vs. 4,6 ng/ml; $p < 0,001$). Obwohl Snuser mit 115,9 ng Nikotin pro ml Urin fast doppelt so hohe Konzentrationen im Urin aufwiesen als Raucher, erreichte der Unterschied kein Signifikanzniveau.

Myosmin wurde im Vergleich zu Cotinin und Nikotin in Urin in deutlich geringeren Mengen gefunden, die Werte sind deshalb in der Abbildung 3-28 als Insert vergrößert dargestellt. In allen Urinproben, mit Ausnahme eines Nichtrauchers, konnte Myosmin nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Konzentration von Myosmin in Urin von Rauchern war etwa 24fach größer, als die der Nichtraucher (2,35 ng/ml vs. 0,10 ng/ml; $p < 0,0001$). Im Urin der Snuser wurden etwa 23fach höhere Myosminwerte gefunden, als bei Nichtrauchern (2,27 ng/ml vs. 0,10 ng/ml; $p < 0,001$). Die mittleren Myosminkonzentrationen von Rauchern und Verwendern von Snus unterschieden sich nicht.

Abbildung 3-29 zeigt beispielhaft die GC-MS-Chromatogramme von Myosmin einer Raucher-Urinprobe mit internem Standard und Leerwert. Die Chromatogramme zu Cotinin und Nikotin aus Urin gleichen den entsprechenden Chromatogrammen der Plasmaproben.

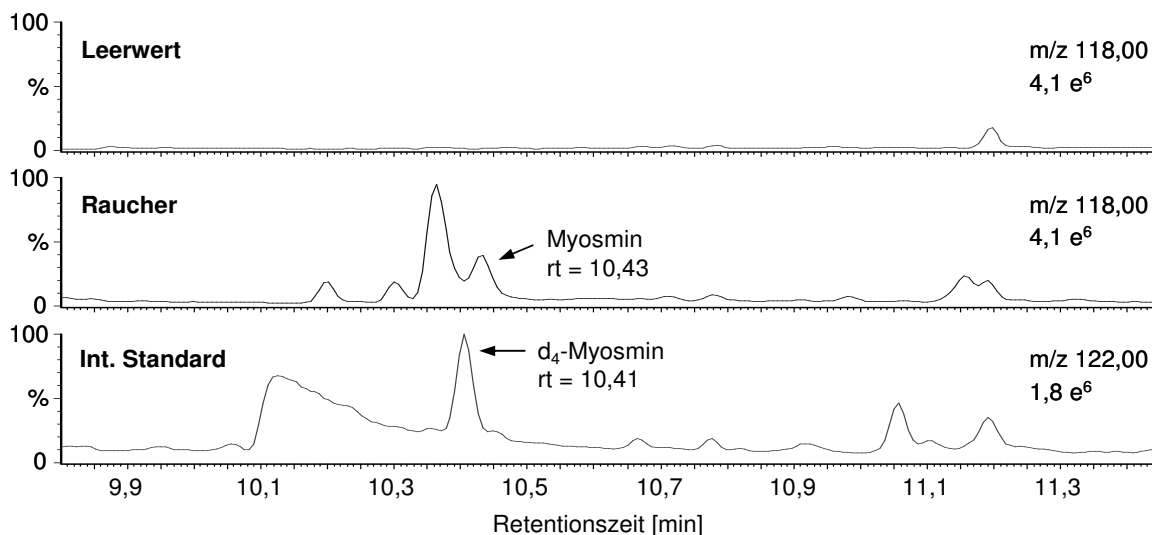


Abbildung 3-29: Chromatogramme von Myosmin aus Urin eines Rauchers mit zugehörigem internen deuterierten Standard und einem Leerwert

Die Konzentrationen von Cotinin, Nikotin und Myosmin in Urin aller Proben wiesen hochsignifikante Korrelationen auf (Abbildung 3-30).

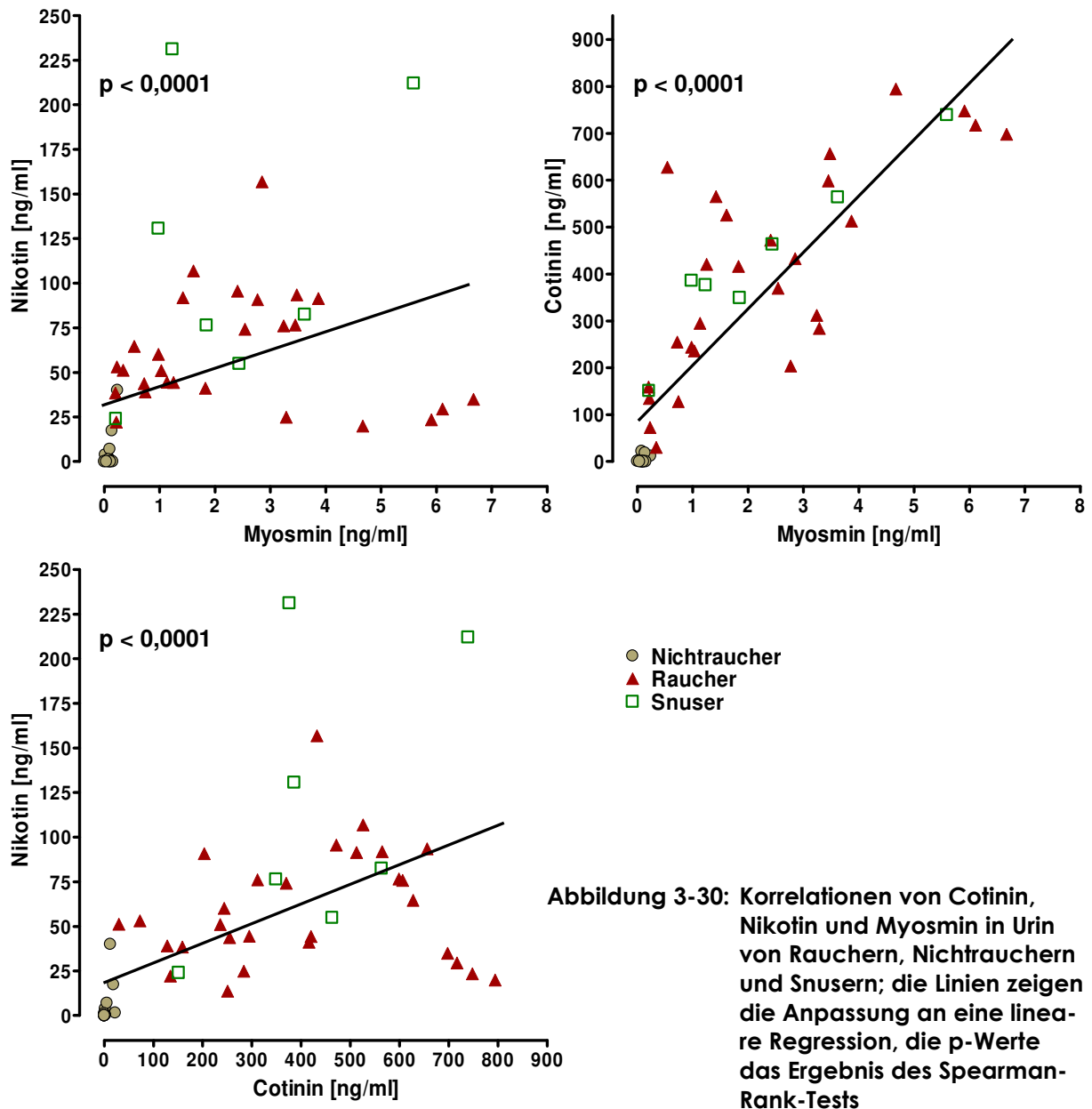


Abbildung 3-30: Korrelationen von Cotinin, Nikotin und Myosmin in Urin von Rauchern, Nichtrauchern und Snusern; die Linien zeigen die Anpassung an eine lineare Regression, die p-Werte das Ergebnis des Spearman-Rank-Tests

3.4.6 Vergleich der Nikotinoidkonzentrationen in Plasma und Urin

Zur Überprüfung der Rauchstatusbestimmung aus Plasma und Urin wurden für elf Proben aus der Rechtsmedizin München beide Arten von Körperflüssigkeiten gesammelt und analysiert. Die Nikotinoidkonzentrationen aus beiden Biomatrizes zeigten gute Korrelationen. Es konnte eine klare Trennung der Verstorbenen in sechs Raucher und fünf Nichtraucher vorgenommen werden.

Abbildung 3-31 zeigt eine Gesamtübersicht der Plasma- und Urinkonzentrationen von Cotinin und Nikotin für Raucher und von Myosmin für Nichtraucher und Raucher. Die Urinproben stammten aus den Instituten für Rechtsmedizin München und Stockholm, die Plasmaproben wurden ausschließlich in München gesammelt.

Es zeigt sich, dass im Urin allgemein höhere Nikotinoidkonzentrationen zu finden sind. Für Raucher waren die Unterschiede in den Konzentrationen aller drei Nikotinoide hochsignifikant. Die mittleren Konzentrationen von Cotinin und Nikotin waren im Urin 2,3fach (405,6 vs. 177,0 ng/ml) bzw. 2,4fach (59,6 vs. 24,5 ng/ml) höher als im Plasma. Myosmin lag im Urin von Rauchern sogar in 7fach höherer Konzentration vor als im Plasma (2,35 vs. 0,32 ng/ml). Bei Nichtrauchern zeigte sich dagegen kein Unterschied bezüglich der Myosminkonzentrationen in Urin und Plasma (0,10 vs. 0,09 ng/ml). Die im Vergleich zu Rauchern deutlicheren, 5- und 9fachen Unterschiede der mittleren Konzentrationen von Cotinin (4,3 vs. 0,8 ng/ml) und Nikotin (4,6 vs. 0,5 ng/ml) in den verschiedenen Körperflüssigkeiten der Nichtraucher erreichten keine Signifikanz.

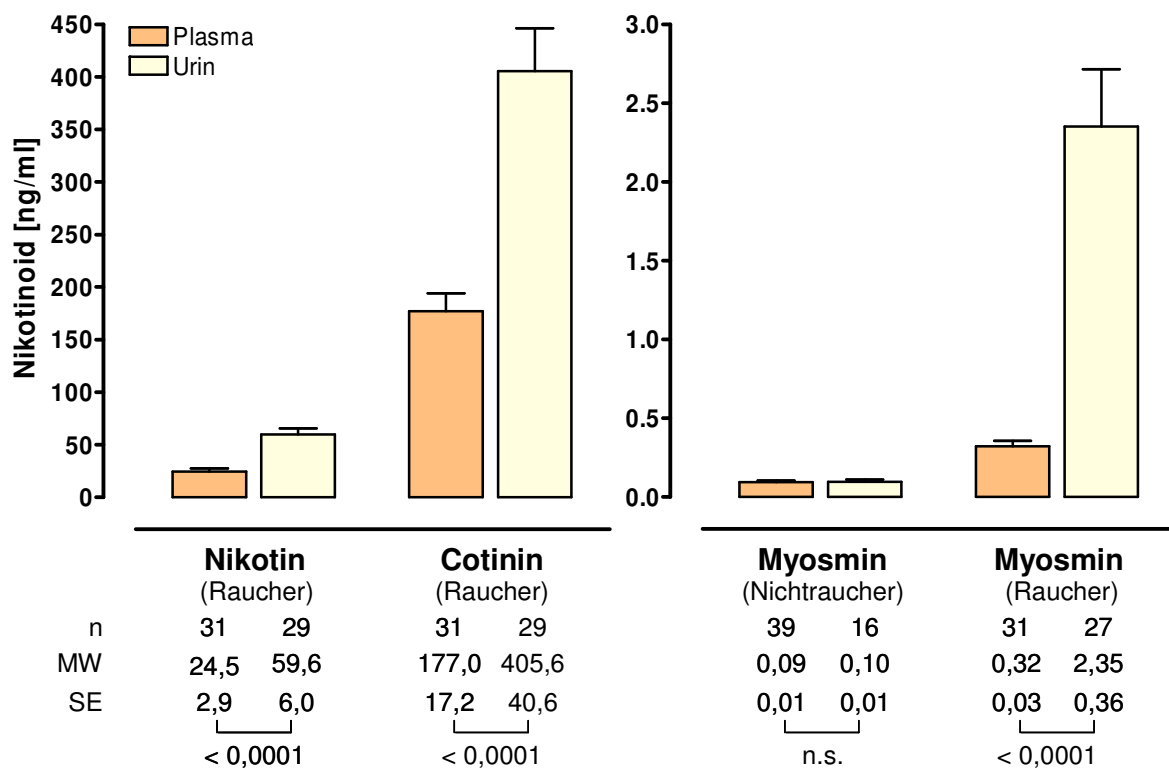


Abbildung 3-31: Nikotin, Cotinin und Myosmin in Urin und Plasma; die Vergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet

4 Diskussion

4.1 Beurteilung der analytischen Methoden zur Bestimmung von HPB- und Diol-freisetzenden DNA-Addukten

Der angewandten Methode zur Analytik von HPB-freisetzenden DNA-Addukten liegt die in unserem Arbeitskreis [201,212] verbesserte Methode von Foiles et al. [217] zu Grunde. Das Prinzip der Bestimmung der DNA-Addukte basiert auf der Isolierung der DNA durch Festphasenextraktion, einer sauren Hydrolyse der DNA, der Isolierung und Aufreinigung von HPB durch Flüssig-Flüssig-Extraktion und der anschließenden GC-MS-Analyse als PFBC-Ester.

Der Vorteil dieser analytischen Methode ist ihre hohe Nachweisempfindlichkeit, die es überhaupt erst ermöglicht hat, die HPB-freisetzenden Addukte in humanen Geweben nachzuweisen [212,217-219]. Die Aussagekraft der damit erzielten Ergebnisse ist aber begrenzt. Ein Nachteil ist, dass das Ausmaß der hydrolytischen Freisetzung von HPB nicht überprüft werden kann. Wie groß der Anteil des freigesetzten HPB am insgesamt an der DNA gebundenen HPB ist, kann nur grob abgeschätzt werden. In Versuchen mit [5-³H]-NNK-behandelten Ratten wurden aus der DNA von Leber- und Lungengewebe etwa 50 % der Radioaktivität mit saurer Hydrolyse freigesetzt [92,220]. Wie viel Prozent der Radioaktivität allerdings als HPB- und nicht als Diol-Addukt vorlag, wurde nicht bestimmt und auch die Hydrolysebedingungen waren milder. Aus synthetisch hergestellten Nukleotid-Addukten konnte das HPB allerdings durch saure Hydrolyse vollständig freigesetzt werden [221,222].

Auch die Struktur der Addukte kann nicht bestimmt werden. Für eine Risikoabschätzung wäre diese Information jedoch von großer Relevanz, denn Addukte an verschiedenen Positionen einer Base haben ein sehr unterschiedliches kanzerogenes Potenzial [223]. LC-MS-Methoden, welche die Bestimmung der vollständigen Nukleotidaddukte von HPB in Geweben von NNK- und NNN-behandelten Ratten ermöglichten [206-209], sind allerdings für die sehr geringen Addukt mengen in Humangeweben nicht ausreichend empfindlich. Welche Bedeutung die Bestimmung der Struktur der HPB-Addukte haben kann, zeigt das Ergebnis von NNK-behandelten Ratten. Nach Gabe von 10 ppm über das Trinkwasser hatte in der Lunge das Addukt mit den höchsten mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften, das O⁶-[4-(3-Pyridyl)-4-oxobut-1-yl]-2'-deoxyguanosin (O⁶-POB-dGuo) mit maximal 2,1 % den geringsten Anteil an den 4 gemessenen Addukten [207]. Bei dieser Rechnung fehlen noch die in dieser Untersuchung nicht berücksichtigten Addukte am Phosphatrest (Abbildung 4-1).

