

---

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

**Hämoglobin- und DNA-Addukte des Humankanzerogens  
o-Toluidin nach Behandlung mit dem Lokalanästhetikum  
Prilocain**

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

vorgelegt von  
Kerstin Gaber  
aus  
München  
2006

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Richter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos  
Prof. Dr. L. von Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2006



*Meinen Eltern*



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGEN</b>		<b>IV</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Krebserkrankungen in Deutschland</b>	<b>1</b>
1.1.1	Allgemein	1
1.1.2	Harnblasenkrebs	3
<b>1.2</b>	<b>Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese</b>	<b>4</b>
<b>1.3</b>	<b>Toxikokinetik von Kanzerogenen</b>	<b>5</b>
1.3.1	Fremdstoffmetabolismus	6
1.3.1.1	Metabolische Aktivierung und Cytochrom P450	7
1.3.1.2	N-Acetyltransferasen (NAT)	8
<b>1.4</b>	<b>Erkennung von Krebsrisiken durch Biomonitoring</b>	<b>10</b>
1.4.1	Biomarker	11
1.4.2	Hämoglobinaddukte	12
1.4.3	DNA-Addukte	14
<b>1.5</b>	<b>Aromatische Amine</b>	<b>17</b>
1.5.1	Vorkommen	17
1.5.2	Untersuchte aromatische Amine	18
1.5.2.1	4-Aminobiphenyl	18
1.5.2.2	o-Toluidin	19
1.5.3	Toxizität	19
1.5.4	Metabolismus	19
<b>1.6</b>	<b>Prilocain</b>	<b>21</b>
1.6.1	Bedeutung	21
1.6.2	Struktur und Wirkungsweise von Lokalanästhetika	22
1.6.3	Metabolismus von Prilocain	23
1.6.4	Tumesenzlokalanästhesie	24
<b>1.7</b>	<b>GC-MS</b>	<b>24</b>
<b>1.8</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>27</b>
2.1.1	Geräte	27
2.1.2	Materialien	28
2.1.3	Chemikalien	29
2.1.4	Lösungen und Reagenzien	30
2.1.4.1	Standardlösungen	30
2.1.4.2	Sonstige Lösungen	30
2.1.5	Probanden	31
2.1.5.1	Patienten der HNO	31
2.1.5.2	Probanden der Prilotstudie	31

<b>2.2</b>	<b>Methode</b>	<b>31</b>
2.2.1	Gewinnung von Hämoglobinaddukten	31
2.2.1.1	Aufbereitung der Erythrozytenfraktion	31
2.2.1.2	Fällung des Hämoglobins	32
2.2.1.3	Alkalische Hydrolyse und Isolierung durch Festphasenextraktion	32
2.2.2	Gewinnung von DNA-Addukten aus Urin	33
2.2.2.1	Aufbereitung des Urins	33
2.2.2.2	Isolierung der DNA	33
2.2.2.3	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	35
2.2.2.4	Saure Hydrolyse und Isolierung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion	35
2.2.3	Derivatisierung der aromatischen Amine	36
<b>2.3</b>	<b>GC-MS-Analysen</b>	<b>37</b>
2.3.1	Chromatographische Bedingungen	37
2.3.1.1	MS-Bedingungen	37
2.3.1.2	Berechnung des Gehalts an aromatischen Aminen	38
2.3.2	Validierung	38
2.3.2.1	GC-MS-Anlage	38
2.3.2.1.1	Identifizierung der aromatischen Amine	38
2.3.2.1.2	Überprüfung der Präzision der GC-MS Anlage	38
2.3.2.1.3	Überprüfung der Geräteempfindlichkeit	39
2.3.2.1.4	Erstellung einer Kalibrierkurve für die aromatischen Amine	39
2.3.2.2	Hämoglobinproben	40
2.3.2.2.1	Erstellung einer Eichgeraden aus gepooltem Humanhämoglobin	40
2.3.2.2.2	Bestimmung der Wiederfindungsrate	41
2.3.2.3	Urin-Proben	41
2.3.2.3.1	Erstellung einer Eichgeraden aus Lachssperma-DNA	41
2.3.2.3.2	Bestimmung der Wiederfindungsrate	41
2.3.3	Statistik	42
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Analytik</b>	<b>43</b>
3.1.1	Identifizierung der aromatischen Amine	43
3.1.2	Überprüfung der Präzision der GC-MS Anlage	45
3.1.2.1	Bestimmung von Linearität und Nachweisempfindlichkeit	45
3.1.3	Methode zur Bestimmung von Hämoglobinaddukten aromatischer Amine	46
3.1.3.1	Identifizierung der aromatischen Amine in Humanblutproben	46
3.1.3.2	Linearität und Nachweisgrenze	47
3.1.3.3	Wiederfindung der internen Standards	48
3.1.4	Methode zur Bestimmung der DNA-Addukte aromatischer Amine aus Urin	48
3.1.4.1	Identifizierung der aromatischen Amine	48
3.1.4.2	Linearität und Nachweisgrenze	49
3.1.4.3	Wiederfindung der internen Standards	50
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung der Hämoglobinaddukte der HNO-Patienten</b>	<b>50</b>
3.2.1	Probanden	50
3.2.2	Bestimmung der Hämoglobinaddukte	51
3.2.2.1	Hämoglobinaddukte von o-Toluidin	51
3.2.2.1.1	Addukte vor und nach der Gabe von Prilocain	51
3.2.2.1.2	Absoluter Anstieg nach Prilocaingabe	52
3.2.2.1.3	Absoluter Anstieg in Abhängigkeit vom Raucherstatus und Geschlecht	52
3.2.2.1.4	Absoluter Anstieg in Abhängigkeit von Alter, Gewicht, Größe und BMI	53
3.2.2.1.5	Relativer Anstieg nach Prilocaingabe	53
3.2.2.2	Hämoglobinaddukte von 4-ABP	54
3.2.2.2.1	Vor und nach Gabe von Prilocain	54
3.2.2.2.2	Abhängigkeit vom Rauchstatus	55

---

<b>3.3</b>	<b>Prilotstudie</b>	<b>55</b>
3.3.1	Probanden	55
3.3.2	Bestimmung der DNA-Addukte aus Urin	56
3.3.2.1	DNA-Addukte von o-Toluidin	56
3.3.2.2	DNA-Addukte von 4-ABP	57
3.3.3	Bestimmung der Hämoglobinaddukte	57
3.3.3.1	Hämoglobinaddukte von o-Toluidin	57
3.3.3.2	Hämoglobinaddukte von 4-ABP	58
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Prilocain als Lokalanästhetikum</b>	<b>60</b>
<b>4.2</b>	<b>Hämoglobinaddukte</b>	<b>61</b>
4.2.1	Hämoglobinaddukte von o-Toluidin	61
4.2.2	Hämoglobinaddukte von 4-ABP	65
<b>4.3</b>	<b>DNA-Addukte</b>	<b>66</b>
4.3.1	Bewertung der Methode	67
4.3.2	Bewertung der Ergebnisse	68
<b>4.4</b>	<b>Risikobewertung von Prilocain</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>82</b>

## Abkürzungen

A	Ampere
AA	Aromatische Amine
ABP	Aminobiphenyl
ADI	Acceptable Daily Intake
AFMU	5-Acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil
amu	atom mass unit, Atommasseneinheit
BAT	Biologische Arbeitsplatztoleranz
CI	chemische Ionisation
cpm	counts per minute
CYP	Cytochrom P450
d	Tag
DMA	Dimethylanilin
DCM	Dichlormethan
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPM	Disintegrations per minute
EI	Elektronenstoßionisation
eV	Elektronenvolt
GC	Gaschromatograph
Hb	Hämoglobin
HBI	Hämoglobin-Bindungs-Index
HBM	Human Biomonitoring
HFBA	Heptafluorbuttersäureanhydrid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HS	Hauptstromrauch
HWZ	Halbwertszeit
I.D.	Innendurchmesser
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IARC	International Agency for Research on Cancer
ISTD	interner Standard
KG	Körpergewicht
LA	Lokalanästhetikum



---

LD <sub>50</sub>	Dosis, bei der 50% der Versuchstiere überleben
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
Lsg.	Lösung
M	Molekulargewicht
M <sup>+</sup>	Molekülion
MS	Massenspektrometer
M.W.	Mittelwert
min	Minute
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
N	Anzahl
NA	Naphthylamin
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n.d.	nicht detektierbar
Na-EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraacetat
NCI	negativ chemische Ionisierung
NO	Stickstoffmonoxid
NS	Nebenstromrauch
organ.	organisch
p.a.	zur Analyse
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
rpm	rotations per minute
R	Rest
RT	Raumtemperatur
S.D.	Standard Deviation
Sek.	Sekunden
S/N	Signal zu Rausch Verhältnis
Std.	Stunden
s.c.	subkutan
s.s.	supra solv, Reinheitsgrad für GC-MS Lösungsmittel
SIM	Single Ion Monitoring (=SIR)
TD <sub>50</sub>	Konzentration, bei der ein 50%iges Krebsrisiko besteht

SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
$t_R$	Retentionszeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
UK	United Kingdom
USA	United States of America
V	Volt
WHO	World Health Organization
1X	1-Methylxanthin
137X	1,3,7-Methylxanthin
17X	1,7-Dimethylxanthin
Zig	Zigaretten
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebserkrankungen in Deutschland

### 1.1.1 Allgemein

Neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen Krebserkrankungen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar. Abbildung 1 zeigt die Neuerkrankungen der häufigsten Krebsformen in Deutschland im Jahr 2000, die bei Männern auf ca. 200 000 und bei Frauen auf ca. 195 000 Fälle geschätzt werden. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 66 und für Frauen bei 67 Jahren [1].

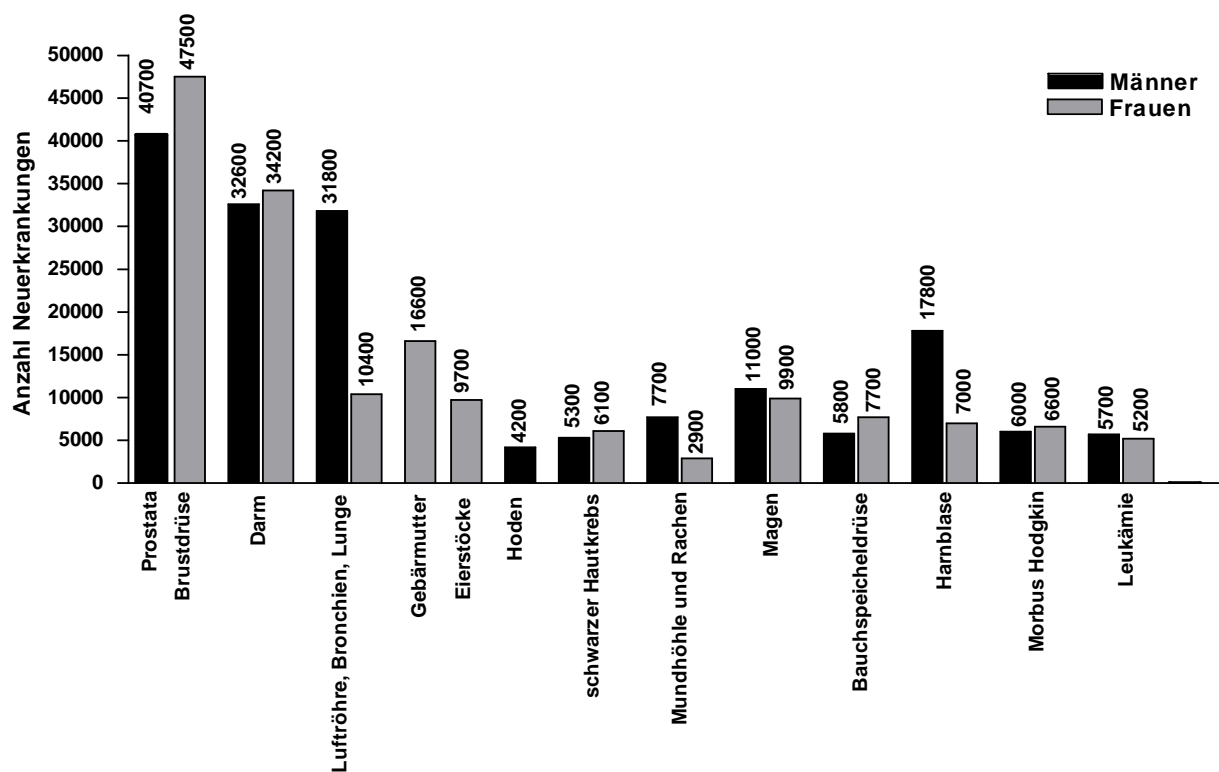
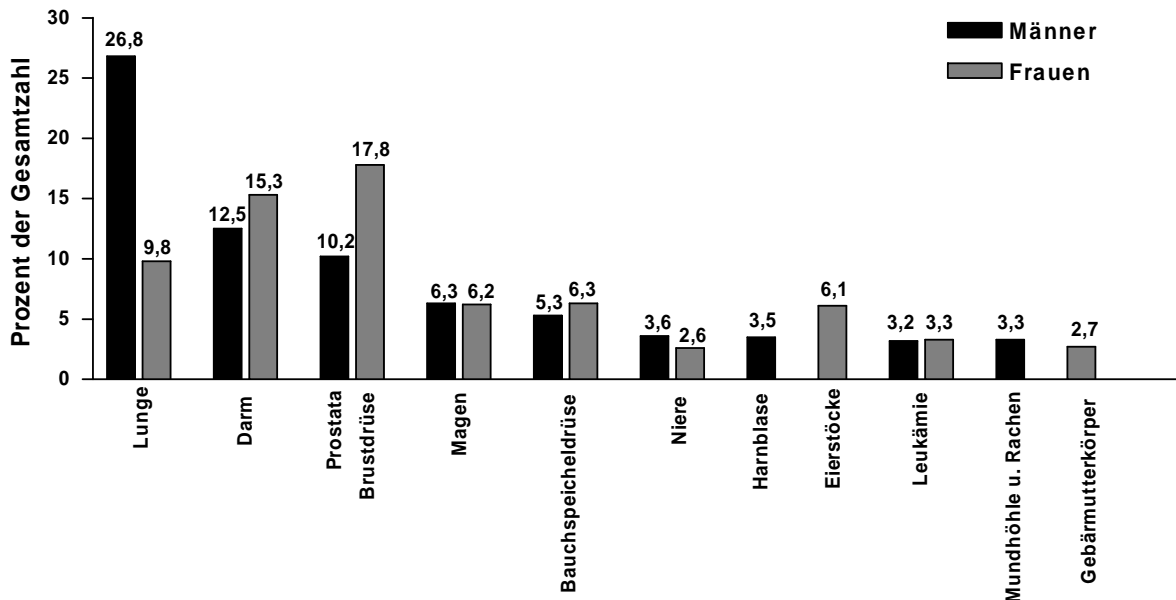


Abbildung 1: Geschätzte Zahlen der Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2000 [1]

Die Häufigkeit der Krebserkrankungen und die damit verbundene Mortalitätsrate zeigt geschlechtsspezifische Unterschiede (Abbildung 2). Bei Männern sind maligne Tumore der Lunge mit 26,8% die häufigste Todesursache, während sie bei Frauen an dritter Stelle liegen. Bei der Erhebung von Daten zu Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen ist neben der Geschlechtsspezifität auch das Verhältnis von Neuerkrankungen zu den daraus resultierenden Sterbefällen nicht zu vernachlässigen. So liegt der prozentuale Anteil der Lungenkrebsneuerkrankungen beim Mann mit 15,9% „nur“ an dritter Stelle. Am häufigsten erkranken Männer an Prostatakarzinomen (20,3%), die mit 10,2% aber nur die dritthöchste Mortalitätsrate haben.

Bei den Frauen sieht die Statistik momentan ein wenig anders aus. Hier nehmen Brustkrebs, Darmkrebs und Lungenkrebs sowohl bei den Neuerkrankungen wie auch bei den Sterbefällen die vordersten Plätze ein.