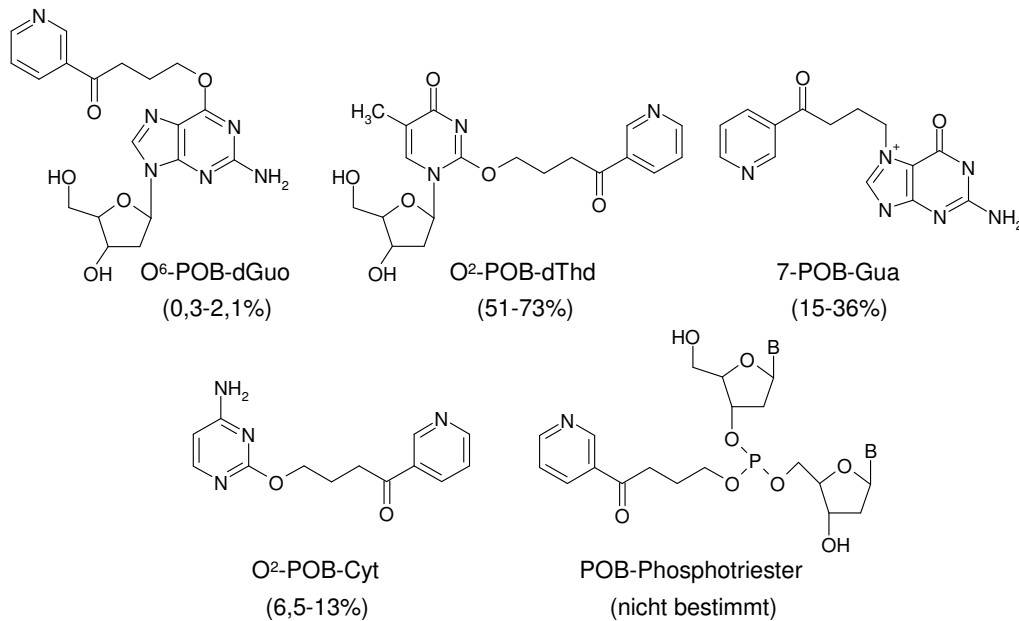


Abbildung 4-1: POB-DNA-Addukte in den Lungen von Ratten nach Gabe von 10 ppm NNK im Trinkwasser über 1-20 Wochen (modifiziert nach Lao et al. [207] und Haglund et al. [222])

Eine weitere Möglichkeit zur Addukt-Messung stellt die hochsensitive Methode des ³²P-Postlabelings dar. Hier wird die DNA enzymatisch zu Desoxyribonukleotid-3'-monophosphaten abgebaut. Anschließend werden die Nukleotide mittels T4-Polynukleotidkinase und radioaktivem [γ -³²P]-ATP markiert. Es entstehen natürliche und adduktivierte Desoxyribonukleosid-3'-[5'-³²P]-bisphosphate, die per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Dünnschichtchromatographie (DC) voneinander getrennt und mit Radioaktivitätsmessung quantifiziert werden. Eine strukturelle Charakterisierung der DNA-Addukte ist mit dieser Methode ebenso wie eine reproduzierbare quantitative Bestimmung allerdings nur bedingt möglich [224]. Die sogenannten "bulky adducts", die sich durch Extraktionsverfahren und enzymatische Methoden von den freien Nukleotiden abtrennen lassen, wurden lange Zeit mit Addukten krebserzeugender polyaromatischer Kohlenwasserstoffe in Zusammenhang gebracht. Aktuellere Untersuchungen mit verbesserter chromatographischer Trennung haben diese Zuordnung allerdings in Frage gestellt [225]. Versuche zur Bestimmung von HPB-Addukten mit ³²P-Postlabeling waren bisher nicht erfolgreich [226].

Die verwendete GC-MS-Analytik erwies sich als geeignete Methode Gewebe auf das Vorhandensein und möglicherweise auch die Menge von HPB-freisetzenden DNA-Addukten zu untersuchen. Zwar konnte die von Heppel et al. [212] beschriebene Nachweisgrenze von 92 fmol/mg DNA mit der hier durchgeführten Validierung nicht erreicht werden, die Blindwertproblematik, welche mit durchschnittlich 3 fmol

(entspricht ca. 0,5 pg) HPB pro Messung angegeben wurde [211], konnte jedoch vollständig behoben werden. Damit stellt die angewandte Analytik die bisher empfindlichste Methode dar, mit der humanes Pankreasgewebe auf POB-freisetzungsfähige DNA-Addukte untersucht wurde.

Eine simultane Untersuchung auf HPB- und Diol-freisetzungsfähige DNA-Addukte mit einfacher Derivatisierung beider Analyten erwies sich aufgrund der freien Alkoholgruppe des Diols in Position C1 als nicht möglich. Durch eine zusätzliche Derivatisierung dieser freien Alkoholgruppe nach Vorlage von Kao et al. [213] konnte speziell für das Diol eine sehr sensitive Analysemethode entwickelt werden. Zur Gewinnung des polaren Diols aus wässriger Lösung erwies sich eine Flüssig-Flüssig-Extraktion als wenig geeignet. Bessere Ergebnisse lieferten Versuche zur Diol-Extraktion mit speziellen Umkehrphasen-SPE-Säulchen. Um eine reproduzierbare, genügend große Wiederfindung zu erreichen und so die Untersuchung von Gewebe auf PHB-freisetzungsfähige DNA-Addukte zu ermöglichen, müssten hierzu noch weitere Versuche unternommen werden.

4.2 Untersuchung des humanen Pankreasgewebes auf HPB-freisetzungsfähige DNA-Addukte

Die Zusammenarbeit mit der Rechtsmedizin München und Stockholm erwies sich als eine gute Möglichkeit Pankreasgewebe zu erhalten, das nicht wegen spezieller Erkrankungen wie Pankreaskrebs oder Pankreatitis operativ entfernt wurde. Als ein Nachteil stellte sich allerdings die schnelle Autolyse des Pankreasgewebes heraus. Je größer der Zeitraum zwischen Tod und Sektion war, desto unwahrscheinlicher wurde eine erfolgreiche DNA-Isolierung. Dennoch konnten aus 69 % der erhaltenen Gewebe DNA-Lösungen gewonnen werden, die den üblichen Reinheitsanforderungen entsprachen. So wurden insgesamt 86 Proben von Pankreaskopfgewebe auf HPB-freisetzungsfähige DNA-Addukte untersucht. Nur in Pankreasgewebe von zwei Rauchern konnten in einer ersten Analyse geringe HPB-Mengen von 23 und 58 fmol/mg DNA gefunden werden. Bei einer zweiten Untersuchung dieser Pankreasproben konnte kein HPB mehr nachgewiesen werden. Auffallend war, dass die zwei Proben von Verstorbenen stammten, deren Leberfunktion durch Alkoholismus oder Hepatitis vermutlich stark eingeschränkt war. Ein verminderter Metabolismus von NNK in der Leber könnte eine größere Verfügbarkeit des Kanzerogens in extrahepatischen Geweben wie der Bauchspeicheldrüse zur Folge haben und so mit höherer Wahrscheinlichkeit zu POB-DNA-Addukten führen. Diese mögliche Theorie bleibt allerdings ohne weitere

positive und auch reproduzierbare Nachweise von HPB in Pankreasgewebe von Personen mit verminderter Leistung der Leberfunktion rein spekulativ.

Prokopczyk et al. [227] konnte mit einer ähnlichen GC-MS-Methode ebenfalls keinen sicheren Nachweis für HPB-freisetzende DNA-Addukte in der menschlichen Bauchspeicheldrüse erbringen. Untersucht wurde histologisch normales Pankreasgewebe von Patienten, die sich aufgrund von Pankreaskrebs, Darmkrebs oder chronischer Pankreatitis einer Operation unterzogen. Nur bei sechs von 58 Gewebeproben erreichte das chromatographische Signal von HPB zweifach höhere Flächen als beim Blindwert.

Die tabakspezifischen Nitrosamine NNK, NNAL und NNN konnten bereits in humanem Pankreassaft nachgewiesen werden [228]. Ob aber zytosolische und mikrosomale Enzyme der menschlichen Bauchspeicheldrüse zur α -Hydroxylierung und somit zur Aktivierung der TSNA überhaupt fähig sind, konnte bisher noch nicht bewiesen werden. Anderson et al. [229] schlussfolgerten sogar, dass der Bauchspeicheldrüse jegliche Enzyme zur Aktivierung von NNK und NNAL fehlen. Eine Aktivierung in der Leber und eine anschließende Reaktion mit Pankreas-DNA ist jedoch nicht auszuschließen. Laut einer neueren Untersuchung von Trushin et al. [79] ist die Menge an Reaktionsprodukten aus der α -Hydroxylierung in der Bauchspeicheldrüse lediglich zu gering, um sie mit derzeitigen Methoden nachweisen zu können. Falls eine Aktivierung von TSNA in der Bauchspeicheldrüse stattfindet, dann folglich nur in einem sehr geringen Ausmaß. Dies würde erklären, warum bisher keine HPB-freisetzenden Addukte in humanen Bauchspeicheldrüsen detektierbar waren. Es ist auch möglich, dass diese Addukte im Pankreas zusätzlich sehr effektiv durch DNA-Reparaturmechanismen repariert werden und sich so der momentan möglichen Analytik entziehen.

NNK und NNAL, der Hauptmetabolit von NNK sind die bisher einzigen in der Umwelt vorkommenden Kanzerogene, die im Tierversuch zu Bauchspeicheldrüsentumoren geführt haben [113,114,230]. Versuche mit Pankreasmikrosomen von Ratten konnten allerdings auch für diese Spezies keine katalytische Fähigkeit zur α -Hydroxylierung von NNK und NNAL zeigen [231]. Trotzdem konnten POB- und PHB-DNA-Addukte in Pankreasgewebe von Ratten nach Gabe von TSNA eindeutig nachgewiesen werden [209]. Den Nagern wurden hohe Dosen (S)-NNAL, (R)-NNAL oder NNK über das Trinkwasser verabreicht. Die Bestimmung verschiedener Nukleotidaddukte (Abbildung 4-2) erfolgte mit einer sensitiven LC-ESI-MS/MS-Methode. Während die POB-DNA-Addukte hauptsächlich durch Behandlung mit NNK und (S)-NNAL hervorgerufen

wurden, resultierten die PHB-DNA-Addukte aus der Gabe von (R)-NNAL. Die gesamten POB-DNA-Addukte erreichten mit ca. 160 fmol/mg DNA geringere maximale Werte, als die PHB-DNA-Addukte mit etwa 550 fmol/mg DNA. Verglichen mit anderen untersuchten Organen dieser Tiere (Leber, Lunge, Nasen- und Mundschleimhaut) wies die Bauchspeicheldrüse insgesamt jedoch die geringsten Mengen an Nukleotidaddukten auf. Ob diese Addukte entgegen der *in vitro* Befunde *in vivo* doch durch metabolische Aktivierung im Pankreas selbst gebildet werden oder durch stabilisierte reaktive Zwischenstufen hervorgerufen werden [232,233], die das Pankreas über die Blutbahn erreichen, bedarf weiterer Untersuchungen. Auch bleibt es zweifelhaft, ob sich die Ergebnisse dieser interessanten Untersuchung zur DNA-Adduktbildung durch tabakspezifische Nitrosamine bei Ratten, angesichts der bekannten Speziesunterschiede und der Dosisabhängigkeit des TSNA-Stoffwechsels [76] auf den mit sehr viel geringeren TSNA-Mengen belasteten Menschen übertragen lassen.

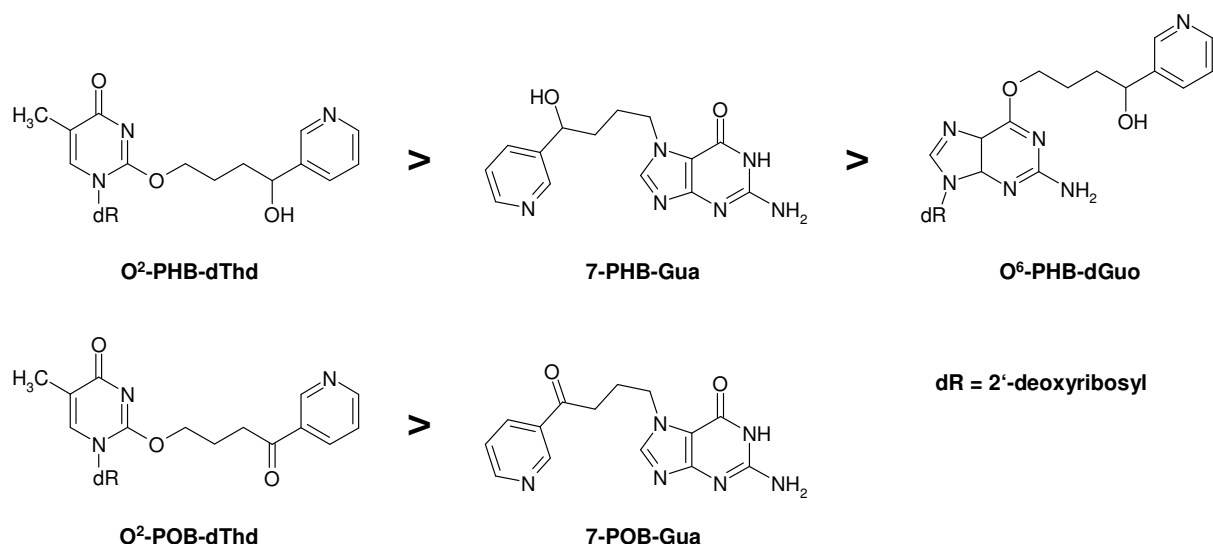


Abbildung 4-2: Strukturformeln und relative Mengen von POB- und PHB-DNA-Addukten, quantifiziert in Pankreasgewebe von Ratten [209]

Es ist grundsätzlich fraglich, ob NNK tatsächlich eine der Ursachen für Pankreaskrebs bei Rauchern sein kann. In epidemiologischen Studien erwies sich das Rauchen als gesicherter Risikofaktor für diese Krebsart. Der Gebrauch von rauchfreien Tabakprodukten zeigte dagegen in vielen Studien keine Erhöhung des Risikos für Pankreaskrebs [36,38]. Beide Arten des Tabakkonsums liefern jedoch vergleichbare NNK-Mengen (Tabelle 1-4, Kapitel 1.2.1). Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Art der Metabolisierung durch die inhalative Aufnahme von NNK grundlegend von der nach oraler Aufnahme unterscheidet. Die Tumorexperimente an Ratten zeigen allerdings Pan-

kreastumoren nur nach oraler Verabreichung von NNK und nicht nach subkutaner Gabe [113,114], bei der das NNK zunächst über den venösen Kreislauf die Lunge erreicht, bevor es im Körper verteilt wird (siehe Kapitel 1.2.3). Dies konnte bei den Ratten mit dem First Pass Metabolismus von NNK erklärt werden (siehe Kapitel 1.2.2). Angesichts der Speziesunterschiede im Stoffwechsel [76,99] und der Organotropie der Kanzerogenese von NNK [74], bleibt die Extrapolation von Ergebnissen der Tierversuche auf den Menschen jedoch spekulativ. Es ist sicherlich nicht auszuschließen, dass nur im Tabakrauch aufgrund der Pyrolyse vorkommende andere Kanzerogene maßgeblich für die Entstehung von Pankreaskrebs verantwortlich sind.

Bereits 1992 fanden Routledge et al. [234] mit ^{32}P -Postlabeling "bulky adducts" in Pankreasgewebe, deren genauere Strukturanalyse durch die angewandte Methode nicht möglich war. Ein bevorzugtes Auftreten dieser Addukte bei Rauchern wurde damals nicht festgestellt. Anderson et al. [229] konnten schon 1997 mit ^{32}P -Postlabeling in Pankreasgewebe das Hauptaddukt von 4-Aminobiphenyl (ABP), N-(Deoxyguanosin-8-yl)-ABP, ausmachen. Dies wurde später von Ricicki et al. [235] durch Massenspektrometrie bestätigt. Die gefundenen Addukt mengen lagen zwischen 1 und 60 Addukten pro 10^8 Nukleosiden und zeigten ebenfalls keinen Zusammenhang mit dem Rauchstatus. Erst Wang et al. [236] fanden mit ^{32}P -Postlabeling eine Korrelation von DNA-Addukten, die durch aromatische Verbindungen und Lipidperoxidation entstehen, mit dem Zigarettenrauchen. Es wurden Pankreastumorgewebe, histologisch normales Gewebe der Krebspatienten sowie Pankreasgewebe von gesunden Patienten untersucht. Die Adduktlevel der Gruppen wiesen signifikante Unterschiede auf. Die höchsten Addukt mengen wurden bei histologisch normalem, dem Tumor umliegenden Gewebe mit 102 Addukten pro 10^8 Nukleotiden gefunden. Tumorgewebe zeigte Werte von durchschnittlich 39 Addukten pro 10^8 Nukleotiden und Pankreasgewebe gesunder Patienten enthielt rund 13 Addukte pro 10^8 Nukleotiden. Auch eine neuere Untersuchung von "bulky adducts" durch ^{32}P -Postlabeling zeigte mit 231 gegenüber 94 Addukten pro 10^9 Nukleotiden signifikant höhere Level für Raucher als für Nichtraucher [237]. Es konnte aber ausgeschlossen werden, dass die DNA-Addukte aus den in Tabakrauch vorkommenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen Benzo[a]pyren, Dibenzo[a,h]anthracen oder Benz[a]anthracen resultieren. Möglicherweise bewirken andere krebserregende Stoffe aus dem Tabakrauch wie beispielsweise Butadien die DNA-Schädigung. Eine Strukturaufklärung der bei Rauchern und Pankreaskrebspatienten gefundenen DNA-Addukte der Bauchspeicheldrüse könnte die Erforschung der Krebsursachen wesentlich vorantreiben.