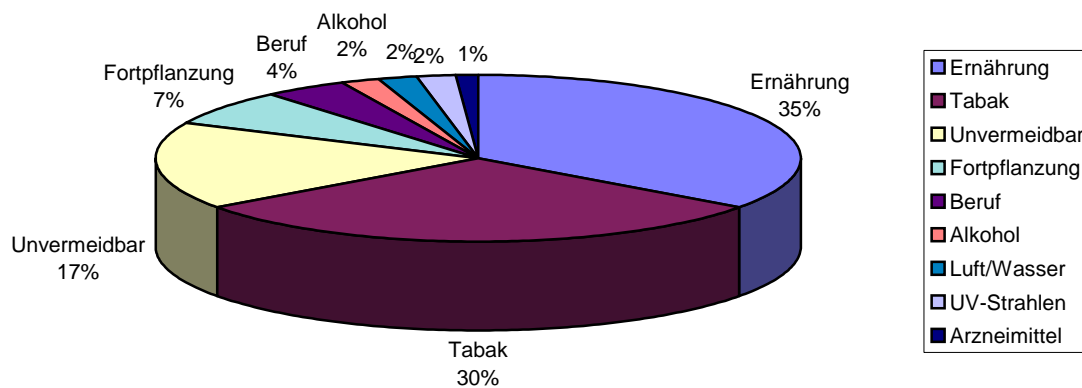


**Abbildung 2: Tumormortalitätsrate der häufigsten Krebsformen in Deutschland 2000 [1]**

Trotz intensiver Forschung und stets verbesserter Therapiemöglichkeiten sterben pro Jahr in Deutschland ca. 21000 Menschen an bösartigen Tumoren. Dies entspricht rund einem Viertel aller Todesfälle.

Bei der Beurteilung von Krebsrisiken unterscheidet man grundsätzlich zwischen vermeidbaren Faktoren und nicht vermeidbaren Risiken. Zu letzteren zählen unter anderem genetisch bedingte Krebserkrankungen (Abbildung 3).

Zu den vermeidbaren Risikofaktoren gehören vor allem das Rauchen von Zigaretten, das mehr als ein Viertel aller Krebstodesfälle verursacht und eine falsche Ernährung, die für 20 bis 40% aller Krebstodesfälle verantwortlich gemacht werden. Weitere Risikofaktoren sind übermäßiger Alkoholkonsum, Infektionen, Expositionen am Arbeitsplatz und verschiedenste Umwelteinflüsse wie UV-Strahlen und die Exposition mit chemischen Substanzen. Mittlerweile gibt es mehr als 70 Stoffe, die von der IARC (International Agency of Research on Cancer) als eindeutig kanzerogen für den Menschen eingestuft werden. Über 300 weitere Substanzen gelten als wahrscheinlich oder möglicherweise kanzerogen für den Menschen [2].



**Abbildung 3: Risikofaktoren für Krebserkrankungen**

### 1.1.2 Harnblasenkrebs

Jedes Jahr erkranken ca. 24750 Menschen in Deutschland an bösartigen Neubildungen der Harnblase. Männer sind dabei nahezu dreimal so häufig betroffen wie Frauen. Der Anteil der Neuerkrankungen liegt im Jahr 2000 mit 17800 neuen Fällen bei den Männern bei 8,9% und bei Frauen mit „nur“ 7000 Fällen bei 3,6%. Im europäischen Vergleich liegt Deutschland bei den Frauen an erster, bei den Männern an zweiter Stelle. Spanien stellt hier den europaweiten Spitzenreiter.

Wie beim Lungenkrebs ist der Zigarettenkonsum ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von Harnblasenkrebs. Bei etwa 50% der männlichen und 25% der weiblichen Blasenkrebsfälle ist das Rauchen beteiligt. Alter bei Beginn, Dauer und Intensität des Rauchens spielen dabei eine entscheidende Rolle. Bei einem Konsum von 20 und mehr Zigaretten erhöht sich das Risiko an Blasenkrebs zu erkranken um das 2,5- bis 5-fache gegenüber Nichtrauchern [3]. Insbesondere aromatische Amine wie 4-Aminobiphenyl, 2-Naphthylamin und o-Toluidin aus dem Zigarettenrauch gelten hier als Hauptursachen [4]. Jedoch bestehen auch berufsbedingte Risiken, an Harnblasenkrebs zu erkranken. Vor allem Arbeiter der Farben- und Gummiindustrie, die einer hohen Belastung mit diesen aromatischen Aminen ausgesetzt sind, gehören hier zu den Risikogruppen [5].

Die Prognose bei Harnblasenkrebs schwankt je nach Grad der Ausbreitung zum Zeitpunkt der Diagnose. Die durchschnittliche relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer bei 76%, für Frauen bei 73% [1].

## 1.2 **Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese**

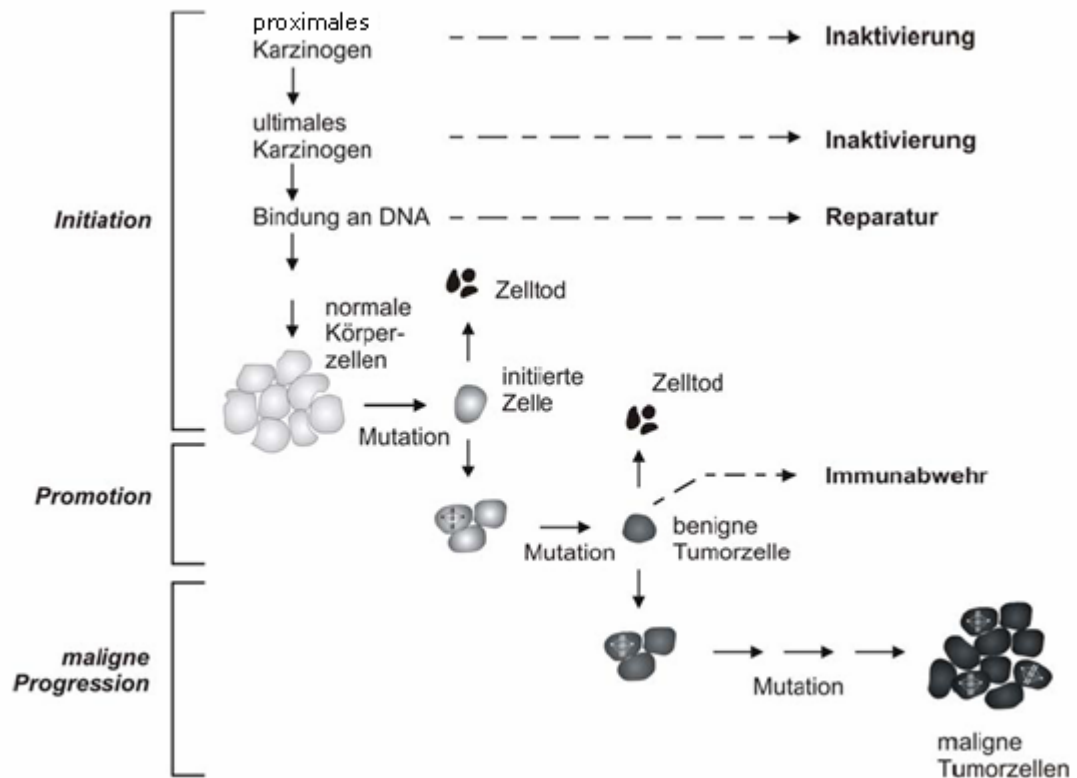
Die Entstehung von benignen (gutartigen) und malignen (bösartigen) Tumoren durch Einwirkung von Chemikalien wird als chemische Kanzerogenese bezeichnet. Man unterscheidet genotoxische und epigenetische Ursachen. Bei der genotoxischen Kanzerogenese reagieren die Substanzen direkt oder nach vorheriger Metabolisierung mit zellulären Bestandteilen, insbesondere mit der DNA und wirken somit mutagen. Zur Gruppe der genotoxischen Kanzerogene gehören unter anderem aromatische Amine, Alkylantien, polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine.

Bei der epigenetischen Kanzerogenese sind keine Reaktionen des Kanzerogens mit der DNA für die Krebsentstehung verantwortlich. Vielmehr spielen hier hormonelle Einflüsse, chronische Entzündungskrankheiten, Cytotoxizität und Tumorpromotoren eine entscheidende Rolle.

Der Wirkmechanismus der chemischen Kanzerogenese ist ein Mehrstufenprozess, der aus folgenden Schritten besteht (Abbildung 4):

- Initiation
- Promotion
- Progression

Bindet ein Kanzerogen oder dessen Metabolit kovalent an der DNA, kann dies zu einer genetischen Veränderung der Zelle führen. Dieser irreversible Vorgang wird als Initiation bezeichnet und erfolgt nur in proliferierenden Zellen. Sie kann sehr schnell erfolgen, eine kurzzeitige Exposition mit einem Kanzerogen kann bereits eine Initiation auslösen. Kann die Zellschädigung nicht repariert werden, wird sie auf die Tochterzellen übertragen. Die veränderten, prä-malignen Zellen haben einen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen, der sich jedoch ohne Promotion nicht oder nur sehr langfristig auswirkt. Bei der Tumorpromotion werden die initiierten Zellen selektiv vermehrt, was zur Vergrößerung der präneoplastischen Zellpopulationen und schließlich zu einem gutartigen Tumor führt. Dieser Vorgang kann mehrere Monate, Jahre bis Jahrzehnte dauern. Im Gegensatz zur Initiation muss bei der Promotion ein gewisser Schwellenwert überwunden werden. Eine einmalige oder kurzfristige Belastung mit einem Promotor reicht in der Regel nicht aus. Bei den Promotoren handelt es sich um Substanzen, die selber keine kanzerogene Wirkung besitzen, aber die Krebsinzidenz nach Exposition gegenüber den krebsauslösenden Stoffen erhöhen. Typische Tumorpromotoren sind beispielsweise polychlorierte Kohlenwasserstoffe.

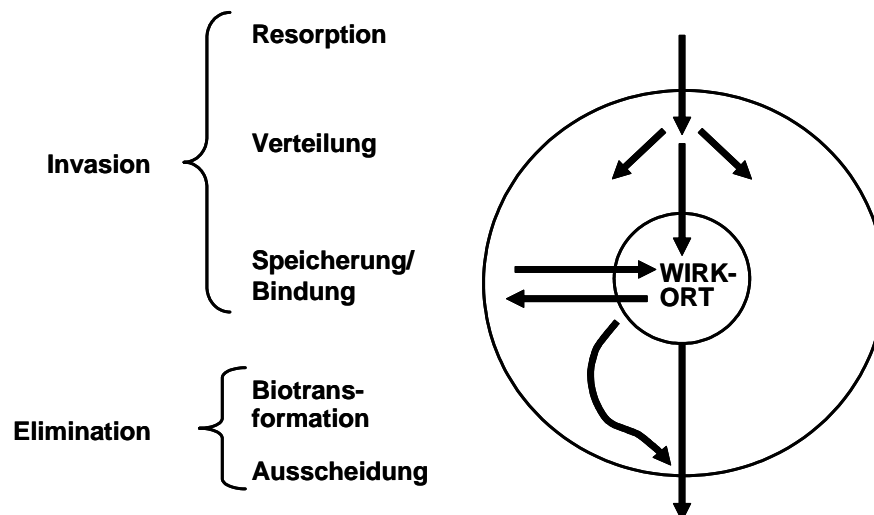


**Abbildung 4: Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese**

Als nächster Schritt der Kanzerogenese folgt die Progression. Hier findet die Umwandlung von gutartigen in bösartige Tumore statt. Während ein gutartiger Tumor verdrängend wächst und auf den Ursprungsort begrenzt bleibt, dringen bösartige Geschwülste in die Nachbarschaft ein, um dort umliegendes gesundes Gewebe zu zerstören. Bilden sie Tochtergeschwülste, spricht man von Metastasierung. Während der Progression kommt es zu weiteren Mutationen in den bereits geschädigten Zellen, die meist mit dem Verlust oder der Inaktivierung von DNA-Reparaturmechanismen verbunden sind. Die Zellen erlangen dadurch ein uneingeschränktes Wachstumspotenzial. Es kann zu Stoffwechselveränderungen zugunsten der malignen Zellen kommen, sodass mehr Energie in die Vermehrung der Zellen investiert wird, während andere Kontrollfunktionen des Organismus ausgeschaltet werden.

### 1.3 Toxikokinetik von Kanzerogenen

Unter Toxikokinetik versteht man in Anlehnung an die Pharmakokinetik die Umsetzung des Giftes im Organismus. Sie beschreibt quantitativ die Vorgänge, die bei der Invasion und Elimination eines Stoffes und seiner toxikologisch relevanten Metaboliten im Organismus ablaufen (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Toxikokinetik**

Die toxikokinetischen Parameter werden durch das so genannte „ADME“-Prinzip beschrieben. Zunächst muss der Fremdstoff resorbiert werden (**A**bsorption). Danach erfolgt durch die Aufnahme ins Blut die Verteilung in verschiedene Gewebe und Körperregionen (**D**istribution). Die meisten Fremdstoffe binden reversibel an Gewebebestandteile und Plasmaproteine. Durch den Stoffwechsel findet die meist enzymatische **M**etabolisierung (Biotransformation) des Stoffes statt, wodurch dieser durch Verbesserung seiner Hydrophilie leichter ausgeschieden werden kann (**E**limination). Der entscheidende Schritt zur Bildung von Kanzerogenen ist die kovalente Bindung des Fremdstoffes an die DNA. Diese kann direkt oder nach metabolischer Aktivierung erfolgen.

### 1.3.1 Fremdstoffmetabolismus

Beim Fremdstoffmetabolismus unterscheidet man zwei Phasen.

- Phase I

Hier liegen meist Oxidationsvorgänge zugrunde, bei denen funktionelle Gruppen eingebaut oder demaskiert werden. Diese Aufgaben werden vor allem von Oxidoreduktasen und Hydrolasen übernommen.

- Phase II

Hier findet eine Konjugation der Phase I-Metaboliten mit endogenen Molekülen statt. Die Metaboliten der Phase II werden dadurch erheblich hydrophiler als ihre Ausgangsstoffe und können so renal oder biliär ausgeschieden werden. Typische Reaktionen der Phase II sind Glucuronidierung, Sulfatierung, Glutathion-Konjugation, Acetylierung und Methylierung.



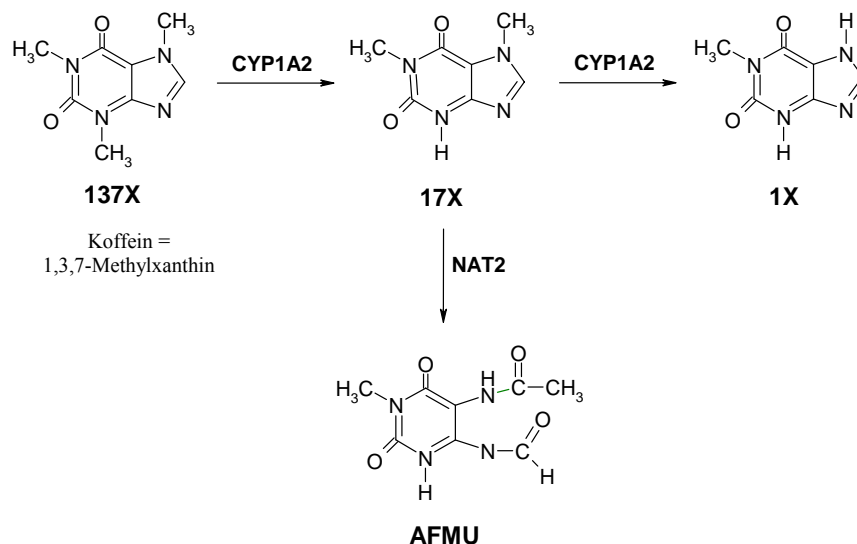
Aromatische Amine werden beispielsweise über Atemwege, Haut und den Gastrointestinaltrakt aufgenommen und im gesamten Organismus verteilt. Eine Ausscheidung erfolgt ganz überwiegend erst nach Metabolisierung über Niere und Darm. An ihrem Metabolismus sind verschiedene Enzymsysteme beteiligt. Die wichtigsten Aktivierungs- und Entgiftungsprozesse werden dabei von den Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP), Glucuronyltransferasen, Sulfatasen und den *N*-Acetyltransferasen (NAT) übernommen.

Als Ursache für eine unterschiedliche Empfindlichkeit des Menschen bei gleicher Belastung mit Kanzerogenen wird die unterschiedlichen Aktivität dieser Enzymsysteme vermutet. Diese kann genetisch bedingt sein und wird dann als Enzym polymorphismus bezeichnet.

Die Aktivitäten der Isoenzyme CYP1A2 und der NAT2 können über den Abbau von Koffein im Körper bestimmt werden, wobei das Verhältnis der verschiedenen Koffeinmetaboliten 1-Methylxanthin (1X) und 5-Acetylamin-6-formylamino-3-methyluracil (AFMU) im Urin gemessen wird. Ist das Verhältnis AFMU/1X größer 2, wird dies als hohe Aktivität der NAT2 charakterisiert. Wird dagegen Methylxanthin vermehrt gebildet, spricht dies für eine hohe Aktivität des Cytochroms P450 [6] (Abbildung 6).

### 1.3.1.1 Metabolische Aktivierung und Cytochrom P450

Das Cytochrom P450 gehört zu den wichtigsten Enzymsystemen des menschlichen Körpers. Es sind mittlerweile über 300 verschiedene Gene bekannt, die für diese Familie codieren [7].



**Abbildung 6: Koffeinstoffwechsel**

Die enzymatische Aktivierung erfolgt in einer NADPH-abhängigen Reaktion durch den Transfer eines Sauerstoffatoms, woraus sich beispielsweise eine Hydroxylierung, Epoxidierung oder Desalkylierung des zu metabolisierenden Agens ergibt.

Für den Fremdstoffwechsel sind die Familien CYP1-3 von größter Bedeutung, wobei beim Metabolismus bzw. bei der metabolischen Aktivierung der aromatischen Amine das CYP1A2 eine entscheidende Rolle spielt. Dieses Isoenzym besitzt beim Menschen etwa einen Anteil von 15% des gesamten CYP in der Leber.

Die hepatische Konzentration des CYP1A2 wird insbesondere durch exogene Faktoren beeinflusst. So wird seine Aktivität beispielsweise durch das Rauchen induziert [8]. In einer Studie mit über 800 Probanden wurde eine Erhöhung der Enzymaktivität bei Rauchern um das 1,7-fache im Vergleich zu Nichtrauchern gefunden [9]. Neben dem Einfluss von Umweltfaktoren kann die Aktivität von CYP1A2 auch von einem Polymorphismus abhängen. Für die Entstehung von Krebs durch Arylamine spielt sie eine wichtige Rolle [10]. Eine hohe Aktivität des CYP1A2 ist mit erhöhten Konzentrationen an Hämoglobinaddukten von 4-ABP verbunden, wohingegen die geringste Adduktrate bei geringer CYP1A2-Aktivität gemessen wurde [11].

#### ***1.3.1.2 N-Acetyltransferasen (NAT)***

Die *N*-Acetyltransferasen zählen zu den Phase II-Enzymen. Man unterscheidet zwischen den Isoenzymen NAT1 und NAT2. Beide spielen beim Metabolismus der aromatischen Amine eine entscheidende Rolle, wobei sie sich in ihrer Wirkung unterscheiden. Man ist lange davon ausgegangen, dass die Bildung des *N*-Hydroxylamins die entscheidende Reaktion bei der Bildung eines DNA-Adduktes ist. Heute weiß man, dass die *O*-Acetylierung des Nitrosoamins durch die NAT1 zu einem elektrophilen Agens führen kann, das ebenfalls kovalent an der DNA binden kann (siehe Kap. 1.5.4, Abbildung 11).

Die wichtigste Reaktion der NAT2 ist die Entgiftung der aromatischen Amine durch die Übertragung eines Acetylrestes auf den Stickstoff der Aminogruppe in der Leber. Im Kolon wirkt die NAT2 allerdings nicht entgiftend, sondern katalysiert die *O*-Acetylierung von *N*-Hydroxylaminen, die sich von heterozyklischen aromatischen Aminen ableiten [12]. Diese Reaktion führt nach Protonierung und Bildung eines Nitreniumions schließlich auch zur Bildung von DNA-Addukten und dient als Erklärung für die Ergebnisse molekular-epidemiologischer Untersuchungen, die eine hohe Aktivität der NAT2 mit einem erhöhten Kolonkrebsrisiko in Verbindung bringen (Abbildung 7) [13-15].

Eine Induktion der NAT durch exogene Faktoren wurde bisher nicht beschrieben. Vielmehr steht hier ein genetischer Polymorphismus im Vordergrund, der zu den wichtigsten im menschlichen Organismus gehört, die im Zusammenhang mit dem Arzneistoffwechsel stehen.

Als nach Einführung der Tuberkulosebehandlung mit Isoniazid bei einer Vielzahl der Patienten starke Nebenwirkungen auftraten, führten Evans et al. [16] dies bereits 1960 auf genetisch bedingte Unterschiede bei der metabolischen Acetylierung des Isoniazids zurück. Somit konnte hier erstmals ein kausaler Zusammenhang bezüglich interindividueller Schwankungen beim Arzneistoffwechsel hergestellt werden.

Beim Polymorphismus der NAT2 unterscheidet man zwischen schnellen und langsamen Acetylierern. Schnelle Acetylierer haben eine hohe Aktivität der NAT2. Bei langsamen Acetylierern hingegen ist die Acetylierungsaktivität vermindert. Hierbei konnten unter verschiedenen Volksgruppen große Unterschiede beim Acetyliererstatus festgestellt werden [6]. Unter den Europäern und Nordamerikanern sind 40 bis 70% langsame Acetylierer, Araber haben eine Quote von über 80% langsamer Acetylierer, während Asiaten nur zu 10-20% langsame Acetylierer sind. Die Eskimos in Kanada stellen die Bevölkerungsgruppe dar, innerhalb der die Langsamacetylierer mit 5% den geringsten Anteil haben [17].

Die toxikologische Relevanz dieses Enzym polymorphismus wird besonders beim Harnblasenkrebsrisiko sichtbar. So wird eine genetisch bedingte hohe Aktivität der NAT2 als Grund für ein vermindertes Blasenkrebsrisiko angesehen [18]. Schnelle Acetylierer weisen bei gleicher Belastung mit aromatischen Aminen durch das Rauchen weniger Hämoglobinaddukte auf [19]. In Abbildung 7 werden die Zusammenhänge zwischen Tumorerkrankung und der Aktivität von CYP und NAT zusammengefasst.

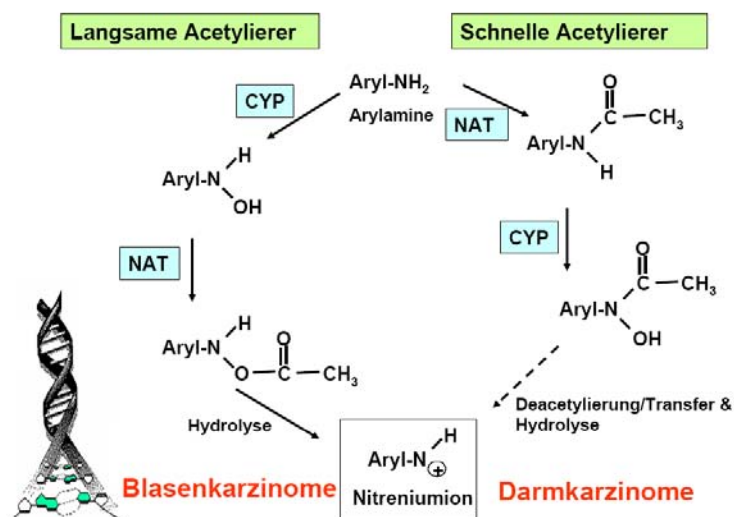


Abbildung 7: Acetyliererstatus und damit verbundenes Krebsrisiko

## **1.4 Erkennung von Krebsrisiken durch Biomonitoring**

Der Mensch ist täglich verschiedensten Fremd- und Schadstoffen ausgesetzt. Die Messung der Konzentration von Schadstoffen in der Umwelt und am Arbeitsplatz und die Festlegung von ADI- und MAK-Werten waren erste wichtige Schritte, um die Gesundheitsgefährdung des Menschen durch diese Schadstoffe zu bestimmen und zu bewerten.

Der nächste wichtige Schritt war die Einführung des so genannten Biomonitorings. Man versteht darunter die Bestimmung von Fremdstoffen und ihrer Metaboliten in Körperflüssigkeiten wie Speichel, Blut, Urin, Muttermilch und in Geweben [20]. Während beim Monitoring nur die äußere Exposition des Menschen mit gesundheitsgefährdenden Stoffen bestimmt wird, befasst sich das Biomonitoring mit der inneren Exposition. Sie entspricht der tatsächlich aufgenommenen Menge eines Stoffes, wodurch eine direkte Beziehung zwischen der äußeren Belastung und einer Gesundheitsgefährdung hergestellt werden kann.

Eine Exposition mit gesundheitsschädlichen Stoffen kann die Wahrscheinlichkeit einer Gesundheitsgefährdung erhöhen, ohne dosisabhängig Einfluss auf die Schwere der Erkrankung zu haben. In diesem Fall spricht man von einem stochastischen Effekt. Wird die Schädigung des Organismus dagegen durch die Dosis beeinflusst, nennt man dies einen deterministischen Effekt.

Man unterscheidet beim Biomonitoring zwischen Dosis- und Effektmonitoring, wobei das Effektmonitoring wiederum in biologisches und biochemisches Effektmonitoring unterteilt wird.

Das Dosismonitoring befasst sich mit dem Nachweis von Schadstoffen und ihrer Metaboliten in biologischen Materialien wie beispielsweise Plasma oder Urin. Beim biochemischen Effektmonitoring werden Reaktionsprodukte mutagener Stoffe mit Proteinen und DNA erfasst. Erste Veränderungen im Organismus in Form von chromosomalen oder enzymatischen Veränderungen werden beim biologischen Effektmonitoring nachgewiesen.

Das Biomonitoring hat in der Umwelt- und Arbeitsmedizin mittlerweile einen großen Stellenwert. So hat die Kommission „Human-Biomonitoring“ des Bundesumweltamtes bereits für eine Reihe von Stoffen so genannte HBM-Werte (Human-Biomonitoring-Werte) festgelegt. Man unterscheidet dabei zwischen HBM-Wert I und HBM-Wert II. Wird der HBM-Wert I unterschritten, ist keine Gesundheitsgefährdung zu erwarten. Bei einer Überschreitung des HBM-Wert II ist dagegen mit einer gesundheitlichen Beeinträchtigung bei Exposition zu rechnen. Für Stoffe, deren Werte im Bereich zwischen HBM I und II liegen, empfiehlt die Kommission Human-Biomonitoring eine erhöhte Aufmerksamkeit bei Exposition des Men-

schen. Gegebenenfalls sollten Maßnahmen zur Verminderung der Belastung ergriffen werden. Des Weiteren ist die Suche nach möglichen Expositionsquellen von besonders großer Bedeutung.

Anhand der Bestimmung der so genannten „Target-Dose“, einem weiteren wichtigen Schritt in der Arbeits- und Umweltmedizin, wird die biologisch wirksame Dosis ermittelt. Während bei akut wirksamen Stoffen die Konzentration im Blut mit dem biologischen Effekt korreliert werden kann, wird die biologisch wirksame Dosis bei genotoxischen Stoffen mittels der Reaktionsprodukte der Metaboliten mit der DNA oder mit anderen Makromolekülen wie z.B. Proteinen bestimmt [21].

#### 1.4.1 Biomarker

Die durch das Biomonitoring erfassten Parameter werden als Biomarker bezeichnet. Dabei unterscheidet man je nach Anwendungsbereich verschiedene Gruppen (Tabelle 1).

Anhand eines **Biomarkers der Dosis** kann lediglich eine Aussage über eine mögliche Exposition des Menschen mit Schadstoffen gemacht werden. Dazu zählen vor allem die Bestimmung von Schadstoffen und deren Metaboliten in Urin, Plasma oder Speichel.

Im Gegensatz dazu kann über die Erfassung von **biochemischen Biomarkern** wie z.B. Hämoglobin- oder DNA-Addukte eine mögliche Beanspruchung des Individuums durch die Exposition angezeigt werden. Sie zählen daher zu den Biomarkern des Effekts.

Ein eindeutiger Effekt wird durch die **biologischen Biomarker** nachgewiesen. Hier sind Schädigungen des Erbguts in Form von chromosomalen Veränderungen wie beispielsweise Schwesterchromatidaustausch, Mikrokerne, Deletionen und andere Mutationen zu nennen.

Die **Biomarker der Empfindlichkeit** berücksichtigen die unterschiedliche Suszeptibilität der einzelnen Individuen, die z.B. auf Enzym polymorphismen beruhen können. Anhand der Bestimmung dieser Marker wird zudem die Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen ermittelt, die ein erhöhtes Krebsrisiko signalisieren können.

**Tabelle 1: Einteilung der Biomarker nach den messbaren Endpunkten im Metabolismus des Fremdstoffes**

<b>Biomarker der Dosis</b>	Konzentrationsbestimmung des Fremdstoffes oder seiner Metaboliten in biologischem Material (z. B.: Haare, Blut, Urin, Speichel, Muttermilch)
<b>Biomarker des Effekts</b>	<p>Biochemische Biomarker</p> <p>Bestimmung von Fremdstoffen durch Isolierung von Protein- oder DNA- Addukten</p> <p>Biologische Biomarker</p> <p>Bestimmung der Schädigung (Chromosomenschäden, Mutationen, enzymatische Veränderungen)</p>
<b>Biomarker der Empfindlichkeit</b>	Nachweis von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen, Bestimmung der Enzymaktivität

#### 1.4.2 Hämoglobinaddukte

Hämoglobinaddukte (Hb-Addukte) aromatischer Amine werden im biochemischen Monitoring als so genannte Effektmarker eingesetzt. Sie sind selbst zwar nicht toxisch, werden aber als Surrogatmarker für genotoxische Schäden angesehen, weil sie ein Maß für die Aktivierung eines Kanzerogens darstellen und häufig in guter Korrelation zu DNA-Addukten stehen [22]. Durch Bestimmung der Hb-Addukte können somit erste Abschätzungen auf ein evtl. vorhandenes Krebsrisiko gemacht werden. Dies ist möglich bei Stoffen, bei denen man aus dem Anteil der aufgenommenen Dosis, der am Hämoglobin gebunden ist, auf ein Krebsrisiko schließen kann. Im Tierversuch wird dazu die  $TD_{50}$  bestimmt, diejenige Adduktkonzentration, die zu einem 50%igen Krebsrisiko bei den Versuchstieren führt.

Zudem zeigt sich ein vorliegender Enzym polymorphismus ebenfalls in der Hb-Adduktrate. So konnten bei langsamen Acetylierern bei gleicher Belastung wesentlich mehr Hb-Addukte aromatischer Amine gefunden werden als bei schnellen Acetylierern [23].

Der Zeitpunkt der Probenahme ist bei der Bestimmung von Hb-Addukten weit weniger kritisch als bei den meisten anderen Biomarkern. Dies ist auf die geringe Eliminations-

geschwindigkeit der Addukte zurückzuführen, die einerseits auf der fehlenden Reparatur, andererseits auf der 120-tägigen Lebensdauer eines Erythrozyten beruht. Dadurch können bis zu vier Monate zurückliegende Expositionen nachgewiesen werden [24]. Andere Proteinaddukte wie beispielsweise die des Albumins haben dagegen nur eine Lebensdauer von 40–80 Tagen. Somit können hiermit nur Expositionen über einen kürzeren Zeitraum bestimmt werden [25].

Des Weiteren sind Hb-Addukte leicht zugänglich und in relativ großen Mengen verfügbar. Aus einem mL Blut können 120-160 mg Hämoglobin isoliert werden.

DNA-Addukte aus nicht invasiven Geweben hingegen sind nur in geringen Mengen zu isolieren. Zudem ist die DNA der meisten Zielorgane nur im Rahmen einer Biopsie, oder bei der Autopsie von Operationen erhältlich.

Hb-Addukte zeichnet außerdem eine hohe chemische Stabilität *in vivo* aus, und sie unterliegen im Gegensatz zu DNA-Addukten keinem Reparaturmechanismus. Im Rahmen einer chemischen Analyse können sie leicht abgespalten und aufgearbeitet werden. Bei den abgespaltenen Produkten kann es sich nicht nur um Metaboliten der Kanzerogene handeln, sondern wie im Falle der Arylamine auch um die entsprechenden Ausgangssubstanzen.

Das Ausmaß, mit dem ein Stoff am Hämoglobin kovalent bindet, wird anhand des Hb-Bindungsindex (HBI) definiert:

$$HBI = \frac{\text{an Hämoglobin gebundenen Substanzmenge (mmol)}}{Hb(\text{mol}) \times \text{Dosis (mmol/kgKG)}}$$

Der HBI gibt dabei die Menge gebildeten Addukts pro einmal verabreichter Dosis an [26].

Die Verwendung von Hb-Addukten als Biomarker erlangt immer größere Bedeutung. So wurden beispielsweise Hämoglobinaddukte als Grundlage für die Erhebung eines biologischen Arbeitstoleranzwertes (BAT) für Anilin und Nitrobenzol herangezogen [27].