In unserem Arbeitskreis konnten HPB-freisetzende DNA-Addukte in unterschiedlichen, menschlichen Geweben nachgewiesen werden (Abbildung 4-3). Geringe HPB-Mengen, die keinen Bezug zum Rauchverhalten zeigten, wurden in DNA aus Ösophagus, Cardia und peripherem Lungengewebe von frisch Verstorbenen gefunden [219]. In Biopsien von Ösophagusschleimhaut, die im Rahmen gastroösophagealer Endoskopien erhalten wurden, konnten zwar allgemein hohe Addukt Mengen gefunden werden, Raucher wiesen jedoch auch hier keine höheren Werte auf als Nichtraucher [211]. Peripheres Gewebe von Lungenkrebspatienten zeigte dagegen für Raucher fast 7fach erhöhte HPB-Adduktlevel gegenüber Nichtrauchern [218]. Die höchsten HPB-Mengen wurden in der Mundschleimhaut von schwedischen Snusern ($17,6 \pm 7,10$ pmol/mg DNA; MW \pm SD) gefunden [238]. Laut epidemiologischen Studien haben Verwender von Snus jedoch kein oder nur ein äußerst geringfügig erhöhtes Mundhöhlenkrebsrisiko [44,45]. Für Raucher fanden sich gegenüber Nichtrauchern etwa 5fach höhere HPB-Adduktlevel in der DNA der Mundschleimhaut [238].

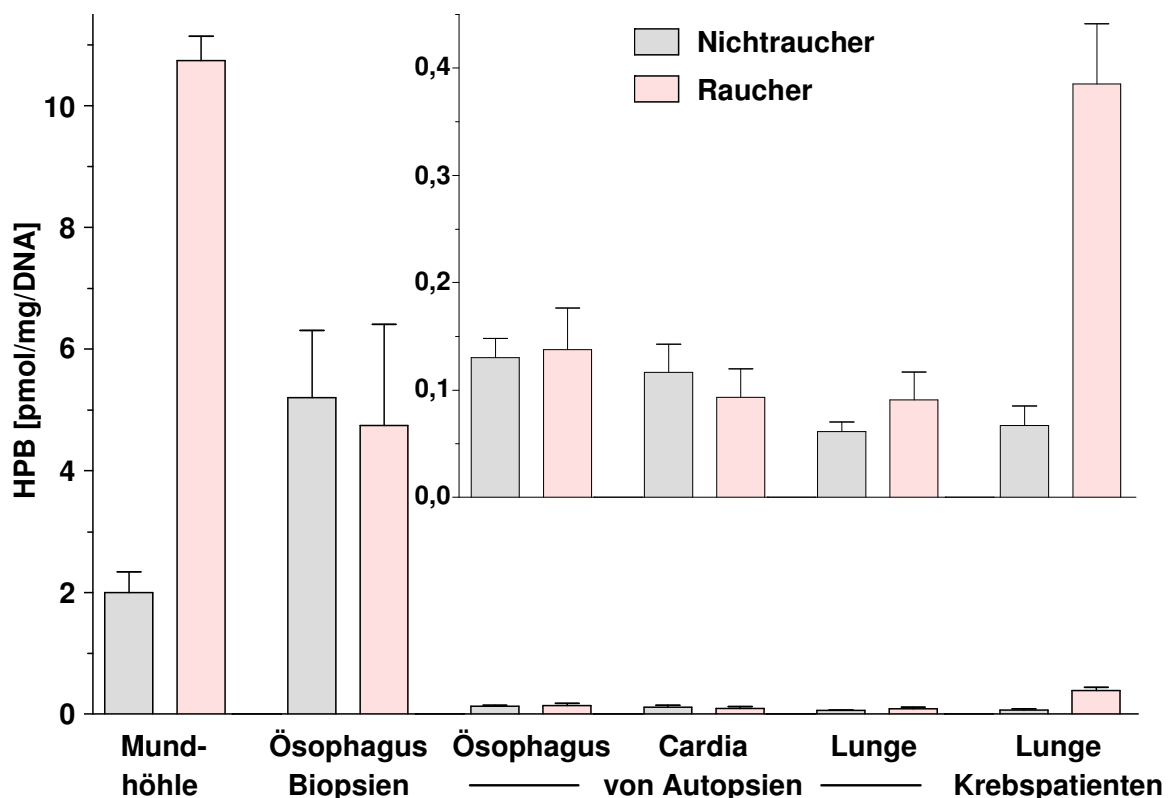


Abbildung 4-3: Vorkommen und Häufigkeit von HPB-freisetzenden DNA-Addukten in Mundschleimhaut [238], Ösophagusschleimhaut [211], Lunge, Ösophagus- und Cardiawand [219] und peripherem Lungengewebe von Lungenkrebspatienten [218] (modifiziert nach Helsing [238]); MW \pm SE

Es ist durchaus möglich, dass HPB-DNA-Addukte beim Menschen bevorzugt in Geweben auftreten, welche wie Schleimhäute und die Lunge direkt und nicht nur über die Blutbahn mit potentiellen Adduktbildnern in Kontakt kommen. Die fehlende oder zu schwache Korrelation der HPB-freisetzenden DNA-Addukte mit dem Konsum von Tabakwaren, die bereits bei der Untersuchung der entsprechenden Hämoglobinaddukte aufgefallen war [194,195,239,240], erhärtet jedoch die Hypothese, dass andere vom Tabakgenuss unabhängige Quellen wie das Myosmin für die HPB-Addukte mitverantwortlich sein müssen [70,71,198,241]. Die Bildung von HPB-Addukten durch Nitrosierung und Peroxidation [67,198,199] steht im Einklang mit den hohen Adduktwerten in den Schleimhäuten der Mundhöhle und des Ösophagus, wo sich Nitrit und Myosmin in höchster Konzentration mischen. In der Lunge könnten peroxidative Prozesse eine entscheidende Rolle spielen.

4.3 Bestimmung von Cotinin, Nikotin und Myosmin

4.3.1 Cotinin, Nikotin und Myosmin in Zehennägeln

Die Wachstumsrate von Zehennägeln beträgt durchschnittlich 1 cm in 9-12 Monaten. Zehennägel wachsen in die Länge und in die Dicke. Fremdstoffe können sich über die Nagelwurzel sowie über das Nagelbett in die Nagelsubstanz einlagern [242]. Für Stoffe, die sich im Keratin des Nagels anreichern, stellen Zehennägel daher eine gute Matrixwahl zur Ermittlung der Langzeitexposition dar. Gegenüber der Analyse von Tabakalkaloiden aus menschlichen Fingernägeln oder Haaren, einer viel verwendeten Matrix [243-246], weist die Nutzung von Zehennägeln diverse Vorteile auf. Da die Zehen im Vergleich zu Kopfhaaren oder Fingernägeln selten exponiert sind, können äußere Kontaminationsquellen wie beispielsweise Passivrauch vernachlässigt werden. Stärker pigmentierte Haare lagern deutlich mehr Nikotin ein als unpigmentierte Haare [247,248]. Der Grund dafür ist die Akkumulation von basischen Substanzen in den Melanozyten und eine anschließende Einlagerung in die Melaningranula [249]. Da in Zehennägeln kein Melanin vorhanden ist, kann bei der Nikotinoid-Analyse aus dieser Matrix auf eine Berücksichtigung der Haarfarbe des Menschen verzichtet werden. Die Analyse von Zehennägeln bietet daneben weitere Vorteile wie eine unkomplizierte Lagerung bis zur Untersuchung sowie die nicht-invasive Gewinnung der Proben. Für Tabakalkaloide in Zehennägeln existieren bisher allerdings nur sehr wenige Daten. Verstärkte Forschung auf diesem Gebiet wäre lohnenswert.

In den Zehennagelproben der Raucher dieser Studie wurden mit durchschnittlich 1039 ng/g 58fach höhere Cotininkonzentrationen gefunden, als bei den Nichtrauchern mit 18 ng/g Cotinin. Die Cotininwerte der Snuser lagen mit 1582 ng/g höher, als die der Raucher, was auf eine insgesamt höhere Nikotinaufnahme dieser Gruppe hinweist. Hierbei ist zu beachten, dass fünf der sieben Snuser zusätzlich rauchten. Die gefundenen Cotininkonzentrationen liegen im Bereich der von Schütte-Borkovec [192,214] und Heling [238] angegebenen Werte. Stepanov et al. ermittelten 2006 mit 1,6 ng/mg Zehennagel etwas höhere und in einer nachfolgenden, größeren Studie mit 0,67 ng/mg Zehennagel deutlich geringere Cotininmengen für Raucher [250,251].

Die mittleren Nikotinkonzentrationen von Rauchern und Snusern unterschieden sich mit 1864 und 1858 ng/g nicht. Während im Plasma von Rauchern Cotinin aufgrund seiner langen Halbwertszeit gegenüber Nikotin dominiert, sind in den Zehennägeln die Konzentrationen von Nikotin höher als die von Cotinin. Offensichtlich wird Nikotin im Keratin der Zehennägel stärker angereichert als sein Metabolit Cotinin, der durch seine Carbonylfunktion geringfügig polarere Eigenschaften besitzt (Abbildung 1-14). In den Zehennägeln der Nichtraucher (25 ng/g) wurde etwa 75fach weniger Nikotin als bei den Rauchern gefunden. Die hier gemessenen Nikotinkonzentrationen stimmen allgemein gut mit bisher publizierten Daten überein [192,214,238,252,253]. Nur Stepanov et al. [250,251] fanden trotz Anwendung einer sehr ähnlichen GC-MS-Methode in zwei Studien mit über 5 ng/mg wesentlich höhere Nikotinkonzentrationen in Zehennägeln von Rauchern, die aber eine erstaunlich große Streubreite aufwiesen.

Cotinin- und Nikotinanalysen in Zehennägeln stellen wegen der deutlichen Konzentrationsunterschiede bei Rauchern und Nichtrauchern eine gute Möglichkeit zur Unterscheidung dieser beiden Gruppen dar. Weil das selbst berichtete Rauchverhalten von Probanden nicht immer dem wirklichen Rauchstatus entspricht, bietet sich für epidemiologische Studien zu Langzeitriskien des aktiven und passiven Rauchens die zusätzliche Analyse von Zehennägeln als eine sinnvolle Ergänzung an [190,253]. Auch die Analyse von NNAL und NNN aus Zehennägeln ist mittlerweile möglich und kann neben dem Rauchstatus die Belastung mit tabakspezifischen Nitrosaminen durch Tabakkonsum anzeigen [250,251,254].

Myosmin wurde in Zehennägeln bisher nur in unserem Arbeitskreis bestimmt. Im Gegensatz zu Cotinin und Nikotin wurde Myosmin nicht in allen Zehennagelproben von Rauchern und Snusern gefunden. Bei Rauchern war die mittlere Myosminkonzentration mit 110,1 ng/g gegenüber Nichtrauchern mit 4,2 ng/g etwa 26fach höher. Bei

Snusern war sie mit 128,6 ng/g geringfügig höher als bei Rauchern. Grundsätzlich liegen die Ergebnisse im selben Bereich wie in den bisherigen Studien des Arbeitskreises [192,214,238]. Der Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern ist in dieser Studie aber deutlich größer als bei Heling [238], die bei Rauchern mit 67,8 ng/g etwas geringere und bei Nichtrauchern mit 22,2 ng/g aber deutlich höhere Myosminkonzentrationen fand. Allerdings beruht der Mittelwert der Nichtraucher bei Heling auf nur 4 von 12 positiv getesteten Proben. Bei 31 Snusern fand Heling mit 105 ng/g nur eine geringfügig niedrigere Myosminkonzentration wie bei den hier untersuchten 7 Snusern, von denen 5 zusätzlich rauchten. In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen korrelieren die Konzentrationen von Cotinin, Nikotin und Myosmin in den Zehennagelproben jeweils gut miteinander (Spearman $p < 0,0001$). Zur Überprüfung des Rauchstatus eignet sich die Myosmin-Analyse aber nicht, da neben Tabak auch Nahrung eine signifikante Myosminquelle für den Menschen darstellt [70,71].

4.3.2 Cotinin, Nikotin und Myosmin in Plasma

Die Untersuchung von Nikotinoiden im Plasma stellt im Vergleich zur Analytik von Zehennägeln lediglich einen Kurzzeit-Biomarker dar. Zur Rauchstatusbestimmung von akut Verstorbenen bietet sich Plasma dennoch als leicht verfügbare Matrix mit fundierten Erfahrungen aufgrund zahlreicher, früherer Studien [188,255-259] an.

Nikotin wird im menschlichen Organismus zu 70-80 % primär zu Cotinin verstoffwechselt (siehe Abbildung 1-14) [139,255]. Den entscheidenden Anteil an diesem Metabolismus hat das Cytochrom P450-Isoenzym 2A6 [260]. Cotinin ist aufgrund seiner langen Halbwertszeit von ca. 17 Stunden (verglichen mit Nikotin, das eine Halbwertszeit von nur etwa 2,3 Stunden besitzt) ein geeigneter Biomarker für die Rauchbelastung [188]. Nikotinhaltige Nahrungsmittel wie beispielsweise Tomaten, Kartoffeln oder Auberginen [261,262] können neben Tabakprodukten eine weitere Nikotinquelle darstellen. Ihr Beitrag ist allerdings so gering, dass selbst eine Bestimmung der Passivrauchbelastung davon unbeeinflusst bleibt [263].

Die Plasmaproben stammten ausschließlich von akut Verstorbenen aus der Rechtsmedizin München. Zur Unterscheidung von Rauchern und Nichtrauchern diene ein Cut-off-Wert von 10 ng/ml Cotinin [188,259]. Die Cotininkonzentrationen der Raucher überstiegen mit durchschnittlich 177,0 ng/ml den Mittelwert der Nichtraucher (0,8 ng/ml) um das 221fache. Der Mittelwert der Raucher liegt unter dem Konzentrationsbereich von 219 bis 384 ng/ml der von Tricker et al. [188] zusammengefassten Studien. In einer der größten Studien der letzten Jahre fanden Benowitz et al. [264]

allerdings für erwachsene weiße Amerikaner mit durchschnittlich 143 ng/ml bei 1261 Rauchern und 0,08 ng/ml bei 4220 Nichtrauchern noch niedrigere Cotininkonzentrationen. Dies wird wohl hauptsächlich am veränderten Rauchverhalten durch steigende Zigarettenpreise, einem verstärktem Gesundheitsbewusstsein sowie Rauchverböten an vielen Orten in den letzten Jahren liegen. Die akut verstorbenen Personen unserer Studie könnten teilweise auch krankheitsbedingt in den Tagen vor dem Tod nicht mehr oder nur eingeschränkt geraucht haben. Dies könnte die hohe Streuung der Werte erklären. Dass während den Sterbephasen der Agonie und des intermediären Lebens, welches nach etwa 20 Stunden durch den biologischen Tod endet [265], noch ein Abbau von Cotinin stattfindet ist ebenfalls nicht auszuschließen.

Die Nikotinkonzentrationen der Raucher betragen im Durchschnitt 24,5 ng/ml und lagen damit innerhalb der üblichen Erfahrungswerte von 10 bis 50 ng/ml [139]. Nichtraucher hatten mit 0,5 ng Nikotin pro ml rund 49fach weniger Nikotin im Plasma als Raucher. Jarvis et al. [257] fanden für Nichtraucher vergleichbare Plasma-Nikotinkonzentrationen von $0,9 \pm 1,2$ ng/ml (MW \pm SD).

Die Myosminkonzentrationen der Raucher lagen mit 0,32 ng/ml deutlich unter dem Niveau von Cotinin oder Nikotin und wiesen nur einen 3,6fachen, aber hochsignifikanten Unterschied zu den Werten der Nichtraucher (0,09 ng/ml; $p < 0,0001$) auf. Diese geringe Differenz zwischen Rauchern und Nichtrauchern ist eine weitere Bestätigung dafür, dass Tabakkonsum nicht die einzige Quelle für Myosmin darstellt. Zu Myosminkonzentrationen in Plasma fehlen bislang Vergleichswerte von anderen Arbeitsgruppen. Lediglich in unserem Arbeitskreis wurde im Rahmen der Dissertationen von Heppel [192,211] und Heling [238] Myosmin im Plasma untersucht. Heppel fand vergleichbare Myosminkonzentrationen mit 0,26 ng/ml für Raucher und 0,17 ng/ml für Nichtraucher. Es handelte sich um hospitalisierte Probanden, denen morgens im nüchternen Zustand Blut abgenommen wurde. Heling fand bei starken Rauchern aus Polen mit 0,59 ng/ml etwas höhere Myosminkonzentrationen.