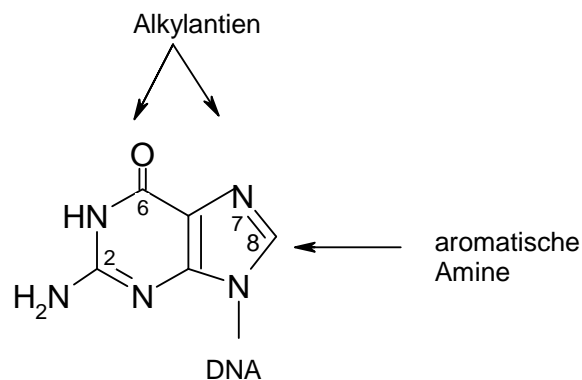
Neben den aromatischen Aminen werden auch Hb-Addukte von Alkylantien und Nitrosaminen in der Arbeits- und Umweltmedizin zur Untersuchung von Expositionen verwendet. Man ist außerdem bestrebt, das Anwendungsspektrum für Hb-Addukte auszuweiten und weitere Methoden zur Erfassung von Addukten anderer gesundheitsschädlicher Substanzen zu entwickeln.

Allerdings sieht die Kommission Human-Biomonitoring des Bundesumweltamtes die Bedeutung der Hb-Addukte im Bereich der Krebsforschung sehr kritisch. Nach Auffassung der Kommission können Hb-Addukte keine Rückschlüsse auf ein absolutes Krebsrisiko geben.

Werden jedoch bei belasteten Personen erhöhte Addukte festgestellt, sollte dies als Indiz für einen Handlungsbedarf zur Reduzierung der Expositionsquellen und zur Festlegung von maximalen Belastungswerten genommen werden [28].

### 1.4.3 DNA-Addukte

Kanzerogene können nach metabolischer Aktivierung kovalent an die DNA binden und somit ein DNA-Addukt bilden. Die Bindung erfolgt überwiegend am Guanin, wobei der Angriffspunkt von der Struktur des Kanzerogens abhängig ist. So binden beispielsweise Alkylantien verstärkt an der N7- und O6-Position, während die aromatischen Amine hauptsächlich an der C8-Position binden (Abbildung 8) [29].



**Abbildung 8: Angriffspunkte verschiedener Kanzerogene am Guanin (nach Beach und Gupta [29])**

Die Bildung von DNA-Addukten gilt als erster, wichtiger Schritt in der chemischen Kanzerogenese [30]. So kann mit Hilfe ihrer Bestimmung nicht nur eine Belastung des menschlichen Organismus mit einem krebserregenden Fremdstoff nachgewiesen werden, sondern vielmehr erste Veränderungen des Erbgutes und ein damit verbundenes Krebsrisiko abgeschätzt werden. Obwohl sie im Gegensatz zu Hb-Addukten einem Repair-Mechanismus unterliegen, können sie aufgrund einer fehlerhaften DNA-Replikation zu Mutationen führen.

Inwiefern ein Zusammenhang zwischen der Exposition mit einem Kanzerogen und einem möglichen Tumorrisiko besteht, hängt allerdings nicht alleine von der DNA-Adduktbildung ab. Dies trifft vor allem für Stoffe zu, die direkt, ohne vorherige Metabolisierung, mit der DNA interagieren. So konnten beispielsweise DNA-Addukte von Ethylen- und Propylenoxid auch in Geweben gefunden werden, die nicht Zielorgane für durch diese Stoffe ausgelöste Tumoren sind [31].

Häufig besteht jedoch ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Hb- und DNA-Addukten außerhalb der Zielorgane und den relevanten Addukten in den Zielorganen. So



wurden bei Blasenkrebspatienten wesentlich höhere Level an DNA-Addukten aromatischer Amine gefunden als bei gesunden Patienten [32]. Ebenso konnten bei „gesunden“ Rauchern ähnliche Adduktkonzentrationen festgestellt werden wie bei an Blasenkrebs erkrankten Rauchern. Raucher mit hohen Adduktraten in Leukozyten-DNA erkrankten in der Nachbeobachtungszeit von 13 Jahren dreimal häufiger an Lungenkrebs als Rauchern mit weniger DNA-Addukten [33]. Obwohl Leukozyten nicht das Zielgewebe für Krebs durch Zigarettenrauch repräsentieren, konnte hier dennoch ein quantitativer Zusammenhang zwischen DNA-Addukten und Tumoren festgestellt werden. Auch wenn dies nicht immer der Fall ist, wie z.B. in der Studie von Hou et al. [34], so ist die Bestimmung von DNA-Addukten aus Blutzellen, Schleimhautzellen oder Urin eine sinnvolle Alternative zur Gewinnung der Addukte aus Zielorganen. Denn diese können meist nur durch Biopsien oder Autopsien gewonnen werden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um besser beurteilen zu können, welchen relativen Nutzen die Bestimmung von Hb- und DNA-Addukten, aus Geweben, die kein Zielgewebe darstellen, für die frühzeitige Erkennung von Krebsrisiken hat.

Für die Analyse von DNA-Addukten sind zahlreiche verschiedene Nachweismethoden entwickelt worden. Zu den wichtigsten und meist etablierten Methoden gehören:

- ***Fluoreszenzspektroskopie***

Bei der Fluoreszenzspektroskopie ist es möglich, sowohl qualitative wie auch quantitative Aussagen über die zu untersuchenden Stoffe zu machen. Es werden nur kleine Mengen an Substanz benötigt und eine intensive Aufreinigung ist nicht notwendig. Allerdings ist die Voraussetzung für die Verwendung dieser Methode die Fluoreszenz der nachzuweisenden Substanzen, wodurch ihre Einsatzmöglichkeiten sehr begrenzt sind. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei bis zu 1 Addukt in  $10^8$  Nukleotiden. Neue Entwicklungen zielen darauf ab, die Nukleotide nach enzymatischem Verdau der DNA mit fluoreszierenden Gruppen zu markieren und danach chromatographisch zu trennen, z.B. mit der hochsensitiven Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenz [35,36].

- ***Immunoassays***

Immunoassays unter Verwendung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern werden bereits seit langer Zeit zur Analyse von DNA-Addukten verwendet. So beispielsweise auch zum Nachweis von 4-ABP-Addukten. Diese Methode kann sowohl zur Strukturanalyse wie auch zur quantitativen Analyse verwendet werden. Ihre Empfindlichkeit liegt bei 1 Addukt in  $10^7$  Nukleotiden bei Einsatz von 25  $\mu\text{g}$  DNA. Die zur DNA-Addukt-Analyse eingesetzten

Methoden sind RIA (Radioimmunoassay) und der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) [37,38]. Eine weitere Einsatzmöglichkeit besteht im semiquantitativen Nachweis nach Anfärben in Gewebeschnitten durch die Histochemie.

- ***<sup>32</sup>P-Postlabeling***

Das <sup>32</sup>P-Postlabeling ist eine äußerst empfindliche Methode zur Messung von Fremdstoffen, die kovalent an der DNA binden. Sie wurde Anfang der 80er Jahre von Reddy, Gupta und Randerath entwickelt [39]. Die DNA wird dabei zu 3'-Mononukleotiden enzymatisch verdaut. Diese werden enzymatisch mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP phosphoryliert und damit radioaktiv markiert. Es folgt die Abtrennung der nicht umgesetzten Radioaktivität und soweit möglich der markierten normalen, d.h. adduktfreien, Nucleotide. Die Auftrennung der verschiedenen Addukte erfolgt schließlich durch verschiedene chromatographische Methoden. Dabei steht nach wie vor die Dünnschichtchromatographie im Vordergrund [40]. Mittlerweile existieren mehrere Modifikationen der Methode [41], die für die Trennung der Addukte auch die HPLC [42] und die Kapillarelektrophorese [43] verwenden. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei 1-10 Addukten in 10<sup>10</sup> Nukleotiden bei Verwendung von 10  $\mu$ g DNA [29]. In Umweltproben gelang es mit dieser Methode allerdings noch nicht, die chemischen Struktur von DNA-Addukten aufzuklären [42,44].

- ***GC-MS-Analyse***

Die Bestimmung der DNA-Addukte per GC-MS-Analyse basiert auf der hydrolytischen Spaltung des Addukts, gefolgt von einer Aufreinigung und gegebenenfalls einer Derivatisierung. Das isolierte Agens wird per GC-MS anhand der Retentionszeit und seines charakteristischen Spektrums analysiert. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass keine Aussagen über die Struktur des Addukts gemacht werden können. Sie dient aber aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit sehr gut zur quantitativen Analyse. Es kann je nach eingesetzter Menge DNA zwischen 1 Addukt in 10<sup>6</sup> Nukleotiden und 1 Addukt in 10<sup>9</sup> Nukleotiden nachgewiesen werden [38].

- ***LC-MS-Analyse***

Die LC-MS ist die Kopplung von analytischer HPLC mit einem Massenspektrometer. Es handelt sich dabei um eine hoch sensitive Methode mit der neben der Quantifizierung auch die Strukturaufklärung von organischen Substanzen betrieben werden kann. Obgleich diese Methode zur Charakterisierung unbekannter DNA-Addukte bereits erfolgreich herangezogen wird, ist sie für die meisten Addukte noch nicht routinemäßig einsetzbar, weil zur

Bestimmung von DNA-Addukten zu große DNA-Mengen erforderlich sind, die häufig 300 µg überschreiten. Die Nachweisempfindlichkeit liegt dabei bei 1 Addukt in 10<sup>8</sup> Nukleotiden [45].

## 1.5 Aromatische Amine

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Biomonitoring die Belastung des Menschen mit aromatischen Aminen untersucht. Aromatische Amine sind durch eine exozyklische Aminogruppe an aromatischen Ringsystemen gekennzeichnet (Abbildung 9).

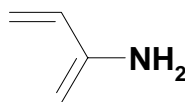


Abbildung 9: Grundstruktur der aromatischen Amine

### 1.5.1 Vorkommen

Aromatische Amine gelten als wichtige Ausgangs- und Zwischenstoffe der chemischen Industrie bei der Herstellung von Farbstoffen, Pigmenten und Pflanzenschutzmitteln. Auch in der pharmazeutischen Industrie spielen sie als Arzneimittel oder in der Synthese von Arzneimitteln eine große Rolle [12].

Aromatische Amine entstehen auch bei Erhitzung und Verbrennung organischen Materials. Im Zigarettenrauch können eine Vielzahl von aromatischen Aminen nachgewiesen werden. Die Arylamine sind sowohl im Haupt- als auch im Nebenstromrauch zu finden [46-48]. Dadurch werden nicht nur die Raucher selbst, sondern auch Passivraucher mit aromatischen Aminen belastet [49].

Die Konzentration der aromatischen Amine im Tabak ist abhängig von der verwendeten Tabaksorte. So findet man in dunklem Tabak, der in afrikanischen und arabischen Ländern und im südlichen Europa verwendet wird, höhere Konzentrationen an aromatischen Aminen als in hellem Tabak, der in den USA und den nördlichen europäischen Staaten handelsüblich ist [50].

Als 1987 Bryant et al. [51] den Nachweis erbrachten, dass Raucher im Gegensatz zu Nichtrauchern 5-fach höhere Hb-Addukte von 4-ABP haben, wurde zunächst angenommen, dass das Rauchen die Hauptbelastungsquelle mit aromatischen Aminen ist. Allerdings konnten auch bei Nichtrauchern erhöhte Adduktraten gefunden werden [52,53]. Da das Passivrauchen aber nur ca 10% der Belastung bei den Nichtrauchern erklärt, muss es sich beim Rest um eine Basisbelastung handeln. So gelangte man zu der Annahme, dass neben dem Rauchen noch

andere Belastungsquellen für die Exposition der Bevölkerung verantwortlich gemacht werden müssen [54].

Der Gebrauch von Haarfärbemittel beispielsweise steht im begründeten Verdacht, eine weitere Belastungsquelle zu sein [23,55-57]. Auch beim Erhitzen von Speiseöl werden aromatische Amine gebildet [58]. Es konnten zudem aromatische Amine in Außen- und Innenraumluft in verschiedenen Gegenden Italiens nachgewiesen werden [59]. Auch wurden bei der Bestimmung von Hb-Addukten bei Kindern verschiedener Gegenden Deutschlands regionale Unterschiede festgestellt [60]. Die überraschend hohen Adduktraten von 4-ABP bei Ratten sind wahrscheinlich durch eine Futtermittelbelastung zu erklären [61].

## 1.5.2 Untersuchte aromatische Amine

Zu den im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten aromatischen Aminen gehören 4-Aminobiphenyl (4-ABP) und o-Toluidin (Abbildung 10).

### 1.5.2.1 4-Aminobiphenyl

4-Aminobiphenyl gehört zu den so genannten bizyklischen aromatischen Aminen. Es erzeugt nachweislich nicht nur im Tierversuch, sondern auch beim Menschen Blasenkrebs und wird daher sowohl von der IARC der WHO in der Gruppe 1 der kanzerogenen Stoffe als auch in der MAK-Liste der DFG im Abschnitt III in der Kategorie 1 als „eindeutig krebserregend beim Menschen“ geführt [2,27,62].



**Abbildung 10: Struktur der untersuchten aromatischen Amine**

Als Hauptbelastungsquelle von 4-ABP gilt heute immer noch das Rauchen. Es kann sowohl im Haupt- wie im Nebenstrom von Zigaretten nachgewiesen werden [63]. Signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern konnten sowohl bei Hb-Addukten wie auch bei DNA-Addukten von 4-ABP nachgewiesen werden [49,64]. Deshalb gilt 4-ABP heute als **die** Substanz, wenn es darum geht, einen Zusammenhang zwischen dem Rauchen und einem Krebsrisiko zu zeigen.

### 1.5.2.2 *o*-Toluidin

Auch das monozyklische aromatische Amin *o*-Toluidin steht im Verdacht nicht nur im Tierversuch, sondern auch beim Menschen Blasenkrebs zu erzeugen [65]. Markowitz et al. [66] konnten in einer Studie mit Arbeitern einer Chemiefabrik beweisen, dass gehäufte Fälle von Blasenkrebs mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Exposition der Arbeiter mit *o*-Toluidin zurückzuführen sind. Erhöhte Hb-Addukte anderer blasenkanzerogener Arylamine wie 4-ABP konnten bei den Arbeitern nicht festgestellt werden [67,68].

*o*-Toluidin wird allerdings momentan von der IARC nur in Gruppe 2A bzw. von der DFG im Abschnitt III in Kategorie 2 als „wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen“ eingeteilt [2,27]. Eine entsprechende Aufnahme in die höchste Kategorie der kanzerogenen Stoffe wird vermehrt diskutiert. Es fehlen allerdings nach Angaben der IARC noch entsprechende Studien, die eine eindeutige blasenkanzerogene Wirkung für den Menschen belegen können.

Im Gegensatz zu 4-ABP spielt das Rauchen als Belastungsquelle für *o*-Toluidin eine untergeordnete Rolle. In den vergangenen Jahren konnten anhand der Hb-Addukte nur geringe bis keine Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern im Blut festgestellt werden [49].

### 1.5.3 Toxizität

Die krebserregende Wirkung aromatischer Amine ist seit Ende des 19. Jahrhunderts bekannt. Erste Fälle von Blasenkrebs in einer Farbenfabrik führte Rehn bereits 1895 auf die Exposition der Arbeiter mit Anilin zurück. Heute weiß man, dass nicht das schwach kanzerogene Anilin, sondern vielmehr Verunreinigungen und Begleitstoffe wie 2-Naphthylamin, 4-ABP und Benzidin Ursache für die Erkrankungen waren [69-71].

Neben der chronischen Toxizität haben aromatische Amine auch eine akut toxische Wirkung. Ausgelöst durch die Reaktion des Hydroxylamins, einer metabolischen Zwischenstufe der aromatischen Amine, zum Nitrosoamin im Blut (Abbildung 11), wird Hämoglobin zum Methämoglobin oxidiert. Dies besitzt nicht mehr die Fähigkeit zur Bindung von Sauerstoff. Daraus resultiert ein Sauerstoffmangel im Blut. Eine Methämoglobinrate von weniger als 20% wird meist problemlos vertragen, sind jedoch mehr als 50% des Hämoglobins zu Ferrihämoglobin oxidiert, kann dies für den Menschen lebensbedrohlich sein.

### 1.5.4 Metabolismus

Der Metabolismus der aromatischen Amine wird anhand des 4-ABP (Abbildung 11) beschrieben. In der Leber erfolgt zunächst über das CYP1A2 eine metabolische Aktivierung durch

*N*-Oxidation zum *N*-Hydroxylamin. In der Blase wird das Hydroxylamin direkt oder nach einer NAT1-katalysierten *O*-Acetylierung durch den sauren pH-Wert des Harns protoniert. Nach Abspaltung von Wasser entsteht das reaktive Nitreniumion, das in einer elektrophilen Additionsreaktion am Guanin der urothelialen DNA in Position 8 bindet und somit ein stabiles DNA-Addukt bildet.

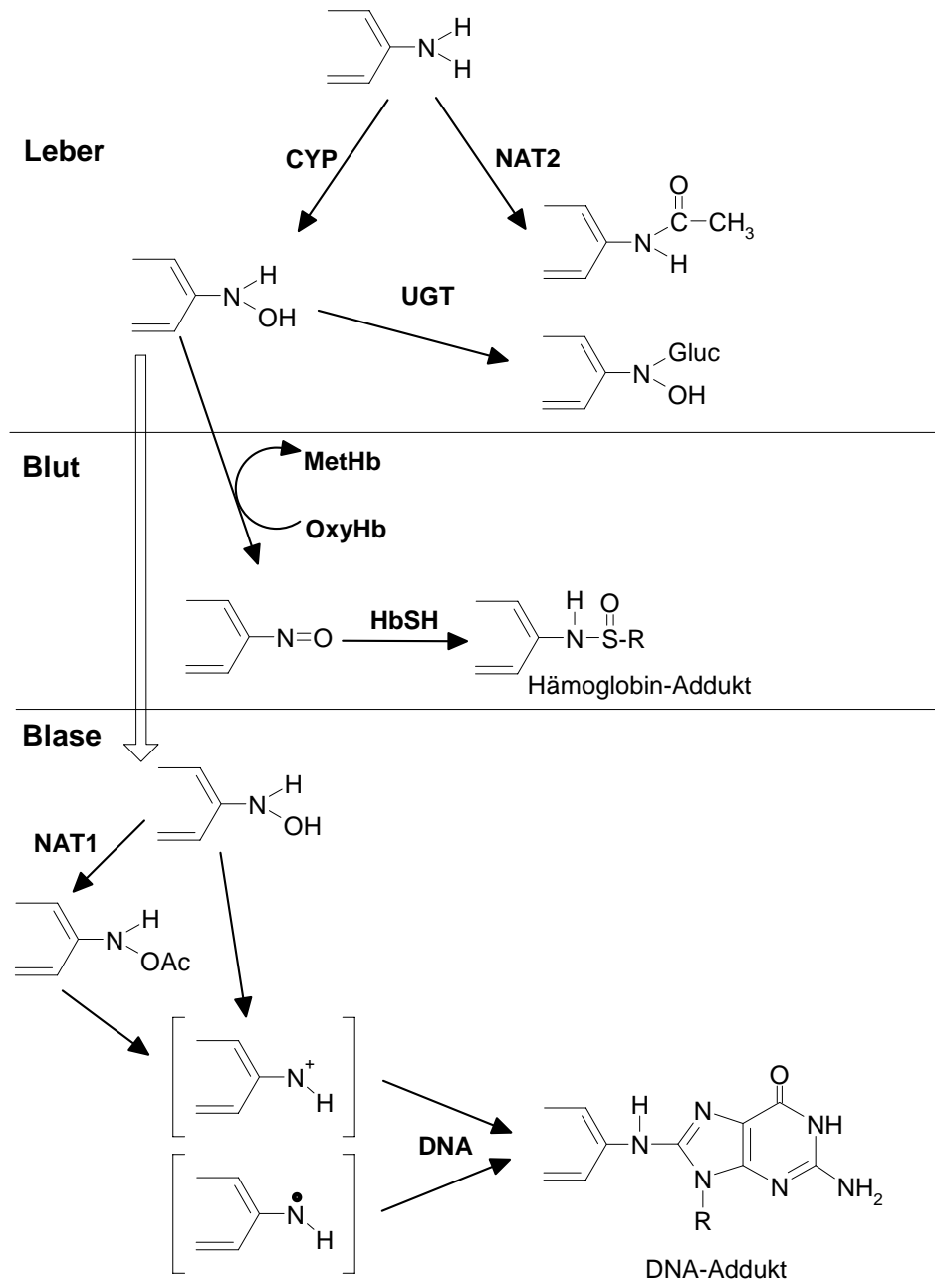


Abbildung 11: Metabolismus der aromatischen Amine

Im Erythrozyten wird das Hydroxylamin unter Methämoglobinbildung zum Nitrosoamin oxidiert. Für diese Reaktion ist bereits eine geringe Aminkonzentration im Blut ausreichend, da

beide Metaboliten in einem Redoxgleichgewicht vorliegen. Das entstandene Nitroso-4-biphenyl kann sich mit der Thiolgruppe eines Cysteins im Hämoglobin binden und so ein kovalentes Hämoglobinaddukt bilden [72]. Das entstandene Zwischenprodukt ist instabil und lagert sich unter Wanderung des Sauerstoffatoms zum Schwefel in ein stabiles Sulfanilamid um oder wird beispielsweise durch die Thiolgruppen des Glutathions zum *N*-Hb-*N*-Hydroxylamin reduziert. Man schätzt, dass ca. 10% des über Inhalation von Zigarettenrauch aufgenommenen 4-ABP beim Menschen in Hb-Addukte umgewandelt wird [25].

Neben der metabolischen Aktivierung finden in der Leber auch Entgiftungsreaktionen statt. Die Glucuronidierung des Hydroxylamins durch hepatische Glucuronyltransferasen führt aufgrund der erhöhten Hydrophilie der glucuronidierten Amine zur vermehrten Ausscheidung über die Niere.

## 1.6 Prilocain

### 1.6.1 Bedeutung

Das Lokalanästhetikum (LA) Prilocain (Abbildung 12) wurde 1960 entdeckt [73] und wird heute hauptsächlich in der Zahnheilkunde, von HNO-Spezialisten und in der Pädiatrie eingesetzt. Insbesondere seit der Entwicklung der eutektischen Mischung der LA Lidocain und Prilocain (EMLA<sup>®</sup>) wird es vermehrt auch bei Kindern in Form eines Pflasters oder einer Creme angewandt [74,75]. Zudem findet es Anwendung im Zusammenhang mit der Einführung von i.v. Kathetern, Blutentnahme, chirurgischen Eingriffen an der Hautoberfläche und zur Lokalanästhesie der genitalen Schleimhaut bei kleineren oberflächlichen chirurgischen Eingriffen, sowie bei der Wundreinigung von Ulcus cruris [76]. Zusätzliche Bedeutung erlangte es mit der Einführung der erstmals 1987 von Klein beschriebenen Tumescenztechnik [77].

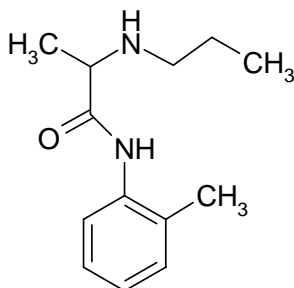


Abbildung 12: Struktur Prilocain

Prilocain gehört zu den LA des Amid-Typs. Es zeichnet sich durch eine kurze Halbwertszeit von ca. 90 Minuten und einen schnellen Wirkeintritt aus. Die maximalen Konzentrationen werden im Plasma nach 60-90 Minuten erreicht [78].

### 1.6.2 Struktur und Wirkungsweise von Lokalanästhetika

Ein Lokalanästhetikum muss wasserlöslich, sterilisierbar und gut verträglich sein. Zudem sollte der Wirkeintritt rasch erfolgen, lange andauern, aber seine Wirkung auch leicht reversibel gemacht werden können.

Man unterscheidet zwischen LA des Estertyps und des Säureamidtyps. Beiden gemeinsam ist ein aromatischer Ring, der entweder über eine Ester- oder eine Amidbindung an ein sekundäres oder tertiäres Amin gebunden ist. Die LA sind dadurch amphiphil und können abhängig vom pH-Wert entweder als Salze oder freie Basen vorliegen. Nur das Salz ist wasserlöslich. Die fertigen Injektionslösungen zur Lokalanästhesie haben einen pH-Wert von 4-6, der  $pK_a$ -Wert der einzelnen LA liegt zwischen 7,8 und 9. Verbindungen mit einem  $pK_a$ -Wert von größer 9 sind aufgrund ihrer Chemie unter physiologischen Bedingungen unwirksam [21]. Ist der  $pK_a$ -Wert größer als der pH-Wert im Gewebe, liegt das LA als Säure vor, bei einem  $pK_a$ -Wert der dem pH-Wert des umliegenden Gewebe entspricht, liegen die ionisierte und die nicht ionisierte Form im Verhältnis 1:1 vor.

Nur die nicht ionisierte Form ist aufgrund ihrer Lipophilie membrangängig und kann so durch die Nervenfasershülle zum Wirkort diffundieren und sich in der Membran der Nervenzelle anreichern. Je lipophiler das LA, desto schneller ist die Penetration und desto schneller kann die betäubende Wirkung eintreten. In entzündeten Geweben, in denen der pH-Wert meist weniger als pH 6 beträgt, liegt die lipidlösliche, unionisierte Form nur noch in minimalen Konzentrationen vor, wodurch der Wirkeintritt wegen der verlangsamten Penetration ins Gewebe verzögert ist. Es sind dann meist größere Mengen der Injektionslösung für eine ausreichende Wirkung notwendig.

Die Wirkweise der LA beruht auf der Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle. Dies führt an den Nervenbahnen zur Hemmung der Reizweiterleitung. Die LA hemmen dabei die Depolarisation der Nervenmembran, indem sie den Einstrom von Natrium verhindern. Dadurch kann das ankommende Aktionspotenzial nicht mehr weitergeleitet werden, die Schmerzempfindung wird gehemmt. Ihre schmerzstillende Wirkung erzielen die LA nur in der ionisierten Form, da nur diese an den Rezeptoren der Natriumkanäle bindet.



LA hemmen dosisabhängig nicht nur periphere Nerven, sondern auch andere erregbare Strukturen des ZNS. Hohe Konzentrationen im Blut können Sedierung, Übelkeit, Unruhe, Krämpfe und Schwindel, aber auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen wie Arrhythmien oder Bradykardie hervorrufen, die bis zur Atemdepression und zum Herzstillstand führen können.

Grundsätzlich unterscheiden sich verschiedene LA vor allem in ihrer Wirkungsdauer und der maximal möglichen Einzeldosis. Beim Lidocain beispielsweise hält die Wirkung zwischen 60-90 min an, die maximale Einzeldosis beträgt 200 mg. Bei Prilocain dürfen als Einzeldosis maximal 600 mg gegeben werden, die Wirkungsdauer beträgt dabei 30-60 min. Durch Zusatz von Adrenalin können die Maximaldosen erhöht werden, weil das LA langsamer vom Injektionsort abtransportiert wird. Des Weiteren wird durch die Vasokonstriktion der Wirkeintritt des LA beschleunigt und die Wirkdauer verlängert.

### 1.6.3 Metabolismus von Prilocain

Im Gegensatz zu den LA des Estertyps wie zum Beispiel Procain oder Tetracain, die über verschiedene Esterasen im Körper relativ rasch metabolisiert werden, werden LA des Säureamidtyps hauptsächlich in der Leber über mehrere Metabolisierungsschritte abgebaut. Sie werden dabei durch Monooxygenasen oxidativ desalkyliert, durch Carboxylesterasen enzymatisch hydrolysiert und durch Glucuronyltransferasen glucuronidiert und renal oder biliär ausgeschieden. Nur geringe Mengen der LA können unverändert im Harn detektiert werden.

Prilocain nimmt unter diesen LA eine Sonderstellung ein (Abbildung 13). Es wird hauptsächlich durch Hydrolyse des Amids zu *o*-Toluidin und *N*-Propylalanin in der Leber metabolisiert [79,80]. Der weitere Abbau von *o*-Toluidin erfolgt zum Teil über die *N*-Hydroxylierung und *N*-Acetylierung [81]. Der größte Anteil der Metaboliten im menschlichen Urin wird aber vom *p*-Hydroxy-*o*-Toluidin gestellt, das etwa ein Drittel der Urinmetaboliten ausmacht [82].

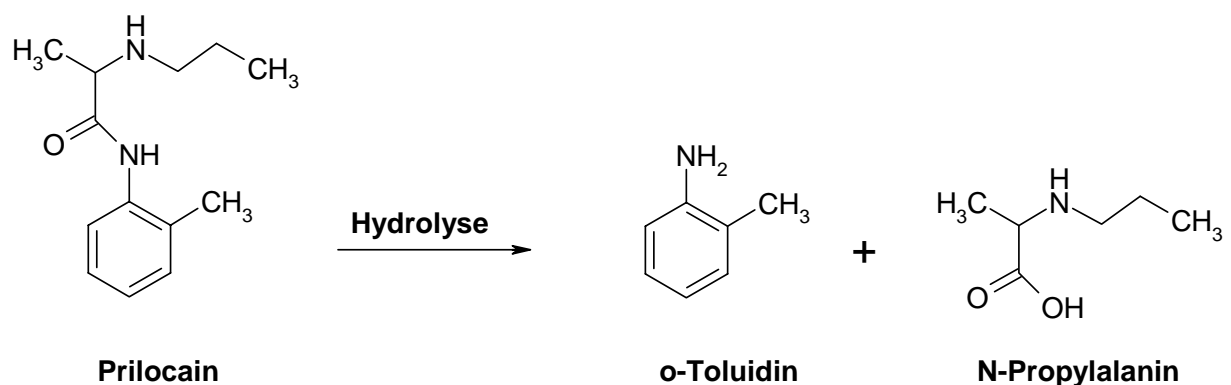


Abbildung 13: Metabolismus von Prilocain

#### 1.6.4 Tumeszenzlokalanästhesie

Bei der Tumeszenzlokalanästhesie handelt es sich um eine großflächige Infiltration von Haut- und Unterhautgewebe mit einem LA. Sie wird hauptsächlich bei der Liposuktion angewandt, findet mittlerweile aber auch in anderen medizinischen Bereichen wie beispielsweise bei ambulanten proktologischen Untersuchungen Verwendung [83].

Ein großer Vorteil dieser Technik ist der geringe Blutverlust. So werden bei der Liposuktion mit klassischer Lokalanästhesie bis zu 30% Blut mit abgesaugt, bei der Tumeszenztechnik dagegen nur circa 2%. Außerdem wird die Bildung von Hämatomen minimiert [84]. Ein weiterer Vorteil ist die lang anhaltende Wirkung. Zwar beansprucht die Betäubung größerer Hautpartien mehr als eine Stunde, die Lokalanästhesie hält jedoch bis zu 18 Stunden an. Dies ist sehr viel länger als bei einer normalen örtlichen Betäubung, bei der Prilocain bei s.c. Applikation eine Wirkdauer von weniger als 90 Minuten hat.

Für die Tumeszenzlokalanästhesie werden wahlweise Lidocain oder Prilocain eingesetzt. Im Falle des Prilocains werden bis zu 6 L einer 0,05%-igen Lösung unter die Haut appliziert. Dies entspricht einer maximalen Gabe von 3000 mg Prilocain, was zu einer durchschnittlichen Konzentration von 35 mg/kg Körpergewicht führen kann. Obwohl die bei klassischer Lokalanästhesie zulässige Höchstdosierung von 8,5 mg/kg Körpergewicht [78] dabei fast um das 5-fache überschritten wird, kommt es wegen der langsamen Abgabe des LA vom Injektionsort im Blut zu keinen gefährlich hohen Konzentrationen von Prilocain.

### 1.7 GC-MS

Die Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) erweist sich als effektivste Analysenmethode zur Trennung, Detektion und Charakterisierung von Bestandteilen komplexer organischer Gemische. Der Vorteil in der Kombination beider Geräte liegt in der Untersuchung und Detektion von flüchtigen bis mittelflüchtigen Substanzen bis in den Femtogramm-Bereich. Im Gaschromatograph werden die Substanzen zunächst aufgrund ihrer unterschiedlichen Interaktionen mit der stationären Phase voneinander getrennt. Dabei dient das Trägergas Helium als mobile Phase. Als stationäre Phasen dienen niedrigviskose Flüssigkeiten, die einen dünnen, gleichmäßigen Film auf der Oberfläche der GC-Kapillarsäulen bilden.

Nach der chromatographischen Auftrennung der Probe mittels GC werden die Substanzen im Massenspektrometer analysiert. Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf einer Ionisierung der zuvor getrennten Substanzen. Die ionisierten Moleküle bilden nach Zerfall struk-

turspezifische Fragmente, die entsprechend ihrer Ladungszahl (Masse-zu-Ladungs-Verhältnis) in einem Magnetfeld voneinander getrennt werden.

Bei der Ionisierung werden zwei verschiedene Arten unterschieden. So kann zum einen die Elektronenstoßionisation (EI), zum anderen die chemische Ionisation (CI) eingesetzt werden.