Das genotoxische und mutagene Potenzial von Myosmin konnte bereits durch *in vitro*-Versuche bestätigt werden [266-268]. Zur Toxikokinetik von Myosmin beim Menschen gibt es allerdings bisher nur sehr wenig Erfahrung. Die durchschnittliche tägliche Myosminaufnahme wurde von Tyroller et al. [71] auf Grundlage eines statistischen Warenkorbs auf etwa 1,3 μ g geschätzt. Im Rahmen eines Gruppenversuchs wurde der Myosmingehalt eines Mittagessens, das hauptsächlich aus Bulgur, Putenfleisch und Sahne bestand, mit 13,5 ng/g bestimmt. Die tägliche Myosminaufnahme

liegt also vermutlich höher als zuvor geschätzt. Zudem wurde der Myosmingehalt vieler Nahrungs- und Genussmittel wie z.B. Kaffee noch nicht bestimmt. Autoradiographische Messungen nach intravenöser Gabe von ^{14}C -markiertem Myosmin an Ratten von Glas et al. [269] zeigten eine Anreicherung der Substanz in Drüsengewebe, Leber, Nierenrinde, Ösophagus und im Melanin von Haut und Netzhaut. Die Halbwertszeit wurde mit ca. einer Stunde bestimmt und ist damit bei Ratten nicht wesentlich länger als jene von Nikotin [270]. Die rasche Ausscheidung von Myosmin wurde in einem weiteren Versuch nach oraler Gabe bei Ratten bestätigt [271]. Beim Menschen wird für Myosmin ebenfalls eine kurze Halbwertszeit angenommen. Große tageszeitliche Schwankungen der Myosminkonzentrationen in Speichel unterstützen diese Vermutung [214,272]. Schütte-Borkovec [192] konnte im Speichel von Nichtrauchern Myosminkonzentrationen von 0,73 ng/ml, bei Rauchern 2,54 ng/ml finden. Heling [238] ermittelte mit 0,84 ng/ml für Nichtraucher und 3,62 ng/ml für Raucher ähnliche Konzentrationen. Das höhere Vorkommen von Myosmin in Speichel verglichen mit Plasma spiegelt dessen Anreicherung in Speicheldrüsen und anschließender Sezernierung wieder. In Muttermilch von Nichtraucherinnen entdeckten Maier et al. [272] das Alkaloid in Konzentrationen von 0,17 ng/ml. Bei Passivraucherinnen lag die mittlere Myosminbelastung mit 0,30 ng/ml etwas höher und die Muttermilch einer Raucherin enthielt mit 1,34 ng/ml den höchsten gemessenen Myosminwert. Einer möglichen Myosminbildung aus bisher unbekanntem Vorstufen aus der Nahrung oder einer endogenen Myosminsynthese aus körpereigenen Stoffen steht das Absinken der Myosminkonzentration in Speichel bis unter die Nachweisgrenze im Rahmen eines Fastenversuchs entgegen [272]. Die Plasmaproteinbindung von Myosmin ist bisher nicht bekannt. Für die strukturell sehr ähnlichen Verbindungen Nikotin und Cotinin beträgt sie nur 5 bzw. 3 % [273], daher kann auch für Myosmin von einer sehr geringen Bindung an Plasmaproteine ausgegangen werden.

Einen besonderen Einfluss auf die Plasmakonzentration von Myosmin scheint der Konsum von Alkohol zu haben. Bei Verstorbenen mit nachweisbarem Blutalkohol wurden durchschnittlich zweifach höhere Myosminkonzentrationen gefunden als bei nüchternen Verstorbenen (0,32 ng/ml vs. 0,15 ng/ml; $p=0,0015$). Auch bei separater Auswertung der Myosminkonzentrationen von Rauchern und Nichtrauchern mit und ohne messbaren Blutalkohol zeigt sich der Trend zu höheren Werten bei alkoholisierten Verstorbenen (Abbildung 3-26). Heppel [192,211] berichtet ebenfalls von etwa zweifach höheren Myosminkonzentrationen in Plasma von Probanden, die angaben

regelmäßig Alkohol zu trinken im Vergleich zu solchen mit unregelmäßigem Alkoholkonsum (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Myosminkonzentrationen in Plasma von hospitalisierten Probanden mit unterschiedlichem selbst berichteten Alkoholkonsum; Daten von Heppel et al. [211]

Alkoholkonsum	Myosmin [pg/ml Plasma]	
	N	MW ± SD
unregelmäßig	53	139 ± 183
Nichtraucher	36	124 ± 160
Raucher	17	172 ± 227
regelmäßig	31	297 ± 315
Nichtraucher	21	244 ± 209
Raucher	10	408 ± 462

Ein vergleichbarer Einfluss auf die Cotininkonzentration konnte weder in der vorliegenden Arbeit noch von Heppel [192,211] gefunden werden obwohl bekannt ist, dass Raucher durchschnittlich einen höheren Alkoholkonsum aufweisen als Nichtraucher [274]. Eine mögliche Erklärung für den spezifischen Alkoholeinfluss auf die Myosminkonzentration im Plasma wäre die Hemmung des Myosmin-Abbaus durch Ethanol. Allerdings sind die Enzyme, die im Myosminstoffwechsel eine Rolle spielen, bisher nicht bekannt. Ohne weitere Kenntnisse der Toxikokinetik von Myosmin bleibt deshalb diese Theorie reine Spekulation. Eine größer angelegte Studie zur Untersuchung der Myosminkonzentrationen im Plasma von Rauchern und Nichtrauchern vor und nach kontrolliertem Alkoholkonsum könnte Gewissheit und weitere Informationen zu diesem Phänomen liefern. Es ist schließlich auch denkbar, dass Myosmin in alkoholischen Getränken vorhanden ist. Auch hierzu liegen noch keine Daten vor.

4.3.3 Cotinin, Nikotin und Myosmin in Urin

Wegen der nicht-invasiven Gewinnung und den hohen und daher leicht nachweisbaren Cotininkonzentrationen bei Rauchern bietet sich Urin als eine geeignete Biomatrix zur Rauchstatusbestimmung für verschiedenste Studientypen an. Etwa 9-10 % des insgesamt aufgenommenen Nikotins wird renal als Cotinin ausgeschieden (siehe Abbildung 1-14). Selbst kleinste Nikotinmengen, die durch Passivrauch aufgenommen werden, sind daher sehr empfindlich per Cotininanalyse nachweisbar [275,276]. Zur Einteilung der akut Verstorbenen in die Gruppen Raucher und Nichtraucher kam ein Cut-off-Wert von 50 ng Cotinin pro ml zur Anwendung [188].

Im Urin der Nichtraucher wurden durchschnittlich 4,3 ng/ml Cotinin und 4,6 ng/ml Nikotin gefunden. Diese Werte passen gut zu den von Jarvis et al. [257] 1987 berichteten Konzentrationen von 4,8 ng/ml Cotinin und 8,2 ng/ml Nikotin für Nichtraucher. Die Level dieser beiden Stoffe lagen bei den Rauchern allerdings mit 405,6 ng/ml (Cotinin) und 59,6 ng/ml (Nikotin) deutlich unter denen der rauchenden Probanden von Jarvis et al. [257] (1448 ng/ml Cotinin und 1843 ng/ml Nikotin). Die möglichen Gründe hierfür wurden bereits für das Plasma diskutiert (siehe Kapitel 4.2). Bei den Urinproben kommt eventuell noch hinzu, dass bei Toten durch eine erloschene Immunabwehr Bakterien über die Harnröhre in die Blase aufsteigen und sich dort schnell vermehren. Der Nikotinabbau durch Bakterien wie beispielsweise Pseudomonaden wurde vor rund 50 Jahren entdeckt und seither erfolgreich erforscht [277,278]. Es ist nicht auszuschließen, dass es auch im Harn der Verstorbenen zu einem bakteriellen Abbau von Nikotin und Cotinin kommt.

Vollkommen neu war die Entdeckung von Myosmin in Urin. Dies war bisher in unserem Arbeitskreis noch nicht untersucht worden, weil die Ergebnisse aus eigenen Versuchen mit Ratten dies nicht vermuten ließen [271]. Auch in einem Versuch aus dem Jahre 1971 von Beckett et al. [279], bei dem Probanden 2 mg in Wasser gelöstes Myosmin zu trinken gegeben wurde, konnte das Alkaloid im Urin nicht nachgewiesen werden. Allerdings besaß der damals verwendete Flammenionisationsdetektor sicherlich noch nicht die hohe Nachweisempfindlichkeit wie das heute eingesetzte Massenspektrometer.

Die durchschnittliche Myosminkonzentration im Urin von Rauchern betrug mit 2,35 ng/ml fast 24mal mehr als bei Nichtrauchern mit 0,10 ng/ml. Dieses Ergebnis passt zu bisherigen Daten aus der Literatur über den Myosmingehalt im Hauptstromrauch von Zigaretten und geschätzter Myosminaufnahme durch Nahrung [71,73]. Demnach nehmen Raucher wesentlich mehr Myosmin auf als Nichtraucher. Andererseits ist es durch die Vielzahl an Substanzen im Zigarettenrauch nicht völlig auszuschließen, dass es eine andere Substanz ist, die mit derselben molaren Masse wie das Myosminfragment zeitgleich von der Kapillarsäule eluiert. Von Morrical und Zenobi [280] wurden z.B. für die Masse 118 Indazol, Benzimidazol und Indan als weitere tabakspezifische Substanzen in Erwägung gezogen. In dieser Arbeit wurden die Analyten allerdings mit TOF-MS (time-of-flight-MS) ohne vorherige chromatographische Trennung gemessen. Nach den hier gefundenen Werten wird resorbiertes Myosmin im menschlichen Organismus schnell durch Metabolisierung und renale Elimination auf ein Minimum reduziert, denn im Plasma von Rauchern fanden sich mit

0,32 ng/ml über 7fach kleinere Myosminkonzentrationen. Aufgrund fehlender Informationen zu den exakten Aufnahmemengen aus Nahrung und Zigarettenrauch ist es allerdings nicht möglich, eine klare Aussage über den Anteil von unmetabolisiertem Myosmin in Urin zu treffen. Auch andere toxikokinetische Parameter wie Clearance oder Verteilungsvolumen sind noch völlig unbekannt. Um diese zu bestimmen wären Versuche mit Probanden unter kontrollierter, inhalativer und intestinaler Resorption von Myosmin empfehlenswert.

5 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom stellt in Deutschland mit knapp 15 000 jährlichen Neuerkrankungen zwar eine seltene, aber äußerst gefährliche Krebsart dar. Das Fehlen von spezifischen Frühsymptomen und Tumormarkern und die geringen Heilungschancen machen den meist spät diagnostizierten Pankreaskrebs zur vierthäufigsten Krebstodesursache in den westlichen Industrieländern. Das Rauchen ist einer der wenigen bekannten, eindeutigen Risikofaktoren. Schweden weist als Land mit der geringsten Raucherquote in ganz Europa deutlich niedrigere Fallzahlen von Pankreaskrebs auf. Etwa 20 % der schwedischen Männer und zunehmend auch Frauen konsumieren Snus, eine rauchlose Mundtabakart. Ob unverbrannter Tabak genauso wie Tabakrauch das Risiko für Pankreaskrebs erhöht, ist noch nicht endgültig geklärt.

Das tabakspezifische Nitrosamin (TSNA) 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und sein Hauptmetabolit 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) stellen im Tierversuch die einzigen bekannten Pankreaskanzerogene aus Tabakprodukten dar. Im Pankreassaft von Rauchern wurden NNK und NNAL in höheren Konzentrationen als bei Nichtrauchern gefunden. Nitrosamine bedürfen als Präkanzerogene einer metabolischen Aktivierung, die zu DNA-Addukten und somit zu einem wichtigen Schritt in der Initiation der chemischen Kanzerogenese führen kann. Die TSNA *N'*-Nitrosornikotin (NNN) und NNK führen zu Pyridyloxobutyl-DNA-Addukten (POB-DNA-Addukten), NNAL zu Pyridylhydroxybutyl-DNA-Addukten (PHB-DNA-Addukten). Diese Addukte wurden bei der Ratte nach Gabe hoher TSNA-Mengen in Pankreasgewebe nachgewiesen. Beim Menschen gelang der Nachweis der POB-DNA-Addukte bisher nur nach Abspaltung von 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) durch saure Hydrolyse und Analyse nach Derivatisierung mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). In Zielgeweben der TSNA-Kanzerogenese wie der Lunge und den Schleimhäuten der oberen Verdauungs- und Atemwege zeigten sich POB-DNA-Addukte, die eine unterschiedliche, aber insgesamt zu geringe Spezifität für den Gebrauch von Tabakwaren aufwiesen. Eine mögliche Erklärung dafür bietet das Alkaloid Myosmin als weitere Quelle dieser Addukte, weil es außer in Tabak auch in verschiedensten Nahrungsmitteln vorkommt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die POB-DNA-Addukte im Pankreas als einem weiteren Zielorgan der TSNA untersucht und mit dem Rauchen und dem Konsum von Snus in Beziehung gebracht werden. Hierfür wurden zusätzlich die Tabakalkaloide Nikotin, Cotinin und Myosmin in Proben von Plasma, Urin und Zehennägeln

gemessen. Außerdem wurde die Grundlage für die Bestimmung von PHB-DNA-Addukten durch Verbesserung der GC-MS-Analyse geschaffen.

Insgesamt 86 Pankreasgewebeproben von akut Verstorbenen aus der Rechtsmedizin München und Stockholm wurden auf HPB-freisetzende DNA-Addukte untersucht. Nur bei zwei Gewebeproben von Rauchern wurden in einer ersten und nicht wiederholbaren Analyse geringe HPB-Mengen von 58 und 23 fmol/mg DNA gefunden. Trotz der hohen Sensitivität der hier verwendeten Analytik war daher kein sicherer Nachweis des POB-DNA-Addukts in Pankreasgewebe möglich.

Zum Nachweis von PHB-DNA-Addukten durch Analyse des mittels saurer Hydrolyse freigesetzten 1-(3-Pyridyl)-1,4-butandiol (Diol) konnte durch eine Zweifachderivatisierung des Analyten eine sensitive GC-MS-Methode entwickelt werden. Die Extraktion des polaren Diols aus wässriger Lösung gelang jedoch nicht mit ausreichender Ausbeute und Reproduzierbarkeit und bedarf weiterer Untersuchungen.

Cotinin, Nikotin und Myosmin konnten in allen Biomatrices mit GC-MS nachgewiesen werden und korrelierten jeweils hochsignifikant miteinander (Spearman $p < 0,0001$).

In den Zehennagelproben fanden sich bei Rauchern und Snusern die höchsten Konzentrationen für Nikotin (1864 und 1858 ng/g), gefolgt von Cotinin (1039 und 1582 ng/g) und Myosmin (110 und 129 ng/g). Auch der in allen Fällen hochsignifikante Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern war bei Nikotin am höchsten (25 ng/g; 75fach), bei Cotinin etwas (18 ng/g; 58fach) und bei Myosmin deutlich geringer (4 ng/g; 26fach). Die bisher wenig erforschte Biomatrix erwies sich als gut geeignet, um eine langfristige Belastung mit Nikotin und Myosmin bei akut Verstorbenen zu erkennen.

Im Plasma waren die Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern für Myosmin mit 0,32 vs. 0,09 ng/ml deutlich geringer als für Cotinin (177,0 vs. 0,8 ng/ml) oder Nikotin (24,5 vs. 0,5 ng/ml). Bei Verstorbenen mit nachweisbarem Blutalkohol fand sich mehr Myosmin als bei nüchternen Verstorbenen (0,32 vs. 0,15 ng/ml; $p < 0,005$).

Im Urin der akut Verstorbenen hatten Raucher (406 ng/ml Cotinin; 60 ng/ml Nikotin) und Snuser (433 ng/ml Cotinin; 116 ng/ml Nikotin) signifikant höhere Konzentrationen als Nichtraucher (4 ng/ml Cotinin; 5 ng/ml Nikotin). Vollkommen neu war die Entdeckung kleinster Mengen von freiem Myosmin im Urin. Raucher und Snuser wiesen mit 2,4 ng/ml bzw. 2,3 ng/ml rund 23fach höhere Myosminkonzentration auf als Nichtraucher mit 0,1 ng/ml.