Die EI wird durch Beschleunigung von Elektronen aus einem Heizdraht erzeugt. Um eine vollständige Fragmentierung der Moleküle zu erhalten, beträgt die Potenzialdifferenz meistens 70 eV. Das dadurch in der Ionenquelle gebildete Radikalkation wird Molekülion ( $M^+$ ) genannt und liefert die Molekülmasse der Substanz (gemessen in Atommasseneinheiten, amu). Durch weitere Fragmentierung entstehen Radikale und Neutralteilchen.

Einen schonenderen Nachweis bietet die chemische Ionisierung (CI). Die Molekülfragmente werden hierbei durch Sekundärionisation gebildet. Dabei wird ein Reaktandgas wie beispielsweise Methan oder Ammoniak durch einen in der Ionenquelle gebildeten primären Elektronenstrahl ionisiert. Es entstehen sekundäre, energieärmere Elektronen, die die Probenmoleküle wesentlich schonender ionisieren als bei der direkten Ionisation im EI-Modus. Es wird dadurch hauptsächlich der Molmassenpeak gebildet, eine Fragmentierung findet, im Vergleich zur EI, nahezu nicht statt. Prinzipiell kann man zwischen positiver und negativer Ionisation (NCI) unterscheiden. Die negativ chemische Ionisation besitzt eine hohe Selektivität, da nur Moleküle mit einem  $\pi$ -Elektronensystem oder einer funktionellen Gruppe mit freien Elektronenpaaren negativ ionisiert werden können. Sie zeichnet sich zudem durch eine hohe Empfindlichkeit aus.

Da im Massenspektrometer absoluter Luftausschluss notwendig ist, wird im Hochvakuum gearbeitet. Bereits geringe Spuren von Verunreinigungen mit hoher Elektronenaffinität wie Sauerstoff oder Wasser können zu starkem Hintergrundrauschen führen. Auch ist auf eine hohe Reinheit der verwendeten Gase, in unserem Fall Helium und Methan, zu achten.

Neben den am häufigsten verwendeten Quadrupolmassenfiltern werden auch noch Magnetsektorfeldanalysatoren, Ionenfallen und Tandem-Massenspektrometer eingesetzt. Nach Passieren des Massenanalysators erzeugen die Ionen Ströme, die im Bereich von  $10^{-9}$  bis  $10^{-17}$  A, mittels eines Elektronenvervielfachers (Multiplier) zu messbaren Signalen umgewandelt werden. Die gewonnenen Daten werden danach mit einem Computer ausgewertet.

## **1.8 Ziel der Arbeit**

Die kanzerogene Wirkung der aromatischen Amine wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts erkannt. Rehn beschrieb im Jahr 1895 wiederholt auftretende Fälle von Blasenkrebs bei Arbeitern einer Farbenfabrik als „Anilinkrebs“. Heute gelten neben den Benzidinen vor allem 2-Naphthylamin und 4-ABP als starke Humankanzerogene. o-Toluidin steht ebenfalls im begründeten Verdacht, Blasenkrebs beim Menschen auszulösen und wird von der IARC in der Gruppe 2A als „wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen“ gelistet [2].

Zunächst ist man davon ausgegangen, dass die Hauptbelastungsquelle mit aromatischen Aminen das Rauchen ist. Heute weiß man, dass auch bei Nichtrauchern ohne wesentliche Belastung mit Passivrauch aromatische Amine nachzuweisen sind. Als mögliche Quellen hierfür gelten Umwelteinflüsse wie Dieselabgase, Nahrung [32,58], Farben und Pigmente [71], sowie Haarfärbemittel [55]. Zudem sind aromatische Amine Ausgangsstoffe vieler Chemikalien und Arzneistoffe [12].

Das Biomonitoring von Hb-Addukten aromatischer Amine ist eine einfache und genaue Methode, die Belastung eines Menschen mit diesen Substanzen zu untersuchen. Hb-Addukte sind zwar selbst noch kein Hinweis auf ein mögliches Krebsrisiko, sie gelten aber als sogenannte Surrogatmarker, die neben der Aufnahme auch die Aktivierung zu reaktiven Metaboliten anzeigen.

Inwiefern sich die Belastung des Menschen mit o-Toluidin auf die Gabe des Arzneimittels Prilocain zurückführen lässt, ist Thema der vorliegenden Arbeit.

Es wurde Patienten der HNO-Abteilung der Poliklinik München vor und nach einer Anästhesie mit Prilocain Blut abgenommen und dieses auf eine mögliche Erhöhung der Hb-Addukte von o-Toluidin, einem Metaboliten des Prilocain, untersucht. Die Bestimmung der Hb-Addukte von 4-ABP diente zum einen dazu, den Raucherstatus der Probanden zu überprüfen, zum anderen sollte sicher gestellt werden, dass durch die Anästhesie mit Prilocain ausschließlich die Addukte von o-Toluidin erhöht werden.

In einer weiteren Studie wurden sowohl Hb-Addukte wie auch urotheliale DNA-Addukte von o-Toluidin und 4-ABP bestimmt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 *Material*

#### 2.1.1 Geräte

GC-MS:

GC	Serie 8060, Fisons
MS	Trio 1000, Fisons
Quelle	CI <sup>-</sup>
Software	MassLab Version 1.3, Fisons plc.

GC-MS Peripherie:

Vakuumpumpe Edwards High Vacuum Pump E2M8 Two Stage, Edwards High Vacuum Int., Part of BOC Ltd., Crawley, Sussex, England

Kühlwasserbad und Steuereinheit Multitemp 2209, Colora Messtechnik GmbH, Lörrach

Zentrifugen:

Minizentrifuge Universal 16R, Hettich, Tuttlingen

Minifuge GL, Bachofer, Reutlingen

Sorvall RC5C, Sorvall Inst. DuPont, Bad Homburg

Vakuum Konzentrator BA-VC 300H, Bachofer, Reutlingen

Vortex Rüttler, Heidolph, Kehlheim

Analysenwaage A - 150 - SX, Cobes, Spanien

Plexiglas-Absaugereinheit, hergestellt in der Feinmechanikwerkstatt des Walther-Straub-Instituts München, hergestellt nach Angaben von Dr. Kuss, Psychiatrische Klinik der LMU

Vakuumpumpe, Vakuubrand GmbH & Co KG; Wertheim

Digital pH Meter InoLab pH Level 1, WTW GmbH, Weilheim

Ultraschallbad Sonorex RK 106, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Kelheim

Flussmeter, Rotameter, Rota Yokogawa GmbH & Co KG, Wehr

Vakuummesssikkator, Schott AG, Mainz

Pipetten von Gilson, Medical Electronics S.A., Villiers-le-Bel, Frankreich

Modell:	microman 1000, 250, 25 µL
	pipetman 1000, 200, 100, 20, 10 µL
	pipetman ultra 1000, 200, 100, 20, 10 µL
	distriman

### 2.1.2 Materialien

GC-Säule:

Factor four 5 ms      5% Phenyl-95% Dimethylsiloxanphase,  
L 30 m, ID 0,25 mm, df 0,25  $\mu$ m, Varian, Frankfurt

GC-Zubehör:

Spritzen              10  $\mu$ L Spritzen für GC (701N), Hamilton, Darmstadt  
Liner                  Splitless Liner Borsilikat, 5 mm, Bezug über SMS, Idstein  
Filament              Rheniumfilament, Bezug über SMS, Idstein  
Septen                Septa 77, Bezug über SMS, Idstein

QIamp® DNA Micro Kit, Qiagen, Heiden

Heparin-Röhrchen für Blutproben, Sarstedt, Nümbrecht

BondElut C18 Säulen, 3 mL, 500 mg, Varian, Frankfurt

PP Luer Stopcocks, Varian Frankfurt

Zentrifugeneinsätze 50 mL aus PP, Sorvall, DuPont, Bad Homburg

Zentrifugeneinsätze 250 mL aus PP mit Schraubdeckel, Sorvall, DuPont, Bad Homburg

Eppendorf Safe-Lock 2,0 mL Reaktionsgefäße, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

PP Röhrchen 50 mL mit Schraubdeckel, Sarstedt, Nümbrecht

PP Röhrchen 15 mL mit Schraubdeckel, Sarstedt, Nümbrecht

40 mL Pyrex-Reagenzgläser mit Gewinde und Deckel, Schott, Mainz

Pasteurpipetten aus Glas, Brand GmbH und Co, Wertheim/Main

Pasteurpipetten aus Glas, gestopft, Brand GmbH und Co, Wertheim/Main

PP Röhrchen mit Verschluss 101x16,5 mm, Sarstedt, Nümbrecht

Erlenmeyerkolben, 100, 250, 500 mL

Messkolben 5, 10, 20, 50, 100 und 1000 mL

Bechergläser 25, 50, 100 und 200 mL

Glastrichter

Vial 4 mL, Wheaton, USA

Deckel, Teflonbeschichtete Septen, Wheaton, USA

Minivial 1,5 mL, Zinsser Analytics, Frankfurt

Microvial 100  $\mu$ L, Zinsser Analytics, Frankfurt

Spiralfedern, Alltech, München

Deckel, 8 mm Silikon PTFE Septen für Minivial, Zinsser Analytics, Frankfurt

Sterican Kanülen Gr. 1, Braun, Melsungen

20 mL Einwegspritzen, Braun, Melsungen

Neutralit pH-Indikatorpapier pH 5,5 - 9,0, Merck, Darmstadt

Schleifpapier Micromesh 4000 und 8000 20,3 x 15,4 cm, Micro Surface Finishing Products Inc., Wilton, IO, USA

Parafilm "M", American Can Company, Dixie/Marathon, Greenwich, CN, USA

Schwarzbandfilter 589/1, Schleicher&Schuell, Dassel

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Filter:

Der Filter wurde selbst hergestellt. Dazu wurde eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette mit 500 mg wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gefüllt.

### 2.1.3 Chemikalien

d<sub>5</sub>-4-Aminobiphenyl, TRC, Toronto, Kanada

d<sub>9</sub>-o-Toluidin, CDN Isotopes, Point-Claire, Quebec, Kanada

4-Aminobiphenyl, Sigma-Aldrich, Schnelldorf

o-Toluidin, Sigma-Aldrich, Schnelldorf

1-Aminopyren, Sigma-Aldrich, Schnelldorf

2,6-Dimethylanilin, Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Dinatriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

Heptafluorbuttersäureanhydrid, Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator (Blaugel), Merck, Darmstadt

Lachssperma-DNA, MP Biomedicals, Eschwege

Lecksuchspray, SMS, Idstein

NaOH rotuli p.a., Merck, Darmstadt

Natriumchlorid, Merck, Darmstadt

Natriumsulfat, wasserfrei (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Merck, Darmstadt

Rinderhämoglobin, Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Triethylamin, Merck, Darmstadt

Benzol, p.a., Merck, Darmstadt

Chloroform p.a., Merck, Darmstadt

Diethylether p.a, Merck, Darmstadt

Ethylacetat p.a., Merck, Darmstadt

Hexan p.a, Merck, Darmstadt

Methanol p.a, Merck, Darmstadt

Chloroform Supra Solv für GC, Merck, Darmstadt

n-Hexan Supra Solv für GC, Merck, Darmstadt

Methanol Supra Solv für GC, Merck, Darmstadt

Toluol Supra Solv für GC, Merck, Darmstadt

Reinstwasser, filtriertes deionisiertes Wasser, Membrapur, Bodenheim

Gas: Helium Qualität 5.0

Stickstoff Qualität 4.6

Methan Qualität 5.0

## 2.1.4 Lösungen und Reagenzien

### 2.1.4.1 Standardlösungen

Für den Standardmix wurden die beiden internen Standards  $d_9$ -o-Toluidin und  $d_5$ -4-ABP zunächst einzeln verdünnt und anschließend zu gleichen Teilen zusammengegeben und auf die jeweilige Endkonzentration eingestellt.

$d_9$ -o-Toluidin: 2  $\mu$ L  $d_9$ -o-Toluidin (entspricht 2 mg) wurden in einem 20 mL Messkolben in Hexan gelöst. Aus dieser Lösung mit 100 ng/ $\mu$ L wurden 10  $\mu$ L entnommen und mit Hexan auf 1 mL verdünnt. Daraus ergab sich eine Konzentration von 1 ng/ $\mu$ L.

$d_5$ -4-Aminobiphenyl: 2,0 mg  $d_5$ -4-ABP wurden in einem 20 mL Messkolben in Hexan gelöst. Die entsprechende Verdünnung von 10  $\mu$ L dieser Lösung auf 1 mL Hexan ergab ebenfalls eine Konzentration von 1,0 ng/ $\mu$ L.

Standardmix: Es wurden jeweils 80  $\mu$ L der beiden internen Standardlösungen mit der Konzentration 1 ng/ $\mu$ L auf 10 mL verdünnt. Daraus ergab sich eine Endkonzentration für den Standardmix von 8 pg/ $\mu$ L.

4-Aminobiphenyl und o-Toluidin: Je 1,0 mg 4-ABP und o-Toluidin wurden in 10 mL Messkolben in Hexan gelöst. Dies ergab eine Konzentration von 100 ng/ $\mu$ L. Aus dieser Lösung wurden 10  $\mu$ L entnommen und mit Hexan auf 1 mL verdünnt. Daraus ergab sich eine Endkonzentration von 1 ng/ $\mu$ L.

### 2.1.4.2 Sonstige Lösungen

4 N HCl 100 mL konzentrierte Salzsäure werden mit 300 mL Reinstwasser verdünnt

0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer 7,1 g Dinatriumhydrogenphosphat werden in 100 mL Reinstwasser gelöst



---

0,1 bzw. 1 N NaOH	4 g bzw. 40 g Natriumhydroxid rotuli werden in 1000,0 mL Reinstwasser gelöst.
Phosphatpuffer pH 6,6	Eine 0,67 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung (119,63 mg/mL) wurde vorgelegt und mit einer 0,67 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung (91,12 mg/mL) auf pH 6,6 am Digital-pH-Meter eingestellt
Phosphatpuffer pH 7,0	24 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ wurden in 1000,0 mL Reinstwasser gelöst.

## 2.1.5 Probanden

### 2.1.5.1 Patienten der HNO

Es wurde Blut von 23 Patienten aus der HNO-Abteilung der Poliklinik München untersucht. Dabei wurde jeweils eine Blutprobe von 10 mL vor (0 h-Wert) und eine weitere 24 Stunden nach (24 h-Wert) der Lokalanästhesie mit Prilocain in Heparin-Röhrchen aufgenommen. Die Röhrchen wurden nach der Entnahme maximal 12 Stunden bei 4-6 °C gelagert.

Weitere Informationen wie Alter, Geschlecht, Körpergröße, Gewicht Raucherstatus, Krankheitsbild, Zeitpunkt der Blutabnahme und verabreichte Menge Prilocain wurden für jeden Patienten vom behandelnden Arzt in einem Informationsbogen dokumentiert und sind in Tabelle 17 im Anhang zusammengefasst.

### 2.1.5.2 Probanden der Prilotstudie

Die „Prilotstudie“ (Prilocain-Pilot-Studie) wurde zusammen mit der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Kleinsasser von der HNO-Abteilung der Universitätsklinik Regensburg durchgeführt. Dazu wurde den 6 Probanden wiederum jeweils eine Blutprobe unmittelbar vor und 24 Stunden nach der s.c. Injektion (Bauchfalte) von 100 mg Prilocain entnommen. Außerdem wurde über 24 Stunden der Urin vor und nach der Injektion in Glasflaschen gesammelt. Die Proben wurden unmittelbar vor Ort weiterverarbeitet.

## 2.2 Methode

### 2.2.1 Gewinnung von Hämoglobinaddukten

#### 2.2.1.1 Aufbereitung der Erythrozytenfraktion

Das Humanblut wurde zur Vermeidung der Blutgerinnung in Heparin beschichteten PE-Röhrchen gesammelt. Zunächst wurde durch Zentrifugation die Erythrozytenfraktion vom Plasma getrennt. Nach Abpipettieren des Plasmas wurden die sedimentierten Erythrozyten

dreimal mit dem gleichen Volumen einer isotonen Kochsalzlösung gewaschen und anschließend jeweils bei 4 °C, 10 min bei 4000 rpm in der Minifuge GL zentrifugiert.

Nach dem Waschschrift konnten die Erythrozyten bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 °C eingefroren und unbestimmte Zeit gelagert werden.

### **2.2.1.2 Fällung des Hämoglobins**

Zur Gewinnung des Hämoglobins wurde die Erythrozytenfraktion zunächst mit eiskaltem Reinstwasser lysiert. Dazu wurden die Blutproben mit 5 mL Reinstwasser in Zentrifugengläser überführt und anschließend für 15 min im Eisbad stehen gelassen. Nach Zugabe von 5 mL Phosphatpuffer wurde die Lösung bei 4 °C zentrifugiert (Sorvall RSC5, 20000 rpm, 30 min.).

Das Hämoglobin wurde anschließend durch ethanolische Fällung gewonnen [85]. Es wurden von den lysierten Blutproben jeweils 10 mL auf zwei Reagenzgläser mit Schraubdeckel aufgeteilt und auf 25 °C im Wasserbad temperiert. In jedes Glas wurden unter manuellem Schütteln zügig 12,5 mL Ethanol zugegeben und sofort 1 min gevortext. Nachdem sich das gefällte, feinkörnige Hämoglobin abgesetzt hatte, wurden 4/5tel des Ethanolüberstands abgenommen und der Inhalt beider Reagenzgläser in 250 mL Reinstwasser zusammengeführt. Sobald sich das Hämoglobin erneut abgesetzt hatte und die Wasserphase vollständig farblos war, wurde es über einen Schwarzbandfilter filtriert. Zur Entfernung von Glutathion-Resten wurde das Filtrat mit 250 mL Reinstwasser gewaschen. Dabei war darauf zu achten, dass der Filter nicht trocken läuft. Um das restliche Wasser zu entfernen, wurden zunächst 24 mL einer Ethanol:Wasser-Mischung (2:1, V:V) zugegeben, mit 24 mL Ethanol:Diethylether (1:3; V:V) nachgespült und anschließend mit 40 mL Diethylether nochmals aufgeschlämmt. Nachdem das Hämoglobin erneut sedimentiert und abgetropft war, wurde es in 50 mL PP-Röhrchen (Falcon®) überführt und 24 Stunden im Exsikkator bei 4 °C getrocknet. Das gefällte und getrocknete Hämoglobin wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

### **2.2.1.3 Alkalische Hydrolyse und Isolierung durch Festphasenextraktion**

250 mg Hämoglobin wurden in 20 mL PP-Röhrchen eingewogen und mit 5,0 mL 0,1 N NaOH versetzt. Nach Zugabe von 20 µL des Standardmixes folgte eine einstündige Hydrolyse im Ultraschallbad.

Die hydrolytisch freigesetzten aromatischen Amine wurden durch Festphasenextraktion mit C18-Bond Elut Säulen angereichert. Dazu wurden die Säulchen auf eine in der Feinmechanikwerkstatt des Walther-Straub-Instituts (nach Angaben von Dr. Joachim Kuss) gefertigten

Vakuumabsaugereinheit aus Plexiglas gesteckt. Um eine gleichmäßige Absauggeschwindigkeit zu erreichen, wurde die Säulen mit Varian PP Luer Stopcocks versehen, über die mit Hilfe eines Hahns das Vakuum reguliert werden konnte.

Die SPE-Kartuschen wurden zunächst mit jeweils 6 mL Methanol und 6 mL Reinstwasser konditioniert. Die Probelösung wurde mit einer Pasteurpipette auf die Säulen aufgegeben, wobei darauf zu achten war, dass die Säulen nicht trocken laufen. Anschließend wurde erst das Probenröhrchen, danach die Säule mit jeweils 3 mL Wasser gespült. Um die Säulen vollständig zu trocknen, wurde durch Anlegen von Druckluft zunächst die restliche Spülflüssigkeit aus den Säulen gepresst, zur vollständigen Trocknung erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 20 °C und 4000 rpm durch Einhängen der Minivials in PP Zentrifugenröhrchen in der Minifuge.

Die an das Säulenmaterial gebundenen Arylamine wurden mit 3 mL Chloroform eluiert und über einen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Filter in 4 mL Glasvials überführt. Das Elutionsmittel wurde dabei mit Hilfe einer 20 mL Spritze mit Adapter durch die Säulen gedrückt, wobei auf eine gleichmäßige Elutionsgeschwindigkeit zu achten war. Der Filter wurde anschließend mit 1 mL Chloroform gespült, das durch Anlegen von Druckluft durch den Filter in das Glasvial gespült wurde.

## **2.2.2 Gewinnung von DNA-Addukten aus Urin**

### **2.2.2.1 *Aufbereitung des Urins***

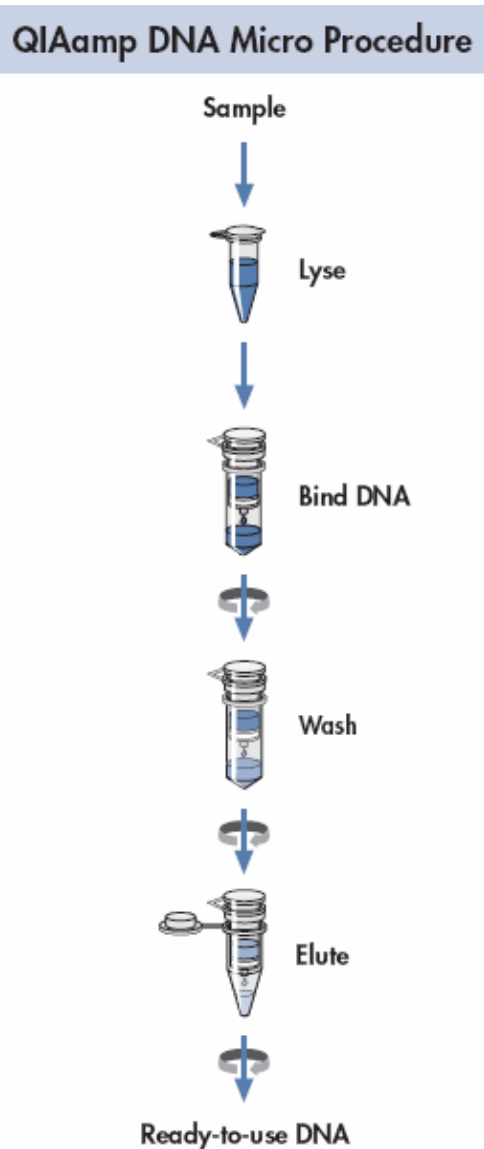
Zur Gewinnung der Urothelien wurde der frisch gesammelte Urin zunächst zentrifugiert. Die vollständige Zentrifugation des gesamten 24-Stunden Urins (ca. 1-1,5 L) erfolgte in mehreren Teilschritten: ca. 250 mL Urin wurden in ein entsprechendes Zentrifugenglas überführt und 30 min bei 18000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden in das gleiche Gefäß erneut 250 mL Urin gegeben und zentrifugiert. Man wiederholte diesen Vorgang bis zur vollständigen Zentrifugation des gesamten Urins. Das aus den verschiedenen Zentrifugationsschritten erhaltene Pellet wurde schließlich in ein Eppendorfgefäß überführt.

### **2.2.2.2 *Isolierung der DNA***

Die Isolierung der urothelialen DNA erfolgt mit Hilfe des QIamp<sup>®</sup> DNA Micro Kit der Firma Qiagen (Abbildung 14).

Entsprechend der Vorschrift erfolgte zunächst die Lyse des zellulären Rückstandes im Pellet des Urins durch Zugabe verschiedener Pufferlösungen (BufferAE<sup>®</sup>, BufferATL<sup>®</sup>, BufferAL<sup>®</sup>)

und jeweils anschließendem Zentrifugieren. Nach Zugabe von Proteinkinase K und einer einminütigen Inkubation bei 56 °C im Thermomixer wurden Proteine, die die Analyse stören, verdaut. Nach Zugabe von 50 µL 96%-igem Ethanol, vortexen und erneuter Zentrifugation erfolgte die Gewinnung der DNA per Festphasenextraktion.



**Abbildung 14: Gewinnung der DNA mit Qiaamp<sup>®</sup> DNA Micro Kid (Qiagen Handbook 08/2003)**

Durch Überführen des Überstandes auf eine Qiagen Mini Elut Column<sup>®</sup> und anschließendes Zentrifugieren (8000 rpm, 2 min) wurde die DNA durch Adsorption auf dem Kieselgel der SPE-Minikartusche gebunden. Das Waschen der DNA erfolgte durch Zugabe verschiedener weiterer Pufferlösungen (BufferAW1<sup>®</sup>, BufferAW2<sup>®</sup>) und jeweils anschließendem Zentrifugieren (8000 rpm, 2 min). Der Durchlauf wurde dabei in einem Eppendorfgesäß gesammelt und anschließend verworfen.

Nach Zugabe des letzten Waschpuffers wurde die SPE Säule bis zur vollständigen Trockne der Membran bei 14000 rpm mindestens 5 Minuten lang zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden 50 µL BufferAE<sup>®</sup> zugegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde in einem Eppendorfgesäß aufgefangen.

### **2.2.2.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch UV-Spektrometrie. Dazu wurden 100 µL Reinstwasser mit 1 µL der DNA-Lösung versetzt und die Extinktion bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ergibt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren. Dabei sollte das Verhältnis zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 230 nm ermöglicht ein Abschätzen des Salzgehaltes der Probe.

Die Konzentration an DNA wurde bei 260 nm unter Annahme einer optischen Dichte von 20 bei einer Lösung von 1,0 mg DNA/mL bestimmt. Die Berechnung der DNA-Menge erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{DNA (mg/mL)} = \frac{(oD_{260}/20) \times (1000 + \text{Aliquotvolumen})}{\text{Aliquotvolumen}}$$

### **2.2.2.4 Saure Hydrolyse und Isolierung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion**

Die Freisetzung der Addukte der aromatischen Amine aus der DNA erfolgte per saurer Hydrolyse. Dazu wurde zunächst die DNA-Lösung mit 250 µL Reinstwasser in 4 mL Vials überführt wurde, 100 µL 4 N HCl und 20 µL der ISTD-Standardlösung zugegeben und bei 80 °C 3 Stunden im Trockenschrank inkubiert.

Anschließend wurde durch zweimaliges Extrahieren mit jeweils 1,5 mL Dichlormethan die Lösung aufgereinigt. Nach Zugabe des DCM wurde dabei 1 min gevortext und zur besseren Phasentrennung 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und verworfen.

Um die Addukte zur weiteren Aufarbeitung in die organische Phase zu überführen, wurden 400 µL 1 N NaOH zugesetzt. Eine Einstellung des pH auf 7-8 war für die quantitative Gewinnung der Addukte notwendig. Die Stabilisierung des pH konnte durch Zugabe von 100 µL 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer erreicht werden.

Die DNA-Addukte wurden schließlich durch dreimaliges Ausschütteln mit jeweils 1,5 mL Hexan isoliert. Dabei wurde erneut nach Zugabe von 1,5 mL Hexan zunächst kräftig geschüttelt und bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Hexanphase wurde jeweils abgenommen und in einem Vial gesammelt.

### 2.2.3 Derivatisierung der aromatischen Amine

Um die aromatischen Amine mit hoher Nachweisempfindlichkeit per GC-MS analysieren zu können, müssen diese durch Derivatisierung zunächst in eine leicht flüchtige und gut ionisierbare Form überführt werden (Abbildung 15).

Dazu wurde zur Probenlösung 10  $\mu$ L Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) gegeben, gründlich gevortext und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Durch Zugabe von 50  $\mu$ L Methanol wurde die Derivatisierungsreaktion gestoppt und die Hämoglobinproben anschließend im Vakuumkonzentrator auf ca. 200  $\mu$ L eingengt.

Es erfolgte ein Waschschriff, um eventuell vorhandene Verunreinigungen zu entfernen. Dazu wurde den Proben 1000  $\mu$ L Phosphatpuffer pH 7,0 zugesetzt und gründlich gevortext. Nach 10 min Zentrifugieren bei 4000 rpm wurde die organische Phase in ein Minivial überführt und auf ca. 50  $\mu$ l im Vakuumkonzentrator eingengt. Nach Überführen in ein 100  $\mu$ L Microvial wurde schließlich zur Trockne eingengt.

Bei den DNA-Proben war dieser Waschschriff nicht notwendig. Sie wurden nach dem Abstoppen der Derivatisierungsreaktion zunächst auf ca. 100  $\mu$ L eingengt und nach Überführen der Probenlösung in Microvials ebenfalls zur Trockne eingedampft.

Zum Vermessen wurden die Proben unmittelbar vor der Injektion in die GC/MS in 10  $\mu$ L Toluol resuspendiert.

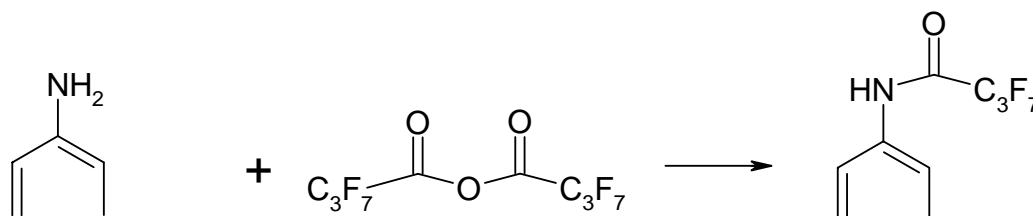


Abbildung 15: Derivatisierung der Aromatischen Amine mit HFBA

## 2.3 GC-MS-Analysen

### 2.3.1 Chromatographische Bedingungen

Die GC-MS-Analyse erfolgte mit einem Gerät der Firma Fisons, bestehend aus einem Gaschromatograph der Serie 8060, an welchem ein Trio 1000 Quadrupol Massenspektrometer, angeschlossen war. Von der in 10  $\mu\text{L}$  Toluol resuspendierten Lösung der aromatischen Amine wurde 1  $\mu\text{L}$  in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Probenaufgabe erfolgte im splitless Verfahren, bei welchem das Rückventil 1 min geöffnet blieb.

Für die Trennung der aromatischen Amine wurde eine Varian Factor Four 5 ms Kapillarsäule (30 m Länge, 0,25 mm ID, 0,25  $\mu\text{m}$  Filmdicke) verwendet. Als Trägergas diente Helium der Qualität 5.0 mit einem konstanten Druck von 12 psi.

Die Injektortemperatur betrug 280 °C, die Temperatur im Transferliner 200 °C und in der Quelle 250 °C.

Für die Bestimmung der Hb-Addukte der aromatischen Amine wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet (Abbildung 16).

- 1 min bei 80 °C halten
- Heizen mit 12 °C/min bis 210 °C
- Heizen mit 15 °C/min bis 300 °C
- 5 min bei 300 °C halten

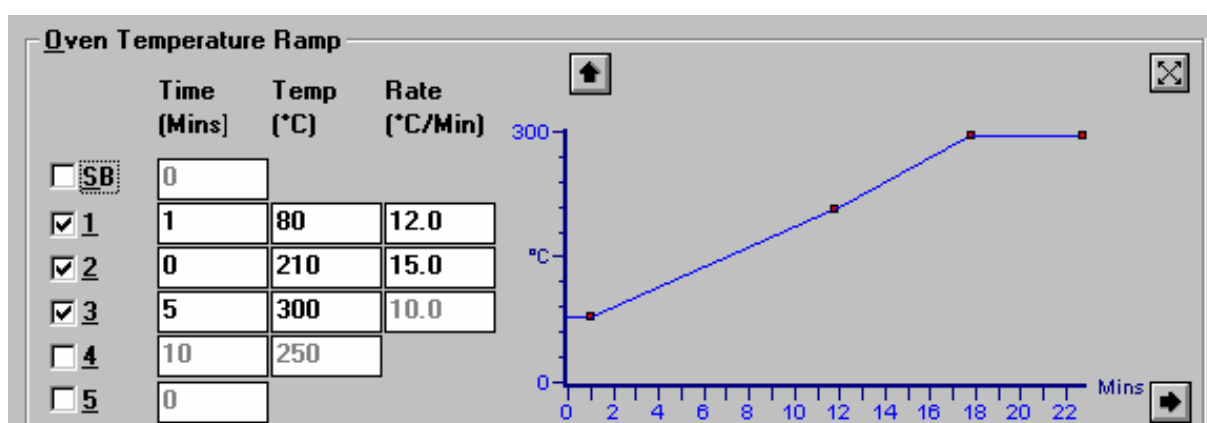


Abbildung 16: Verlauf des GC Temperaturprogramms

#### 2.3.1.1 MS-Bedingungen

Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Massenspektrometrie. Gemessen wurde dabei mit negativ chemischer Ionisierung (NCI). Als Reaktandgas diente Methan. Die dafür

benötigten Elektronen wurden durch ein Rheniumfilament bei 70 eV erzeugt. Der Multiplier wurde auf 450 V eingestellt. Die dwell time betrug 0,08 sec, der inter channel delay 0,02 sec.