6 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J Parkin DM Steliarova-Foucher E (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur.J.Cancer* 46:765-781
2. Husmann G Kaatsch P Katalinic A Bertz J Kraywinkel K Wolf U (2010) Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. http://www.rki.de/cln_160/nn_204124/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2010
3. Becker N Holzmeier S (2010) Krebsmortalität im Überblick - Vergleich mit anderen Todesursachen Abteilung Epidemiologie von Krebserkrankungen Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_2.html
4. Jakszyn P Gonzalez CA (2006) Nitrosamine and related food intake and gastric oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroentero.* 12 (27):4296-4303
5. Loh YH Jakszyn P Luben RN Mulligan AA Mitrou PN Khaw K-T (2011) N-nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study. *Am.J Clin.Nutr.* 93:1053-1061
6. Belitz H-D Grosch W (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchenie. Berlin, Heidelberg, New York, Springer
7. Aktories K Förstermann U Hofmann FB Starke K (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10; Munich, Germany, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH
8. Donaldson MS (2004) Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr.J.* 3:19
9. Richter E Scherer G (2004) Aktives und passives Rauchen. in: Lehrbuch der Toxikologie; Ch. 35 pp 897-918; eds: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
10. Schaps K-P Kessler O Fetzner U (2007) Das Zweite - kompakt. Querschnittsbereiche. 1; Berlin, Germany, Springer-Verlag GmbH
11. Hiddemann W Bartram C (2009) Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie, Pathogenese, Grundprinzipien der Therapie. Berlin, Germany, Springer-Verlag GmbH
12. Mirvish SS (1995) Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett.* 93:17-48
13. Yang CS Smith T Ishizaki H Yoo JSH Hong J-Y (1991) Metabolism and activation of nitrosamines catalyzed by cytochrome P450 isozymes. in: N-Oxidation of Drugs: Biochemistry, Pharmacology, and Toxicology; pp 295-311; eds: Hlavica P Damani LA Gorrod JW; London, Chapman & Hall
14. Hecht SS Carmella SG Foiles PG Murphy SE (1994) Biomarkers for human uptake and metabolic activation of tobacco-specific nitrosamines. *Cancer Res.* 54:S1912-S1917
15. Esaka Y Inagaki S Goto M (2003) Separation procedures capable of revealing DNA adducts. *J.Chromatogr.B* 797:321-329
16. Memisoglu A Samson L (2000) Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat.Res.* 451:39-51
17. Norbury CJ Hickson ID (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 41:367-401

18. Schärer OD (2003) Chemistry and biology of DNA repair. *Angew.Chem.Int.Ed.* 42:2946-2974
19. Lippert H (2006) *Lehrbuch Anatomie. 7*; Munich, Germany, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH
20. Lüllmann-Rauch R (2009) *Histologie. 3*; Stuttgart, Germany, Georg Thieme Verlag KG
21. Welsch U (2005) *Sobotta Lehrbuch Histologie. 2*; Munich, Germany, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH
22. Geisler F (2011) *MediDesign - Anatomie online*. <http://www.anatomie-online.com>
23. Böcker W Denk H (2008) *Pathologie. 4*; Munich, Germany, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH
24. Bühling KJ Lepenies J Witt K (2008) *Intensivkurs: Allgemeine und Spezielle Pathologie. 4*; Munich, Germany, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH
25. DIMDI (2011) *Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision*. <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlgm2011/block-c15-c26.htm>
26. Stegmayr B (2009) *Cancer Incidence in Sweden 2008*; National Board of Health and Welfare <http://www.socialstyrelsen.se/Lists/Artikelkatalog/Attachments/17841/2009-12-1.pdf>
27. Raimondi S Maisonneuve P Lowenfels AB (2009) Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 6:699-708
28. Ferlay J. and Shin H.R. *GLOBOCAN 2008 Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008*. International Agency for Research on Cancer. 2010; <http://www-dep.iarc.fr>
29. Freelove R Walling A.D. (2006) *Pancreatic Cancer: Diagnosis and Management*. *Am.Fam.Physician* 73:485-492
30. Hawes RH Xiong Q Waxman I Chang KJ Evans DB Abbruzzese JL (2000) A multi-specialty approach to the diagnosis and management of pancreatic cancer. *Am.J.Gastroenterol* 95:17-31
31. Yeo CJ Yeo TP Hruban RH et al. (2005) *Cancer of the Pancreas*. in: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*; eds.: DeVita VT Hellman S Rosenberg SA; Vol. 7:861-909; Lippincott & Wilkins, Philadelphia
32. Ghaneh P Costello E Neoptolemos JP (2007) Biology and management of pancreatic cancer. *Gut* 56:1134-1152
33. Neoptolemos JP Stocken DD Bassi C Ghaneh P Cunningham D Goldstein D Padbury R Moore MJ (2010) Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection. *JAMA* *J.Am.Med.Assoc.* 304:1073-1081
34. Cunningham D Chau I Stocken DD et al. (2009) Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J.Clin.Oncol.* 27:5513-5518
35. Lichtenstein P Holm NV Verkasalo PK Iliadou A Kaprio J Koskenvuo M (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *New Engl.J.Med.* 343:78-85

36. Iodice S Gandini S Maisonneuve P Lowenfels AB (2008) Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch.Surg.* 393:535-545
37. Wynder EL Mabuchi K Maruchi N Fortner JG (1973) Epidemiology of cancer of the pancreas. *J.Natl.Cancer Inst.* 50:645-667
38. Bertuccio P La Vecchia C Silverman DT et al. (2011) Cigar and pipe smoking, smokeless tobacco use and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann.Oncol.* 22:1420-1426
39. Silverman DT Dunn JA Hoover RN et al. (1994) Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. *J.Natl.Cancer Inst.* 86:1510-1516
40. Lowenfels AB Maisonneuve P (2003) Environmental factors and risk of pancreatic cancer. *Pancreatology* 3:1-8
41. Hassan MM Abbruzzese JL Bondy ML et al. (2007) Passive smoking and the use of noncigarette tobacco products in association with risk for pancreatic cancer: a case-control study. *Cancer* 109:2547-2556
42. Vrieling A Bueno-de-Mesquita HB Boshuizen HC et al. (2010) Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int.J.Cancer* 126:2394-2403
43. Sponsiello-Wang Z Weitkunat R Lee PN (2008) Systematic review of the relation between smokeless tobacco and cancer of the pancreas in Europe and North America. *BMC Cancer* 8:356-368
44. Boffetta P Aagnes B Weiderpass E Andersen A (2005) Smokeless tobacco use and risk of cancer of the pancreas and other organs. *Int.J.Cancer* 114:992-995
45. Boffetta P Hecht S Gray N Gupta P Straif K (2008) Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol.* 9:667-675
46. Luo J Ye W Zendehdel K et al. (2007) Oral use of Swedish moist snuff (snus) and risk for cancer of the mouth, lung, and pancreas in male construction workers: a retrospective cohort study. *Lancet* 369:2015-2020
47. Accortt NA Waterbor JW Beall C Howard G (2005) Cancer incidence among a cohort of smokeless tobacco users (United States). *Cancer Causes Control* 16:1107-1115
48. Foulds J Ramstrom L Burke M Fagerström K (2003) Effect of smokeless tobacco (snus) on smoking and public health in Sweden. *Tob.Control* 12:349-359
49. Askari MDF Tsao M-S Cekanova M Schuller HM (2006) Ethanol and the tobacco-specific carcinogen, NNK, contribute to signaling in immortalized human pancreatic duct epithelial. *Pancreas* 33:53-62
50. Rohrmann S Linseisen J Vrieling A et al. (2009) Ethanol intake and the risk of pancreatic cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control* 20:785-794
51. Al-Wadei HA Al-Wadei MH Schuller HM (2009) Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol. *Anti-Cancer Drugs* 20:477-482
52. Anon (2007) Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a global perspective. Washington DC, AICR
53. Tersmette AC Petersen GM Offerhaus GJ Falatko FC Brune KA Goggins.M (2001) Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin.Cancer Res.* 7:738-744

54. Landi S (2009) Genetic predisposition and environmental risk factors to pancreatic cancer: a review of the literature. *Mutat.Res.* 681:299-307
55. Andersen RA Burton HR Fleming PD Hamilton-Kemp TR (1989) Effect of storage conditions on nitrosated, acylated, and oxidized pyridine alkaloid derivatives in smokeless tobacco products. *Cancer Res.* 49:5895-5900
56. Djordjevic MV Gay LS Bush LP Chaplin JF (1989) Tobacco-specific nitrosamine accumulation and distribution in flue-cured tobacco alkaloid isolines. *J.Agric.Food Chem.* 37:752-756
57. Tso TC (1990) Tobacco-specific N-nitrosamines. in: *Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant*; pp 467-486; ed.: Tso TC, Beltsville MD USA, Ideal Inc.
58. de Roton C Wiernik A Wahlberg I Vidal B (2005) Factors influencing the formation of tobacco-specific nitrosamines in French air-cured tobaccos in trials at the farm level. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 21:305-320
59. Hecht SS (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat.Rev.Cancer* 3:733-744
60. Smith CJ Perfetti TA Garg R Hansch C (2003) IARC carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and their calculated log *P* values. *Food Chem.Toxicol.* 41:807-817
61. IARC (2007) Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines. in: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*; ed.: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Vol. 89:1-626; IARC, Lyon, France
62. Prokopczyk B Wu M Cox JE et al. (1995) Improved methodology for the quantitative assessment of tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco by supercritical fluid extraction. *J.Agric.Food Chem.* 43:916-922
63. Idris AM Nair J Ohshima H et al. (1991) Unusually high levels of carcinogenic tobacco-specific nitrosamines in Sudan snuff (toombak). *Carcinogenesis* 12:1115-1118
64. Österdahl B-G Jansson C Paccou A (2004) Decreased levels of tobacco-specific N-nitrosamines in moist snuff on the Swedish market. *J.Agric.Food Chem.* 52:5085-5088
65. Brunneemann KD Prokopczyk B Djordjevic MV Hoffmann D (1996) Formation and analysis of tobacco-specific N-nitrosamines. *Crit.Rev.Toxicol.* 26:121-137
66. Hoffmann D Brunneemann KD Prokopczyk B Djordjevic MV (1994) Tobacco-specific N-nitrosamines and Areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J.Toxicol.Envirn.Health A* 41:1-52
67. Zwickenspflug W (2000) N-Nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (N-nitrosornicotine). *J.Agric.Food Chem.* 48:392-394
68. Mirvish SS Sams J Hecht SS (1977) Kinetics of nornicotine and anabasine nitrosation in relation to N'-nitrosornicotine occurrence in tobacco and to tobacco-induced cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 59:1211-1213
69. Caldwell WS Greene JM Dobson GP deBethizy JD (1993) Intragastric nitrosation of nicotine is not a significant contributor to nitrosamine exposure. *Ann.NY Acad.Sci.USA* 686:213-228
70. Zwickenspflug W Meger M Richter E (1998) Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachus hypogaea* and *Corylus avellana*. *J.Agric.Food Chem.* 46:2703-2706

71. Tyroller S Zwickenpflug W Richter E (2002) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables and milk. *J.Agric.Food Chem.* 50:4909-4915
72. Leete E (1984) The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic-pathway in *Nicotiana tabacum*. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 12:113-116
73. Sakuma H Kusama M Yamaguchi K Matsuki T Sugawara S (1984) The distribution of cigarette smoke components between mainstream and sidestream smoke. II. Bases. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 12:199-209
74. Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem.Res.Toxicol.* 11:559-603
75. Hecht SS (2008) Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. *Chem.Res.Toxicol.* 21:160-171
76. Richter E Engl J Friesenegger S Tricker AR (2009) Biotransformation of 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in lung tissue from mouse, rat, hamster, and man. *Chem.Res.Toxicol.* 22:1008-1017
77. Maser E (1998) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase responsible for carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes. *Cancer Res.* 58:2996-3003
78. Maser E Stinner B Atalla A (2000) Carbonyl reduction of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by cytosolic enzymes in human liver and lung. *Cancer Lett.* 148:135-144
79. Trushin N Leder G El-Bayoumy K et al. (2008) The tobacco carcinogen NNK is stereoselectively reduced by human pancreatic microsomes and cytosols. *Langenbecks Arch.Surg.* 393:571-579
80. Morse MA Eklind KI Toussaint M Amin SG Chung F-L (1990) Characterization of a glucuronide metabolite of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and its dose-dependent excretion in the urine of mice and rats. *Carcinogenesis* 11:1819-1823
81. Hecht SS Trushin N Reid-Quinn CA et al. (1993) Metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the patas monkey: pharmacokinetics and characterization of glucuronide metabolites. *Carcinogenesis* 14:229-236
82. Richter E Tricker AR (1994) Nicotine inhibits the metabolic activation of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in rats. *Carcinogenesis* 15:1061-1064
83. Kutzer C Richter E Oehlmann C Atawodi SE (1995) Effect of nicotine and cotinine on NNK metabolism in rats. in: *Effects of Nicotine on Biological Systems II*; pp 385-390; eds: Clarke PBS Quik M Adlkofer F Thureau K; Basel, Boston, Berlin, Birkhäuser Verlag
84. Schulze J Richter E Binder U Zwickenpflug W (1992) Biliary excretion of 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3'-pyridyl)-1-butanone in the rat. *Carcinogenesis* 13:1961-1965
85. Meger M Richter E Zwickenpflug W et al. (1999) Metabolism and disposition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in rhesus monkeys. *Drug Metab.Dispos.* 27:471-478
86. Hecht SS Carmella SG Stepanov I Jensen J Anderson A Hatsukami DK (2008) Metabolism of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone to its biomarker total NNAL in smokeless tobacco users. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 16:1852-1857

87. Stepanov I Upadhyaya P Carmella SG et al. (2008) Extensive metabolic activation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 17:1764-1773
88. Carmella SG Akerkar S Hecht SS (1993) Metabolites of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers' urine. *Cancer Res.* 53:721-724
89. Jalas JR Hecht SS Murphy SE (2005) Cytochrome P450 enzymes as catalysts of metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco specific carcinogen. *Chem.Res.Toxicol.* 18:95-110
90. Atawodi SE Richter E (1996) Bacterial reduction of N-oxides of tobacco-specific nitrosamines (TSNA). *Hum.Exp.Toxicol.* 15:329-334
91. Carmella SG Borukhova A Akerkar SA Hecht SS (1997) Analysis of human urine for pyridine-N-oxide metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific lung carcinogen. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 6:113-120
92. Murphy SE Palomino A Hecht SS Hoffmann D (1990) Dose-response study of DNA and hemoglobin adduct formation by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in F344 rats. *Cancer Res.* 50:5446-5452
93. IARC (2006) Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol. in: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*; ed.: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Vol. 88: International Agency for Research on Cancer, Lyon, France
94. Wu Z Upadhyaya P Carmella SG Hecht SS Zimmerman CL (2002) Disposition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in bile duct-cannulated rats: stereoselective metabolism and tissue distribution. *Carcinogenesis* 23:171-179
95. Levine WG (1978) Biliary excretion of drugs and other xenobiotics. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 18:81-96
96. Atawodi SEO Michelsen K Richter E (1994) Metabolism of a glucuronide conjugate of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in rats. *Arch.Toxicol.* 69:14-17
97. Adams JD LaVoie EJ Hoffmann D (1985) On the pharmacokinetics of tobacco-specific N-nitrosamines in Fischer rats. *Carcinogenesis* 6:509-511
98. Hecht SS Carmella SG Chen M et al. (1999) Quantitation of urinary metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen after smoking cessation. *Cancer Res.* 59:590-596
99. Schulze J Schläger W Wünsch R Richter E (1996) Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by hamster, mouse and rat intestine: relevance of species differences. *Carcinogenesis* 17:1093-1099
100. Patten CJ Smith TJ Friesen MJ Tynes RE Yang CS Murphy SE (1997) Evidence for cytochrome P450 2A6 and 3A4 as major catalysts for N'-nitrosonornicotine α -hydroxylation by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 18:1623-1630
101. Lassnack B (2005) Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins N'-Nitrosonornicotin in Gewebeschnitten von Mäusen, Ratten und Menschen sowie Möglichkeiten der Hemmung durch Nicotin, Cotinin und Phenethylisothiocyanat (PEITC). Dissertation am Fachbereich der Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Giessen
102. IARC (2010) Agents Classified by the *IARC Monographs*, Volumes 1-100; last update: 30 Aug 2010 <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>

103. McCoy GD Hecht SS Katayama S Wynder EL (1981) Differential effect of chronic ethanol consumption on the carcinogenicity of *N*-nitrosopyrrolidine and *N'*-nitrosornicotine in male Syrian golden hamsters. *Cancer Res.* 41:2849-2854
104. Boyland E Roe FJC Gorrod JW (1964) Induction of pulmonary tumours in mice by nitrosornicotine, a possible constituent of tobacco smoke. *Nature* 202:1126
105. Hecht SS Abbaspour A Hoffmann D (1988) A study of tobacco carcinogenesis XLIII. Bioassay in A/J mice of some structural analogues of tobacco-specific nitrosamines. *Cancer Lett.* 42:141-145
106. Castonguay A Rivenson A Trushin N et al. (1984) Effects of chronic ethanol consumption on the metabolism and carcinogenicity of *N'*-nitrosornicotine in F344 rats. *Cancer Res.* 44:2285-2290
107. Hecht SS Chen CB Ohmori T Hoffmann D (1980) Comparative carcinogenicity in F344 rats of the tobacco-specific nitrosamines, *N'*-nitrosornicotine and 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.* 40:298-302
108. Hoffmann D Rivenson A Amin S Hecht SS (1984) Dose-response study of the carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines in F344 rats. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 108:81-86
109. Gunning WT Castonguay A Goldblatt PJ Stoner GD (1991) Strain A/J mouse lung adenoma growth patterns vary when induced by different carcinogens. *Toxicol.Pathol.* 19:168-175
110. Hecht SS Adams JD Numoto S Hoffmann D (1983) Induction of respiratory tract tumors in Syrian golden hamsters by a single dose of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and the effect of smoke inhalation. *Carcinogenesis* 4:1287-1290
111. Koppang N Rivenson A Dahle HK Hoffmann D (1997) A study of tobacco carcinogenesis, LIII: carcinogenicity of *N'*-nitrosornicotine (NNN) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in mink (*Mustela vison*). *Cancer Lett.* 111:167-171
112. Boorman GA Hailey R Grumbein S et al. (1994) Toxicology and carcinogenesis studies of ozone and ozone 4-(*N*-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in Fischer-344/N rats. *Toxicol.Pathol.* 22:545-554
113. Hecht SS Trushin N Rigotty J et al. (1996) Complete inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced rat lung tumorigenesis and favorable modification of biomarkers by phenethyl isothiocyanate. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5:645-652
114. Rivenson A Hoffmann D Prokopczyk B Amin S Hecht SS (1988) Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and *Areca*-derived *N*-nitrosamines. *Cancer Res.* 48:6912-6917
115. Hecht SS Jordan KG Choi C-I Trushin N (1990) Effects of deuterium substitution on the tumorigenicity of 4-(methylnitrosamino)-1-pyridyl)-1-butanone and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in A/J mice. *Carcinogenesis* 11:1017-1020
116. Furukawa F Nishikawa A Yoshimura H et al. (1994) Effects of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) on *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)-initiated carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett.* 86:75-82
117. Furukawa F Nishikawa A Enami T et al. (1997) Promotional effects of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) on *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)-initiated carcinogenesis in hamsters. *Food Chem.Toxicol.* 35:387-392

118. Sporn MB Dunlop NM Newton DL Smith JM (1976) Prevention of chemical carcinogenesis by Vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed.Proc.* 35:1332-1338
119. London SJ Yuan JM Chung FL et al. (2000) Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* 356:724-729
120. Zhao B Seow A Lee EJD et al. (2001) Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase-M1, -T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 10:1063-1067
121. Jongen WMF (1996) Glucosinolates in Brassica: occurrence and significance as cancer-modulating agents. *Proc.Nutr.Soc.* 55:433-446
122. Chung F-L Kelloff G Steele V et al. (1996) Chemopreventive efficacy of arylalkyl isothiocyanates and *N*-acetylcysteine for lung tumorigenesis in Fischer rats. *Cancer Res.* 56:772-778
123. Morse MA Wang C-X Stoner GD et al. (1989) Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA adduct formation and tumorigenicity in the lung of F344 rats by dietary phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res.* 49:549-553
124. Morse MA Eklind KI Hecht SS et al.(1991) Structure-activity relationships for inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone lung tumorigenesis by arylalkyl isothiocyanates in A/J mice. *Cancer Res.* 51:1846-1850
125. El-Bayoumy K Upadhyaya P Desai DH Amin S Hoffmann D Wynder EL (1996) Effects of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol, and *d*-limonene individually and in combination on the tumorigenicity of the tobacco specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Anticancer Res.* 16:2709-2712
126. Hecht SS (2000) Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab.Rev.* 32:395-411
127. Hecht SS Chung F-L Richie JP et al. (1995) Effects of watercress consumption on metabolism of a tobacco-specific lung carcinogen in smokers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 4:877-884
128. Morse MA Wang C-X Amin SG Hecht SS Chung F-L (1988) Effects of dietary sinigrin or indole-3-carbinol on *O*⁶-methylguanine-DNA-transmethylase activity and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA methylation and tumorigenicity in F344 rats. *Carcinogenesis* 9:1891-1895
129. Anon (2001) Directive 2001/37/EC of the European Parliament and of the Council of 5 June 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States concerning the manufacture, presentation and sale of tobacco products. *Official Journal L 194 :0036-0035*
130. Engström K Magnusson C Galanti MR (2010) Socio-demographic, lifestyle and health characteristics among snus users and dual tobacco users in Stockholm County, Sweden. *BMC Public.Health* 10
131. Österdahl B-G Slorach SA (1983) Volatile *N*-nitrosamines in snuff and chewing tobacco on the Swedish market. *Food Chem.Toxicol.* 21:759-762
132. Djordjevic MV Fan JR Bush LP Brunnemann KD Hoffmann D (1993) Effects of storage conditions on levels of tobacco-specific *N*-nitrosamines and *N*-nitrosamino acids in U.S. moist snuff. *J.Agric.Food Chem.* 41:1790-1794

133. Stepanov I Jensen J Hatsukami D Hecht SS (2008) New and traditional smokeless tobacco: comparison of toxicant and carcinogen levels. *Nicotine Tob.Res.* 10:1773-1782
134. Hatsukami DK Ebbert JO Feuer RM Stepanov I Hecht SS (2007) Changing smokeless tobacco products - New tobacco-delivery systems. *Am.J.Prev.Med.* 33:S368-S378
135. Anon (2011) Gothiatek Standard: Swedish Match. www.gothiatek.com
136. Holm H Jarvis MJ Russel MAH Feyerabend C (1992) Nicotine intake and dependence in Swedish snuff takers. *Psychopharmacology* 108:507-511
137. Benowitz NL (1988) Nicotine and smokeless tobacco. *CA Cancer J.Clin.* 38:244-247
138. Benowitz NL (1999) Snuff, nicotine and cardiovascular disease: Implications for tobacco control. *J.Am.Coll.Cardiol.* 34:1791-1793
139. Hukkanen J Jacob P Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol.Rev.* 57:79-115
140. Brunnemann KD Qi J Hoffmann D (2002) Chemical profile of two types of oral snuff tobacco. *Food Chem.Toxicol.* 40:1699-1703
141. Andersson G Björnberg G Curvall M (1994) Oral mucosal changes and nicotine disposition in users of Swedish smokeless tobacco products: a comparative study. *J.Oral Pathol.Med.* 23:161-167
142. Cogliano V Straif K Baan R Grosse Y Secretan B El Ghissassi F (2004) Smokeless tobacco and tobacco-related nitrosamines. *Lancet Oncol.* 5:708
143. Zheng W McLaughlin JK Gridly G et al. (1993) Cohort study of smoking, alcohol consumption, and dietary factors for pancreatic-cancer (United States). *Cancer Causes Control* 4:477-482
144. Winn DM Blot WJ Shy CM Pickle LW Toledo A Fraumeni JF (1981) Snuff dipping and oral cancer among women in the southern United States. *N.Engl.J.Med.* 304:745-749
145. Sankaranarayanan R Duffy SW Padmakumary G Day NE Padmanabhan TK (1989) Tobacco chewing, alcohol and nasal snuff in cancer of the gingiva in Kerala, India. *Br.J.Cancer* 60:638-643
146. Schildt E-B Eriksson M Hardell L Magnuson A (1998) Oral snuff, smoking habits and alcohol consumption in relation to oral cancer in a Swedish case-control study. *Int.J.Cancer* 77:341-346
147. Lewin F Norell SE Johansson H et al. (1998) Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. A population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 82:1367-1375
148. Larsson Å Axéll T Andersson G (1991) Reversibility of snuff dippers' lesion in Swedish moist snuff users: a clinical and histologic follow-up study. *J.Oral Pathol.Med.* 20:258-264
149. Andersson G Axéll T (1989) Clinical appearance of lesions associated with the use of loose and portion-bag packed Swedish moist snuff: a comparative study. *J.Oral Pathol.Med.* 18:2-7
150. Axéll TE (1993) Oral mucosal changes related to smokeless tobacco usage: research findings in Scandinavia. *Eur.J.Cancer B Oral Oncol.* 29B:299-302
151. Ye W Ekström AM Hansson L-E Bergström R Nyrén O (1999) Tobacco, alcohol and the risk of gastric cancer by sub-site and histologic type. *Int.J.Cancer* 83:223-229

152. Lagergren J Bergström R Lindgren A Nyrén O (2000) The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia. *Int.J.Cancer* 85:340-346
153. Hergens M-P Alfredsson L Bolinder G Lambe M Pershagen G Ye W (2007) Long-term use of Swedish moist snuff and the risk of myocardial infarction amongst men. *J.Int.Med.* 262:351-359
154. Teo KK Ounpuu S Hawken S et al. (2006) Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet* 368:647-658
155. Haglund B Eliasson M Stenbeck M Rosén M (2007) Is moist snuff use associated with excess risk of IHD or stroke? A longitudinal follow-up of snuff users in Sweden. *Scand.J.Public Health* 35:618-622
156. Johansson S-E Sundquist K Qvist J Sundquist J (2005) Smokeless tobacco and coronary heart disease: a 12 year follow-up study. *Eur.J.Cardiovasc.Prev.Rehabil.* 12:387-392
157. Colilla SA (2010) An epidemiologic review of smokeless tobacco health effects and harm reduction potential. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 56:197-211
158. Bolinder G Alfredsson L Englund A Defaire U (1994) Smokeless tobacco use and increased cardiovascular mortality among Swedish construction workers. *Am.J.Publ.Health* 84:399-404
159. Huhtasaari F Asplund K Lundberg V Stegmayr B Wester PO (1992) Tobacco and myocardial infarction: is snuff less dangerous than cigarettes? *BMJ* 305:1252-1256
160. Hansson J Pedersen NL Galanti MR et al. (2009) Use of snus and risk for cardiovascular disease: results from the Swedish Twin Registry. *J.Int.Med.* 265:717-724
161. Persson PG Carlsson S Svanstrom L Ostenson CG Efendic S Grill V (2000) Cigarette smoking, oral moist snuff use and glucose intolerance. *J.Int.Med.* 248:103-110
162. Norberg M Stenlund H Lindahl B Boman K Weinehall L. (2006) Contribution of Swedish moist snuff to the metabolic syndrome: A wolf in sheep's clothing? *Scand.J.Public Health* 34:276-583
163. Eliasson M Asplund K Nasic S Rodu B (2004) Influence of smoking and snus on the prevalence and incidence of type 2 diabetes amongst men: the northern Sweden MONICA study. *J.Intern.Med.* 256:101-110
164. Pauly JR Slotkin TA (2008) Maternal tobacco smoking, nicotine replacement and neurobehavioural development. *Acta Paediatr.* 97:1331-1337
165. Ernst M Moolchan ET Robinson ML (2001) Behavioral and neural consequences of prenatal exposure to nicotine. *J.Am.Acad.Child Adolesc.Psychiatry* 40:630-641
166. Lambers DS Clark KE (1996) The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin.Perinatol.* 20:115-126
167. Wikström A-K Stephansson O Cnattingius S (2010) Tobacco use during pregnancy and preeclampsia risk. Effects of cigarette smoking and snuff. *Hypertension* 55:1254-1259
168. Wikström A-K Cnattingius S Galanti MR Kieler H Stephansson O (2010) Effect of Swedish snuff (*snus*) on preterm birth. *BJOG* 117:1005-1010
169. Wikström AK Cnattingius S Stephansson O (2010) Maternal use of Swedish snuff (*snus*) and risk of stillbirth. *Epidemiology* 21:772-778

170. England LJ Kim SY Tomar SL Ray CS Gupta PC Eissenberg T (2010) Non-cigarette tobacco use among women and adverse pregnancy outcomes. *Acta Obstet.Gyn.Scan.* 89:454-464
171. England LJ Levine RJ Mills JL Klebanoff MA Yu KF Cnattingius S (2003) Adverse pregnancy outcomes in snuff users. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 189:939-943
172. Hatsukami DK Stead LF Gupta PC (2008) Tobacco addiction. *Lancet* 371:2027-2038
173. Vainio H Weiderpass E (2003) Smokeless tobacco: harm reduction or nicotine overload? *Eur.J.Cancer Prev.* 12:89-92
174. Le Houezec J McNeill A Britton J (2011) Tobacco, nicotine and harm reduction. *Drug Alcohol Rev.* 30:119-123
175. Savitz DA Meyer RE Tanzer JM Mirvish SS Lewin F (2006) Public health implications of smokeless tobacco use as a harm reduction strategy. *Am.J.Publ.Health* 96:1934-1939
176. Levy DT Mumford EA Cummings KM et al. (2004) The relative risks of a low-nitrosamine smokeless tobacco product compared with smoking cigarettes: estimates of a panel of experts. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 13:2035-2042
177. Tyczynski JE Bray F Parkin DM (2003) Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention and early detection. *Lancet Oncol.* 4:45-55
178. Rodu B Cole P (2009) Lung cancer mortality: comparing Sweden with other countries in the European Union. *Scand.J.Public Health* 37:481-486
179. Lund KE McNeill A Scheffels J (2010) The use of snus for quitting smoking compared with medicinal products. *Nicotine Tob.Res.* 12:817-822
180. Furberg H Bulik CM Lerman C Lichtenstein P Pedersen NL Sullivan PF (2005) Is Swedish snus associated with smoking initiation or smoking cessation? *Tob.Control* 14:422-424
181. Ramström LM Foulds J (2006) Role of snus in initiation and cessation of tobacco smoking in Sweden. *Tob.Control* 15:210-214
182. Foulds J Kozlowski L (2007) Snus-what should the public-health response be? *Lancet* 369:1976-1978
183. Bates C Fagerström K Jarvis MJ Kunze M McNeill A Ramström L (2003) European Union policy on smokeless tobacco: a statement in favour of evidence based regulation for public health. *Tob.Control* 12:360-367
184. Anon (1996) Human-Biomonitoring: Definition, Möglichkeiten und Voraussetzungen. *Bundesgesundhbl.* 39:213-214
185. Angerer J Ewers U Wilhelm M (2007) Human biomonitoring: state of the art. *Int.J.Hyg.Envirn.Health* 210:201-228
186. Scherer G Richter E (1997) Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): a critical reappraisal. *Hum.Exp.Toxicol.* 16:449-459
187. Goniewicz ML Eisner MD Lazcano-Ponce E et al. (2011) Comparison of urine cotinine and the tobacco-specific nitrosamine metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) and their ratio to discriminate active from passive smoking. *Nicotine Tob.Res.* 13:202-208
188. Tricker AR (2006) Biomarkers derived from nicotine and its metabolites: a review. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 22:147-175
189. Al-Delaimy WK Stampfer MJ Manson JE Willett WC (2008) Toenail nicotine levels as predictors of coronary heart disease among women. *Am.J.Epidemiol.* 167:1342-1348

190. Al-Delaimy WK Willett WC (2011) Toenail nicotine level as a novel biomarker for lung cancer risk. *Am.J.Epidemiol.* 173:822-828
191. Jacob P Hatsukami D Severson H Hall S Yu L Benowitz NL (2002) Anabasine and anatabine as biomarkers for tobacco use during nicotine replacement therapy. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11:1668-1673
192. Schütte-Borkovec K Heppel CW Heling A-K Richter E (2009) Analysis of myosmine, cotinine and nicotine in human toenail, plasma and saliva. *Biomarkers* 14:278-284
193. Carmella SG Hecht SS (1987) Formation of hemoglobin adducts upon treatment of F344 rats with the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N'*-nitrosonornicotine. *Cancer Res.* 47:2626-2630
194. Carmella SG Kagan SS Kagan M et al. (1990) Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine hemoglobin adducts in snuff dippers, smokers, and nonsmokers. *Cancer Res.* 50:5438-5445
195. Falter B Kutzer C Richter E (1994) Biomonitoring of hemoglobin adducts: aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin.Investig.* 72:364-371
196. Hecht SS (2002) Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer. *Carcinogenesis* 23:907-922
197. Hecht SS (2006) A biomarker of exposure to environmental tobacco smoke (ETS) and Ernst Wynder's opinion about ETS and lung cancer. *Prev.Med.* 43:256-260
198. Wilp J Zwickenspflug W Richter E (2002) Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem.Toxicol.* 40:1223-1228
199. Zwickenspflug W Tyroller S (2006) Reaction of the tobacco alkaloid myosmine with hydrogen peroxide. *Chem.Res.Toxicol.* 19:150-155
200. Richter E Schlöbe D Hölzle D Wilp J (2002) Comparative DNA and hemoglobin adduct formation by dietary myosmine and *N'*-nitrosonornicotine in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 365 (Suppl.1):R140
201. Schlöbe D (2003) Entwicklung einer GC/MS-Analysenmethode zur Bestimmung von 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon-abspaltenden DNA-Addukten für die Untersuchung der endogenen Nitrosierung von Myosmin bei Ratten. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
202. Kavvadias D Scherer G Cheung F Errington G Shepperd J McEwan M (2009) Determination of tobacco-specific *N*-nitrosamines in urine of smokers and non-smokers. *Biomarkers* 14:547-553
203. Hecht SS Han S Kenney PM et al. (2007) Investigation of the reaction of myosmine with sodium nitrite in vitro and in rats. *Chem.Res.Toxicol.* 20:543-549
204. Hecht SS Hatsukami DK Bonilla LE Hochalter JB (1999) Quantitation of 4-oxo-4-(3-pyridyl)butanoic acid and enantiomers of 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butanoic acid in human urine: a substantial pathway of nicotine metabolism. *Chem.Res.Toxicol.* 12:172-179
205. Lao Y Villalta PW Sturla SJ Wang M Hecht SS (2006) Quantitation of pyridyloxybutyl DNA adducts of tobacco-specific nitrosamines in rat tissue DNA by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Chem.Res.Toxicol.* 19:674-682
206. Upadhyaya P Kalscheuer S Hochalter JB Villalta PW Hecht SS (2008) Quantitation of pyridylhydroxybutyl-DNA adducts in liver and lung of F-344 rats treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of its metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chem.Res.Toxicol.* 21:1468-1476

207. Lao Y Yu N Kassie F Villalta PW Hecht SS (2007) Formation and accumulation of pyridyloxobutyl DNA adducts in F344 rats chronically treated with 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of its metabolite, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chem.Res.Toxicol.* 20:235-245
208. Lao Y Yu N Kassie F Villalta PW Hecht SS (2007) Analysis of pyridyloxobutyl DNA adducts in F344 rats chronically treated with (*R*)- and (*S*)-*N'*-nitrosonornicotine. *Chem.Res.Toxicol.* 20:246-256
209. Zhang S Wang Y Villalta PW et al. (2009) Analysis of pyridyloxobutyl and pyridyl-hydroxybutyl DNA adducts in extrahepatic tissues of F344 rats treated chronically with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chem.Res.Toxicol.* 22:926-936
210. Zhang S Wang M Villalta PW Lindgren BR Lao Y Hecht SS (2009) Quantitation of pyridyloxobutyl DNA adducts in nasal and oral mucosa of rats treated chronically with enantiomers of *N'*-nitrosonornicotine. *Chem.Res.Toxicol.* 22:949-956
211. Heppel CW (2009) Untersuchungen zur Ätiologie des ösophagealen Adenokarzinoms in Abhängigkeit zur Myosminbelastung durch die Ernährung. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
212. Heppel CW Heling A-K Richter E (2009) Ultrasensitive method for the determination of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts by gas chromatography-high resolution mass spectrometry in mucosal biopsies of the lower esophagus. *Anal.Bioanal.Chem.* 393:1525-1530
213. Kao C-Y Giese RW (2005) Measurement of N7-(2'-hydroxyethyl)guanine in human DNA by gas chromatography electron capture mass spectrometry. *Chem.Res.Toxicol.* 18:70-75
214. Schütte-Borkovec K (2008) Vorkommen und Toxikokinetik von Myosmin in Abhängigkeit von Rauchen und Ernährung. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
215. Lewalter J Gries W (2000) Hämoglobinaddukte aromatischer Amine: Anilin, *o*-, *m*- und *p*-Toluidin, *o*-Anisidin, *p*-Chloranilin, α - und β -Naphthylamin, 4-Aminodiphenyl, Benzidin, 4,4'-Diaminodiphenylmethan, 3,3'-Dichlorbenzidin. in: Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitlicher Arbeitsstoffe. Analysen im biologischen Material; pp 1-22; ed.: Greim H, D-69469 Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH
216. Hölzle D (2003) Bestimmung von DNA-Addukten tabakspezifischer Nitrosamine in Abhängigkeit von Rauchstatus und Ernährung. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
217. Foiles PG Akerkar SA Carmella SG et al. (1991) Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine DNA-adducts in smokers and nonsmokers. *Chem.Res.Toxicol.* 4:364-368
218. Hölzle D Schlöbe D Tricker AR Richter E (2007) Mass spectrometric analysis of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in human lung. *Toxicology* 232:277-285
219. Schlöbe D Hölzle D Hatz D von Meyer L Tricker AR Richter E (2008) 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in lung, lower esophagus and cardia of sudden death victims. *Toxicology* 245:154-161
220. Hecht SS Spratt TE Trushin N (1988) Evidence for 4-(3-pyridyl)-4-oxobutylation of DNA in F344 rats treated with the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N'*-nitrosonornicotine. *Carcinogenesis* 9:161-165

221. Wang M Cheng G Sturla SJ et al. (2003) Identification of adducts formed by pyridyloxobutylation of deoxyguanosine and DNA by 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a chemically activated form of tobacco specific carcinogens. *Chem.Res.Toxicol.* 16:616-626
222. Haglund J Henderson AP Golding BT Törnqvist M (2002) Evidence for phosphate adducts in DNA from mice treated with 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Chem.Res.Toxicol.* 15:773-779
223. Li L Perdigo J Pegg AE et al. (2009) The influence of repair pathways on the cytotoxicity and mutagenicity induced by the pyridyloxobutylation pathway of tobacco-specific nitrosamines. *Chem.Res.Toxicol.* 22:1464-1472
224. Phillips DH Castegnaro M (1999) Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 14:301-315
225. Arif JM Dresler C Clapper ML et al. (2006) Lung DNA adducts detected in human smokers are unrelated to typical polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem.Res.Toxicol.* 19:295-299
226. Hecht SS Carmella SG Trushin N et al. (1987) Investigations on the molecular dosimetry of tobacco-specific *N*-nitrosamines. in: *The Relevance of N-Nitroso Compounds to Human Cancer: Exposures and Mechanisms*; pp 423-429; eds: Bartsch H O'Neill IK Schulte-Hermann R; 84Lyon, International Agency for Research on Cancer
227. Prokopczyk B Leder G Trushin N et al. (2005) 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone, an indicator for 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA damage, is not detected in human pancreatic tissue. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14:540-541
228. Prokopczyk B Hoffmann D Bologna M et al. (2002) Identification of tobacco-derived compounds in human pancreatic juice. *Chem.Res.Toxicol.* 15:677-685
229. Anderson KE Hammons GJ Kadlubar FF et al. (1997) Metabolic activation of aromatic amines by human pancreas. *Carcinogenesis* 18:1085-1092
230. Pour PM Rivenson A (1989) Induction of a mixed ductal-squamous-islet cell carcinoma in a rat treated with a tobacco-specific carcinogen. *Am.J.Pathol.* 134:627-631
231. Peterson LA Ng DK Stearns RA Hecht SS (1994) Formation of NADP(H) analogs of tobacco-specific nitrosamines in rat liver and pancreatic microsomes. *Chem.Res.Toxicol.* 7:599-608
232. Frank N Wiessler M (1986) *N*-nitroso-hydroxyalkyl-alkylamine phosphate esters - a new class of *N*-nitroso compounds. *Carcinogenesis* 7:365-369
233. Wiench K Frei E Schroth P Wiessler M (1992) 1-C-glucuronidation of *N*-nitrosodiethylamine and *N*-nitrosomethyl-*n*-pentylamine *in vivo* and in primary hepatocytes from rats pretreated with inducers. *Carcinogenesis* 13:867-872
234. Routledge MN Garner RC Jenkins D Cuzick J (1992) ³²P-postlabelling analysis of DNA from human tissues. *Mutat.Res.* 282:139-145
235. Ricicki EM Soglia JR Teitel C Kane R Kadlubar F Vouros P (2005) Detection and quantification of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl adducts in human pancreas tissue using capillary liquid chromatography-microelectrospray mass spectrometry. *Chem.Res.Toxicol.* 18:692-699
236. Wang M Abbruzzese JL Friess H et al (1998) DNA adducts in human pancreatic tissues and their potential role in carcinogenesis. *Cancer Res.* 58:38-41

237. Jeyabalan J Kadlubar FF Gupta RC (2006) Lipophilic DNA adducts detected in the pancreas of cigarette smokers are unrelated to typical polyaromatic carcinogens. *Proc.Am.Ass.Cancer Res.* 47
238. Heling A-K (2009) Abhängigkeit von Addukten tabakspezifischer Nitrosamine in der Mundschleimhaut des Menschen von verschiedenen Genussformen des Tabaks, ihre Beeinflussung durch Ernährung, Alkohol und Chemopräventiva und die Überprüfung der Effekte an der Ratte. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
239. Atawodi SE Lea S Nyberg F et al. (1998) 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-hemoglobin adducts as biomarkers of exposure to tobacco smoke: validation of a method to be used in multicenter studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7:817-821
240. Branner B Kutzer C Zwickenpflug W Scherer G Heller W-D Richter E (1998) Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and nonsmoking women. *Biomarkers* 3:35-47
241. Nilsson R (2011) The molecular basis for induction of humans by tobacco specific nitrosamines. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* epub ahead
242. Palmeri A Pichini S Pacifici R Zuccaro P Lopez A (2000) Drugs in nails: physiology, pharmacokinetics and forensic toxicology. *Clin.Pharmacokinet.* 38:95-110
243. Al-Delaimy WK (2002) Hair as a biomarker for exposure to tobacco smoke. *Tob.Control* 11:176-182
244. Groner J Wadwa P Hoshaw-Woodard S et al. (2004) Active and passive tobacco smoke exposure: a comparison of maternal and child hair cotinine levels. *Nicotine Tob.Res.* 6:789-795
245. Ryu H-J Seong M-W Nam M-H Kong S-Y Lee D-H (2006) Simultaneous and sensitive measurement of nicotine and cotinine in small amounts of human hair using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 20:2781-2782
246. Yang J Hu Y Cai JB et al. (2007) Selective hair analysis of nicotine by molecular imprinted solid-phase extraction: an application for evaluating tobacco smoke exposure. *Food Chem.Toxicol.* 45:896-903
247. Gerstenberg B Schepers G Voncken P Völkel H (1995) Nicotine and cotinine accumulation in pigmented and unpigmented rat hair. *Drug Metab.Dispos.* 23:143-148
248. Wilson SE Kahn RS Khoury J Lanphear BP (2007) The role of air nicotine in explaining racial differences in cotinine among tobacco-exposed children. *Chest* 131:856-862
249. Pötsch L Skopp G Moeller MR (1997) Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Sci.Int.* 84:25-35
250. Stepanov I Feuer R Jensen J Hatsukami D Hecht SS (2006) Mass spectrometric quantitation of nicotine, cotinine, and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in human toenails. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 15:2378-2383
251. Stepanov I Hecht SS Lindgren B Jacob P Wilson M Benowitz NL (2007) Relationship of human toenail nicotine, cotinine, and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol to levels of these biomarkers in plasma and urine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16:1382-1386
252. Al-Delaimy WK Mahoney GN Speizer FE Willett WC (2002) Toenail nicotine levels as a biomarker of tobacco smoke exposure. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11:1400-1404

253. Al-Delaimy WK Willett WC (2008) Measurement of tobacco smoke exposure: comparison of toenail nicotine biomarkers and self-reports. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17:1255-1261
254. Stepanov I Hecht SS (2008) Detection and quantitation of *N*'-nitrosonornicotine in human toenails by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17:945-948
255. Benowitz NL Jacob P (1994) Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin. Pharmacol. Ther.* 56:483-493
256. Benowitz NL Kuyt F Jacob P Jones TR Osman A-L (1983) Cotinine disposition and effects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 34:604-611
257. Jarvis MJ Tunstall-Pedoe H Feyerabend C Vesey C Saloojee Y (1987) Comparison of tests used to distinguish smokers from nonsmokers. *Am. J. Publ. Health* 77:1435-1438
258. Wagenknecht LE Cutter GR Haley NJ et al. (1990) Racial differences in serum cotinine levels among smokers in the Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults Study. *Am. J. Publ. Health* 80:1053-1056
259. Vartiainen E Seppälä T Lillsunde P Puska P (2002) Validation of self reported smoking by serum cotinine measurement in a community-based study. *J. Epidemiol. Community Health* 56:167-170
260. Tricker AR (2003) Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology* 183:151-173
261. Domino EF Hornbach E Demana T (1993) The nicotine content of common vegetables. *N. Engl. J. Med.* 329:437
262. Shrivastava K Patel DK (2010) Liquid-phase microextraction combined with gas chromatography mass spectrometry for rapid determination of nicotine in one-drop of nightshade vegetables and commercial food products. *Food Chem.* 122:314-318
263. Siegmund B Leyden DE Zikulnig E et al. (2001) The contribution of dietary nicotine and dietary cotinine to salivary cotinine levels as a nicotine biomarker. *Food Chem.* 74:259-265
264. Benowitz NL Bernert JT Caraballo RS Holiday DB Wang J (2009) Optimal serum cotinine levels for distinguishing cigarette smokers and nonsmokers within different racial/ethnic groups in the United States between 1999 and 2004. *Am. J. Epidemiol.* 169:236-248
265. Remmele W (1999) Pathologie: Rechtsfragen in der Pathologie, Einführung in die bioptische Diagnostik. Herz und Gefäßsystem. Hämatologie. Milz. Thymus. Springer-Verlag GmbH, Berlin
266. Kleinsasser NH Wallner BC Harréus UA Zwickenpflug W Richter E (2003) Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. *Toxicology* 192:171-177
267. Vogt S Fuchs K Richter E (2006) Genotoxic effects of myosmine in a human esophageal adenocarcinoma cell line. *Toxicology* 222:71-79
268. Havla JB Hill CE Abdel-Rahman SZ Richter E (2009) Evaluation of the mutagenic effects of myosmine in human lymphocytes using the *HPRT* gene mutation assay. *Food Chem. Toxicol.* 47:237-241
269. Glas S Tyroller S Zwickenpflug W Steiner K Kiefer G Richter E (2007) Tissue distribution and excretion of myosmine after i.v. administration to Long-Evans rats using quantitative whole-body autoradiography. *Arch. Toxicol.* 81:151-161

270. Foth H Walther UI Kahl GF (1990) Increased hepatic nicotine elimination after phenobarbital induction in the conscious rat. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 105:382-392
271. Zwicklenpflug W Tyroller S Richter E (2005) Metabolism of myosmine in Wistar rats. *Drug Metab.Dispos.* 33:1648-1656
272. Maier M (2005) Biomonitoring der Myosminbelastung des Menschen in Muttermilch, Speichel und Plasma. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU
273. Cone EJ (1993) Saliva testing for drugs of abuse. *Ann.NY Acad.Sci.USA* 694:91-127
274. Keenan RM Hatsukami DK Pickens RW Gust SW Strelow LJ (1990) The relationship between chronic ethanol exposure and cigarette smoking in the laboratory and the natural environment. *Psychopharmacology* 100:77-83
275. Nafstad P Botten G Hagen JA et al. (1995) Comparison of three methods for estimating environmental tobacco smoke exposure among children aged between 12 and 36 months. *Int.J.Epidemiol.* 24:88-94
276. Matt GE Wahlgren DR Hovell MF et al. (1999) Measuring environmental tobacco smoke exposure in infants and young children through urine cotinine and memory-based parental reports: empirical findings and discussion. *Tob.Control* 8:282-289
277. Brandsch R (2006) Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 69:493-498
278. Wang SN Liu Z Tang HZ Meng J Xu P (2007) Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16. *Microbiology* 153:1556-1565
279. Beckett AH Gorrod JW Jenner P (1971) A possible relation between pKa₁ and lipid solubility and the amounts excreted in urine of some tobacco alkaloids given to man. *J.Pharm.Pharmacol.* 24:115-120
280. Morrical BD Zenobi R (2002) Determination of aromatic tracer compounds for environmental tobacco smoke aerosol by two step laser mass spectrometry. *Atmosph.Environ.* 36:801-811

7 Anhang

7.1 Fragebogen für die Rechtsmedizin in München

Walther Straub-Institut
Abt. Toxikologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
– Prof. Dr. Elmar Richter –



Fragebogen

Proben-Nr.: GS-Nr.: Sektionsdatum- und Uhrzeit:

Größe cm
Gewicht kg
Geburtsdatum

Raucher?	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Falls ja: Geschätzter täglicher Konsum von:	<input type="checkbox"/> Zigaretten	
	<input type="checkbox"/> Zigarren	
	<input type="checkbox"/> Pfeifentabak	
	Wie viele Jahre lang bestand der Konsum?	
Andere Form von Tabakkonsum?	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Falls ja: Geschätzter täglicher Konsum von:	<input type="checkbox"/> Schnupftabak (Anw. in d. Nase)	
	<input type="checkbox"/> Kautabak	
	<input type="checkbox"/> andere Mundtabake (Snus)	
	Wie viele Jahre lang bestand der Konsum?	
Sonstiges:	
	

Vegetarier?	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Krebserkrankungen?	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Falls ja: Welche Art von Krebs?	
Diabetiker?	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Falls ja:	<input type="checkbox"/> Typ I (juveniler Diabetes)	<input type="checkbox"/> Typ II (Altersdiabetes)

Todesursache
Todesdatum- und Uhrzeit
Auffunddatum- und Uhrzeit

Bemerkungen:

.....

.....

7.2 Fragebogen und Sammelanleitung für die Rechtsmedizin in Stockholm

Walther Straub-Institut
 Dept. of Toxicology
 Ludwig-Maximilians-Universität of Munich
 – Prof. Dr. Elmar Richter –



Questionnaire

specimen number internal section number date of section

gender	<input type="checkbox"/> male	<input type="checkbox"/> female
date of birth	
body height cm	
body weight kg	
place of residence	
last actual job	

did your relative use to smoke?	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
if so: estimated number of daily	<input type="checkbox"/> cigarettes
	<input type="checkbox"/> cigars
	<input type="checkbox"/> pipe tobacco
	for how many years did she/he smoke?	
did your relative consume smokeless tobacco?	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
if so: estimated daily consumption of	<input type="checkbox"/> snus / snuff (oral application)
	<input type="checkbox"/> nasal snuff
	<input type="checkbox"/> chewing tobacco
	for how many years did she/he consume tobacco?	

was your relative a vegetarian?	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
did your relative suffer from cancer?	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
if so: what kind of cancer?	
did your relative suffer from diabetes mellitus?	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
if so	<input type="checkbox"/> type I (juvenile-onset) <input type="checkbox"/> type II (adult-onset)	

date and time of death
date and time of finding
date when seen the last time
has there been any storage in the cooling before autopsy?	<input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no
cause of death

annotations:

Walther Straub-Institut
Abt. Toxikologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
– Prof. Dr. Elmar Richter –



Guidance for collecting tissue samples

general information:

please label all filled tubes with your internal section number to avoid any confusion

- pancreas:
 - o please take sample before opening and investigating the intestine (the sample will be less contaminated with faeces)
 - o cut sample in the size of a hazelnut from the head of the pancreas and put it into the large tube with green lid (it's labelled "pancreas")

- urine:
 - o fill about 6 ml of urine into a slender tube labelled "urine"
 - o if there's only very few urine available: fill at least 1,5 – 2 ml of urine into the tube

- toenails:
 - o please cut toenails of about four different toes and get as much as you can. (The smallest amount for performing a proper analysis is 20 mg).

After collecting the samples please put them back into the labelled delivered sachets and store them at -80°C until shipping to Munich

☺ **Many thanks to all diligent sample collectors** ☺

7.3 Tabellen

Tabelle A-1 Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin München

Probe	Raucher	Größe [cm]	Gewicht [kg]	DNA [µg]	Cotinin (Plasma) [ng/ml]	Nicotin (Plasma) [ng/ml]	Myosmin (Plasma) [ng/ml]	Cotinin (Urin) [ng/ml]	Nicotin (Urin) [ng/ml]	Myosmin (Urin) [ng/ml]	Cotinin (Zehennägel) [ng/g]	Nicotin (Zehennägel) [ng/g]	Myosmin (Zehennägel) [ng/g]
P 01	pos	175	67					72,7	53,1	0,23			
P 02	neg	186	89	278	1,1	0,2	0,00				0	141	15,0
P 03	pos	182	97	263	131,8	4,9	0,11						
P 05	neg	176	73	128	4,5	0,2	0,00				0	30	0,0
P 06	pos	179	118,9		243,1	63,9	0,81	697,9	34,9	6,67	53	0	15,0
P 07	neg	166	67	220	0,4	0,3	0,10	1,7	0,8	0,08			
P 08	pos	176	72,8	221	179,4	36,1	0,40				971	7414	373,1
P 09	neg	178	101	140	4,5	1,1	0,13				0	30	0,0
P 10	neg	175	70,2	252	0,2	0,2	0,09				53	0	0,0
P 11	pos	177	59,3					294,9	44,5	1,13			
P 12	pos	177	89	267	253,5	50,3	0,21						
P 14	neg	168	84	219	5,6	2,3	0,00	2,9	1,6	0,09			
P 15	neg	178	62	283	0,1	0,1	0,07				0	30	15,0
P 16	pos	181	78		157,3	43,9	0,54	128,1	39,1	0,74			
P 17	pos	177	89	315				283,7	24,9	3,29			
P 18	pos	176	96		392,9	48,2	0,64						
P 19	neg	167	76	85	0,0	0,6	0,26						
P 20	neg	176	85	279	1,3	0,6	0,13	0,0	0,4	0,10			
P 21	neg	168	66	129	0,5	0,9	0,10						
P 22	neg	165	88	225				22,2	1,5	0,08			
P 24	neg	173	85,5	132				1,9	3,9	0,02			
P 25	neg	175	99	152	0,0	0,1	0,05						
P 26	pos	162	34,5	287	106,4	26,1	0,36						
P 27	neg	175	80	132	0,0	0,0	0,07						
P 28	neg	188	69	200							0	0	0,0
P 29	neg	174	113	106	0,3	0,1	0,05						
P 30	pos	177	97	221	187,5	35,5	0,46	254,6	43,7	0,72			
P 31	pos	183	86	416	152,8	34,9	0,44	250,5	13,7	15,64			
P 32	pos	178	65		342,6	45,8	0,42				260	880	54,6

Tabelle A-1 Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin München, Fortsetzung 1

Probe	Raucher	Größe [cm]	Gewicht [kg]	DNA [µg]	Cotinin (Plasma) [ng/ml]	Nicotin (Plasma) [ng/ml]	Myosmin (Plasma) [ng/ml]	Cotinin (Urin) [ng/ml]	Nicotin (Urin) [ng/ml]	Myosmin (Urin) [ng/ml]	Cotinin (Zehennägel) [ng/g]	Nicotin (Zehennägel) [ng/g]	Myosmin (Zehennägel) [ng/g]
P 33	pos	174	77,5	131	142,8	27,9	0,18	235,8	51,1	1,03	0	0	0,0
P 34	neg	188	85		2,8	0,7	0,14	2,5	0,4	0,13	0	0	0,0
P 36	pos	168	84	126							305	187	15,0
P 37	pos	184	111					420,3	44,4	1,25			
P 38	pos	181	76	168	261,5	34,0	0,20						
P 39	pos	178	105	81				627,6	64,6	0,54			
P 40	neg	177	70	171							105	79	15,0
P 41	neg	167	104								110	79	15,0
P 42	neg	175	65	179							0	0	0,0
P 43	neg	175	83	142	1,0	0,9	0,15						
P 44	neg	177	75	191	0,0	0,0	0,11						
P 45	pos	173	79	227							340	861	15,0
P 46	pos	174	72		199,7	15,6	0,23						
P 47	pos	181	70	243	326,3	30,3	0,27	158,8	38,4	0,20			
P 48	pos	172	69					606,3	75,7				
P 49	pos	164	63	378	129,7	15,7	0,29						
P 50	neg	169	93	163				12,1	40,0	0,24			
P 51	neg	175	70	220	1,0	0,0	0,12						
P 52	pos	175	79,5					717,2	29,5	6,11			
P 53	pos	170	53					243,7	60,1	0,98			
P 54	neg	175	57	423	0,0	0,0	0,09						
P 55	pos	174	67	204	78,0	19,2	0,24						
P 56	pos	166	60	149				656,5	93,5	3,48			
P 57	neg	177	129		0,0	0,1	0,09				0	0	0,0
P 58	pos	178	77	79				471,7	95,5	2,41			
P 59	neg	183	99,5		0,0	0,0	0,00						
P 60	neg	163	98	146	0,0	0,4	0,10						
P 61	pos	170	55		76,6	5,9	0,12						
P 63	pos	172	64	335	178,6	23,2	0,39						

Tabelle A-1 Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin München, Fortsetzung 2

Probe	Raucher	Größe [cm]	Gewicht [kg]	DNA [µg]	Cotinin (Plasma) [ng/ml]	Nicotin (Plasma) [ng/ml]	Myosmin (Plasma) [ng/ml]	Cotinin (Urin) [ng/ml]	Nicotin (Urin) [ng/ml]	Myosmin (Urin) [ng/ml]	Cotinin (Zehennägel) [ng/g]	Nicotin (Zehennägel) [ng/g]	Myosmin (Zehennägel) [ng/g]
P 64	pos	177	56	87	58,4	3,2	0,00						
P 65	neg	183	72	300	0,0	0,9	0,13						
P 66	neg	177	95		2,0	1,2	0,07						
P 67	neg	177	96	79	0,4	0,0	0,04	1,0	0,0	0,00			
P 68	pos	178	92					512,5	91,3	3,87			
P 69	neg	173	57	210	1,1	0,7	0,15						
P 70	pos	176	64	118	50,3	13,7	0,3						
P 71	neg	176	63	157	0,0	0,0	0,12						
P 72	neg	180	91		0,0	0,4	0,30						
P 73	neg	178	81	181	0,0	0,1	0,12						
P 74	pos	178	69	311				794,7	20	4,67			
P 75	neg	163	96	122	3,4		0,12						
P 76	pos	175	62		286,6	6,2	0,34						
P 77	pos	163	60		259,5	30,1	0,41						
P 78	neg	165	79	117				5,6	7,0	0,10			
P 79	pos	180	79					369,7	74,1	2,54			
P 80	pos	179	79		284,1	39,4	0,51						
P 81	pos	179	90	188	74,1	11,0	0,16						
P 82	neg	179	83	202	0,0	0,0	0,09						
P 83	neg	170	85	75	0,0	0,0	0,00						
P 84	pos	189	143					525,8	106,8	1,61			
P 85	neg	179	125		0,0	0,7	0,13						
P 86	pos	171	58		233,3	22,0	0,49						
P 87	neg	180	58	507	0,0	0,4	0,10						
P 88	neg	175	70	201	0,0	0,0	0,00						
P 89	neg	173	82	301	0,0	0,0	0,00						
P 90	pos	163	57	211	150,9	4,2	0,21						
P 91	pos	190	112	451	144,5	13,5	0,14						
P 92	pos	164	63	74				564,8	91,9	1,42			

Tabelle A-1 Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin München, Fortsetzung 3

Probe	Raucher	Größe [cm]	Gewicht [kg]	DNA [µg]	Cotinin (Plasma) [ng/ml]	Nicotin (Plasma) [ng/ml]	Myosmin (Plasma) [ng/ml]	Cotinin (Urin) [ng/ml]	Nicotin (Urin) [ng/ml]	Myosmin (Urin) [ng/ml]	Cotinin (Zehennägel) [ng/g]	Nicotin (Zehennägel) [ng/g]	Myosmin (Zehennägel) [ng/g]
P 93	pos	171	92	155	28,0	11,2	0,09						
P 94	neg	177	127		2,6	2,1	0,10						
P 95	neg	173	89					18,5	17,4	0,14			
P 96	neg	174	55	379	0,0	0,2	0,13						
P 97	neg	168	71	339				0,0	0,0	0,08			
P 98	neg	181	91	198				0,0	1,3	0,08			
P 99	pos	181	80					416,2	41,1	1,83			
P 100	pos	180	93	208	261,6	11,9	0,16						
P 101	neg	185	86	143	0,0	0,8	0,13						
P 102	pos	186	81	82				747,8	23,4	5,91			
P 103	pos	173	62	260	45,7	2,2	0,66						
P 104	neg	178	106	170	0,1	1,0	0,08						
P 105	pos	171	89	134	88,8	28,6	0,21						

Tabelle A-2 Gewebeproben aus dem Institut für Rechtsmedizin Solna, Stockholm

Probe	♀	♂	Raucher	Snuser	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Alter [J]	DNA [µg]	Cotinin (Urin) [ng/ml]	Nicotin (Urin) [ng/ml]	Myosmin (Urin) [ng/ml]	Cotinin (Zehennägel) [ng/g]	Nicotin (Zehennägel) [ng/g]	Myosmin (Zehennägel) [ng/g]
S 001	X		neg	neg	180	62	20	180	0,0	0,0	0,11	0	0	0,0
S 002	X		pos	neg	161	58	61	156	29,8	51,2	0,34	306	673	41,8
S 003	X		pos	neg	165	95	55	204	203,5	90,6	2,77	249	1045	48,2
S 004	X		neg	neg	163	64	35	311	0,0	0,0	0,15	0	0	0,0
S 005	X		pos	pos	175	75	47	246	349,3	76,3	1,85	7239	4897	572,1
S 006	X		neg	neg	166	79	86	339	0,0	0,0	0,11	0	0	0,0
S 007	X		pos	neg	182	65	42		134,7	22,1	0,22	512	336	15,0
S 008	X		pos	pos	186	107	58	89	563,6	82,5	3,62	934	4452	222,2
S 010	X		pos	neg	170	71	19	108	311,6	76,2	3,24	738	563	0,0
S 013	X		pos	neg	173	73	63	229	598,7	76,5	3,45	5015	4381	501,9
S 016	X		neg	neg	174	78	19	58				0	69	0,0
S 020	X		neg	pos	180	67	25	203	151,2	24,0	0,21	186	471	0,0
S 021	X		pos	pos	166	78	42		386,1	130,7	0,98	752	704	0,0
S 022	X		neg	neg	167	59	72	105				0	0	0,0
S 023	X		neg	pos	191	94	26		739,4	212,0	5,59	580	572	0,0
S 024	X		pos	neg	170	83	63	215				413	3015	130,1
S 025	X		pos	pos	189	119	50		376,5	231,2	1,23	333	1312	91,1
S 026	X		neg	neg	175	94	62		0,0	0,0	0,04	0	0	0,0
S 027	X		pos	neg	181	97	56	283	432,4	156,8	2,85	2321	1119	15,0
S 041	X		pos	pos	190	108	37	52	463,3	54,9	2,44	1053	598	15,0

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Elmar Richter für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die jederzeit vorhandene Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dem Vorstand des Instituts, Herrn Professor Dr. T. Gudermann, gilt mein Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Dem gesamten Team der Sektion, insbesondere den Rechtsmedizinerinnen PD Dr. Oliver Peschel und Dr. Sebastian Kunz, sowie Fabian Kriner, danke ich für die immer freundschaftliche Unterstützung beim Sammeln der Proben und die vielen, interessanten Einblicke in ihren Arbeitsalltag.

Ein großer Dank geht nach Schweden zu Dr. Birkhild Giebe für die sorgfältige Sammlung der Gewebeproben, die Angehörigenbefragungen und vor allem für den besonders netten Kontakt und die zahlreichen schwedischen Vokabeln.

Für die kompetente und schnelle Hilfe bei kleineren und größeren Problemen mit den verwendeten GC-MS-Geräten möchte ich mich bei Herrn Dr. V. Grau und Herrn S. Lang der SMS GmbH herzlich bedanken.

Frau Brigitte Mayerhofer und Frau Eva Vetter danke ich für die große Unterstützung bei den Rauchstatusbestimmungen. Herrn Dr. C. Heppel danke ich vor allem für seine unermüdliche Hilfe mit dem Autospec. Dem gesamten Arbeitskreis, zuletzt besonders Nadine, Oehli, Brigitte, Eva und Meike, möchte ich für die immer entspannten, gemeinsamen Mittagessen danken.

Den Praktikanten Philip, Nadine, Hannah und Andreas danke ich für das Mitbringen von viel guter Laune, den gelegentlichen Tanzeinlagen zu den neuesten Hits, aber auch für ihr Interesse an den Aufgaben des Arbeitskreises.

Zum Schluss danke ich meinen Freunden und meiner Familie für so viel Verständnis, moralische Unterstützung und Motivation. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund, der mir während Studium und Promotion immer liebevoll zur Seite stand.