Nach Überprüfen der für jedes aromatische Amin typischen Fragmente im Scan-Modus über den Bereich von m/z 50-450 wurde, aufgrund der höheren Empfindlichkeit, im SIM (Single Ion Monitoring)-Modus identifiziert und quantifiziert. Zur Quantifizierung diente das  $[M-HF]^-$  Ion für o-Toluidin, 4-ABP und d<sub>5</sub>-4-ABP bzw. das  $[M-dF]^-$  Ion für d<sub>9</sub>-o-Toluidin.

### 2.3.1.2 Berechnung des Gehalts an aromatischen Aminen

Für die quantitative Bestimmung wurde die Peakfläche des entsprechenden Ions durch die Fläche des internen Standards (ISTD) geteilt und mit den Verhältnissen der Molekulargewichte ( $M_{\text{Substanz}}/M_{\text{ISTD}}$ ) und der absoluten Menge des zugesetzten internen Standards (in pg für Hb, in fmol für DNA) multipliziert. Dieser Wert wurde durch die Menge an eingesetztem Hämoglobin (g) bzw. DNA (μg) dividiert. Dadurch erhielt man den Wert an aromatischem Amin in pg/g Hämoglobin bzw. nach Division durch das Molgewicht in fmol/μg DNA.

$$\text{Menge AA} = \left( \frac{\text{Fläche}_{AA} \cdot M_{AA}}{\text{Fläche}_{ISTD} \cdot M_{ISTD}} - \frac{\text{Fläche}_{AA \text{ Blindwert}}}{\text{Fläche}_{ISTD \text{ Blindwert}}} \right) \cdot \frac{\text{absolute Menge}_{ISTD}}{\text{absolute Menge}_{\text{Hämoglobin / DNA}}}$$

Um eine korrekte Berechnung zu erhalten, wurde der Blindwert, der sich aus den parallel aufgearbeiteten Wasserproben ergab, in gleicher Form berechnet und abgezogen.

## 2.3.2 Validierung

### 2.3.2.1 GC-MS-Anlage

#### 2.3.2.1.1 Identifizierung der aromatischen Amine

Zur Identifizierung der aromatischen Amine und der internen Standards wurden 50 ng jeder Substanz derivatisiert, in 10 μL Toluol resuspendiert und 1 μL jeder Lösung im Scan Modus vermessen.

#### 2.3.2.1.2 Überprüfung der Präzision der GC-MS Anlage

Es wurde jeweils eine Lösung von derivatisierten aromatischen Aminen und internen Standards mit der Konzentration 16 pg/μL hergestellt. Von dieser Lösung wurde fünfmal 1 μL eingespritzt und auf den entsprechenden Massenspuren der jeweiligen Amine vermessen.



### 2.3.2.1.3 Überprüfung der Geräteempfindlichkeit

Zur Überprüfung der Geräteempfindlichkeit wurde jeweils 1 ng der aromatischen Amine und der internen Standards derivatisiert. Aus dieser derivatisierten Menge wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentration entsprechend Tabelle 2 hergestellt und jeweils 1  $\mu\text{L}$  per GC-MS vermessen.

**Tabelle 2: Verdünnungsreihe der aromatischen Amine**

	Verdünnung mit Hexan	Endkonzentration [pg/ $\mu\text{L}$ ]
AA-1	1,0 ng in 100 $\mu\text{L}$	100,0
AA-2	10 $\mu\text{L}$ AA-1 ad 20 $\mu\text{L}$	5,0
AA-3	10 $\mu\text{L}$ AA-1 ad 50 $\mu\text{L}$	2,0
AA-4	10 $\mu\text{L}$ AA-1 ad 100 $\mu\text{L}$	1,0
AA-5	10 $\mu\text{L}$ AA-1 ad 200 $\mu\text{L}$	0,5
AA-6	10 $\mu\text{L}$ AA-1 ad 500 $\mu\text{L}$	0,1
AA-7	10 $\mu\text{L}$ AA-1 ad 1000 $\mu\text{L}$	0,05

### 2.3.2.1.4 Erstellung einer Kalibrierkurve für die aromatischen Amine

Die Kalibrierung der aromatischen Amine und ihrer internen Standards erfolgte im Konzentrationsbereich von 0,05-5,0 pg. Jede Lösung wurde wie unter 2.2.3 beschrieben, derivatisiert und in 10 bzw. 20  $\mu\text{L}$  Toluol resuspendiert. Jeweils 1  $\mu\text{L}$  wurde schließlich per GC-MS analysiert (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Verdünnungsschema für die Erstellung einer Kalibriergeraden**

derivatisierte Menge AA [pg]	verdünnen mit Toluol [ $\mu\text{L}$ ]	Endkonzentration [pg/ $\mu\text{L}$ ]
50,0	10	5,0
20,0	10	2,0
10,0	10	1,0
5,0	10	0,5
2,0	10	0,2
1,0	10	0,1
1,0	20	0,05

### 2.3.2.2 Hämoglobinproben

Als Richtlinie für die Methodvalidierung dient die Arbeit von Needham [86]. Die Richtigkeit der Methode kann entweder über den Vergleich mit einer Standardmethode erfolgen oder durch Zusatz verschiedener Standardkonzentrationen mit der so genannten Standard-Additionsmethode. Die qualitative Genauigkeit beschreibt die Wiederholbarkeit der Retentionszeiten, die quantitative Genauigkeit diejenige der Peakflächen [87].

Zur Überprüfung der Linearität bei den Blutproben wurde aus gepooltem Hämoglobin eine Verdünnungsreihe erstellt. Die gemessenen Werte sollten in linearem Zusammenhang zu den Konzentrationen stehen. Das Limit of Quantification (LOQ) sowie das Detektionslimit (LOD) wurden bestimmt. Werte unterhalb des Detektionslimits wurden mit n.d. (nicht detektierbar) angegeben. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgte ebenfalls aus gepooltem Humanblut. Da man nicht davon ausgehen kann, dass Humanblutproben frei von aromatischen Aminen sind, wurde die Methode nur durch Zusatz der internen Standards  $d_9$ -o-Toluidin und  $d_5$ -4-ABP entsprechend der oben erwähnten Standardadditionsmethode überprüft.

#### 2.3.2.2.1 Erstellung einer Eichgeraden aus gepooltem Humanhämoglobin

Zur Erstellung einer Eichgeraden und der Überprüfung der Detektions- und Bestimmungsgrenzen wurde jeweils 1 g des gepoolten Humanhämoglobins mit verschiedenen Mengen des Standardmixes aus  $d_9$ -o-Toluidin und  $d_5$ -4-ABP (je 8 pg/ $\mu$ L) versetzt, wie in 2.2.1 beschrieben aufgearbeitet und jeweils 1  $\mu$ L vermessen (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Eichgeraden für die internen Standards aus Hämoglobin**

Probe	zugesetzte Menge Standardmix [ $\mu$ L]	zugesetzte Menge ISTD [pg]	Konzentration ISTD [pg/g Hb]
P1	20,0	160,0	160,0
P2	15,0	120,0	120,0
P3	10,0	80,0	80,0
P4	5,0	40,0	40,0
P5	2,0	16,0	16,0
P6	1,0	8,0	8,0
P7	0,5	4,0	4,0

### 2.3.2.2.2 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Es wurden 5 Proben von jeweils 250 mg gepooltem Hämoglobin mit 160 pg der internen Standards  $d_9$ -o-Toluidin und  $d_5$ -4-ABP versetzt, wie unter 2.2.1 aufgearbeitet und 1  $\mu$ L in der GC-MS vermessen. Das Ergebnis wurde mit den derivatisierten Standards in organischen Lösungsmitteln, die keiner weiteren Aufarbeitung unterworfen waren, verglichen und berechnet.

### 2.3.2.3 Urin-Proben

Da im Zuge dieser Doktorarbeit nur eine geringe Anzahl an Urinproben zur Verfügung stand und die Ausbeute an Urothelien relativ gering ausfiel, erfolgte die Validierung der Methode durch Zusatz der aromatischen Amine zu Lachssperma-DNA.

#### 2.3.2.3.1 Erstellung einer Eichgeraden aus Lachssperma-DNA

Entsprechend Tabelle 5 wurden 8 Lösungen, die 100  $\mu$ g Lachssperma-DNA enthielten, mit unterschiedlichen Mengen des Standardmixes aus  $d_9$ -o-Toluidin und  $d_5$ -4-ABP versetzt und entsprechend der Methode aus 2.2.2 aufgearbeitet und vermessen.

**Tabelle 5: Verdünnungsreihe für  $d_5$ -4-ABP und  $d_9$ -o-Toluidin aus Lachssperma-DNA**

Probe	zugeetzte Menge Standardmix [ $\mu$ L]	zugeetzte Menge ISTD [pg]	Konzentration ISTD [pg/ $\mu$ g DNA]
P1	20,0	160,0	1,6
P2	15,0	120,0	1,2
P3	10,0	80,0	0,8
P4	5,0	40,0	0,4
P5	2,0	16,0	0,16
P6	1,0	8,0	0,08
P7	0,5	4,0	0,04
P8	0,25	2,0	0,02

#### 2.3.2.3.2 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate wurde ebenfalls aus einer Lachssperma-DNA-Lösung der Konzentration 0,5 mg/mL bestimmt. Es wurden 5 Proben mit jeweils 160 pg von  $d_9$ -o-Toluidin und  $d_5$ -4-ABP versetzt und entsprechend der unter 2.2.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet.

Die absolute Wiederfindungsrate wurde anhand der gleichen Menge derivatisierter interner Standards in organischen Lösungsmitteln, die keiner weiteren Aufarbeitung unterworfen waren, verglichen und berechnet.

### **2.3.3 Statistik**

Zur Berechnung der Absolutwerte, sowie der Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (S.D. = standard deviation), Standardabweichung vom Mittelwert und der Mediane wurden die Programme Microsoft Excel 2002 (Microsoft, Seattle, USA) und WinSTAT für EXCEL (Greulich Software, Staufen) sowie das Programm GraphPad Prism V.4.01 (GraphPad Inc., San Diego, USA) verwendet. Mit letzterem wurden auch die linearen Regressionen berechnet. Dabei wurde die Quadratsumme aller Messpaare ohne Gewichtung minimiert.

Für die Berechnung der Mittelwerte werden Proben unterhalb des LOD mit einbezogen. Für diese Proben wird der Wert des jeweiligen halben LOD eingesetzt.

Soweit nicht anders angegeben werden die Ergebnisse als Mittelwerte mit S.D., bei Doppelbestimmungen als Mittelwerte mit der Schwankung um den Mittelwert angegeben, die Anpassung der berechneten Werte der linearen Regression an die Messwerte mit dem Bestimmtheitsmaß  $r^2$ , dessen Quadratwurzel  $r$  den Korrelationskoeffizienten darstellt.

## Ergebnisse

### 2.4 Analytik

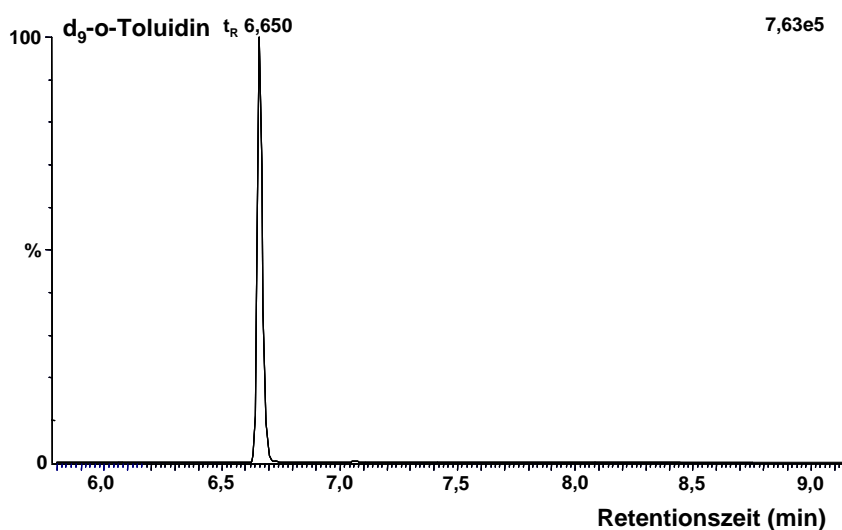
#### 2.4.1 Identifizierung der aromatischen Amine

Zur Identifizierung der aromatischen Amine und der internen Standards wurden jeweils 500 pg der Substanzen im Scan-Modus vermessen. Die dementsprechenden Chromatogramme sind in den Abbildungen 17-20 wiedergegeben. Im NCI-Modus entstanden verschiedene Fragmente, unter anderem das  $[M-HF]^-$ -Ion und das  $[M-F]^-$ -Ion, wobei das  $[M-HF]^-$ -Ion den Basispeak bildete. Da der Basispeak für jede Substanz charakteristisch ist, wurden auf den entsprechenden Massenspuren der jeweiligen Substanzen im SIM-Modus gemessen. Tabelle 6 zeigt Massenspuren und Retentionszeiten der einzelnen Amine und internen Standards.

**Tabelle 6: Fragmente und Retentionszeiten der aromatischen Amine und ihrer ISTD**

Substanz	Massenspur m/z	Retentionszeit [min] <sup>1</sup>
o-Toluidin	283,0432	5,994-6,652
d <sub>9</sub> -o-Toluidin	290,0864	5,944-6,681
4-ABP	345,0588	13,119-13,764
d <sub>5</sub> -4-ABP	350,0897	13,123-13,715

<sup>1</sup>Retentionszeiten können je nach Säulenlänge variieren



**Abbildung 17: Chromatogramm von d<sub>9</sub>-o-Toluidin im SIM-Modus bei m/z 290**

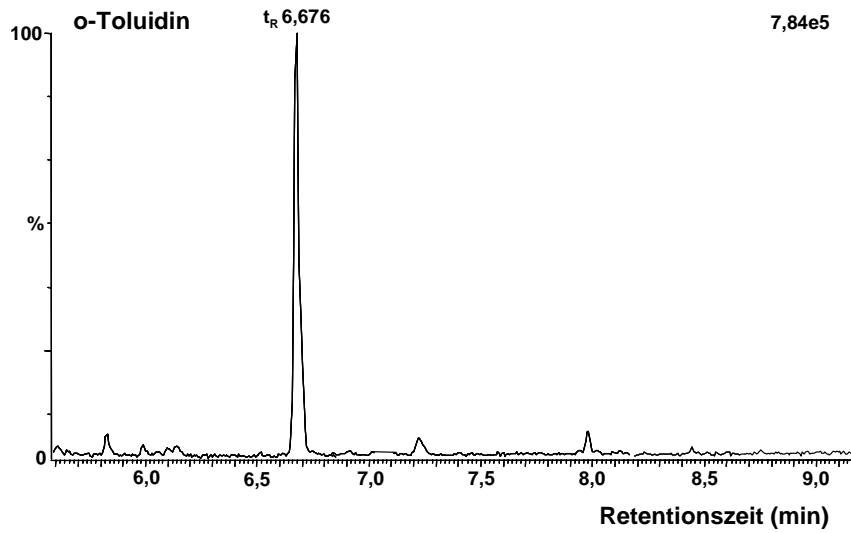


Abbildung 18: Chromatogramm von o-Toluidin im SIM-Modus bei m/z 283

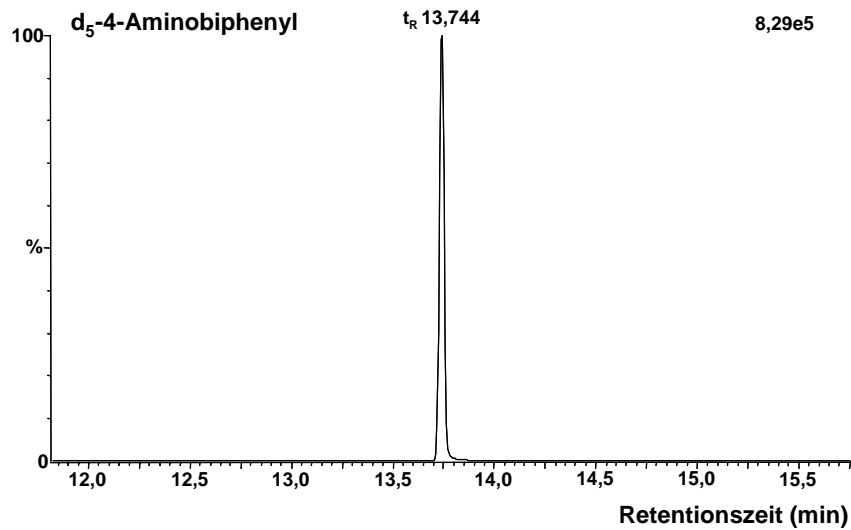


Abbildung 19: Chromatogramm von d<sub>5</sub>-4-ABP im SIM-Modus bei m/z 350

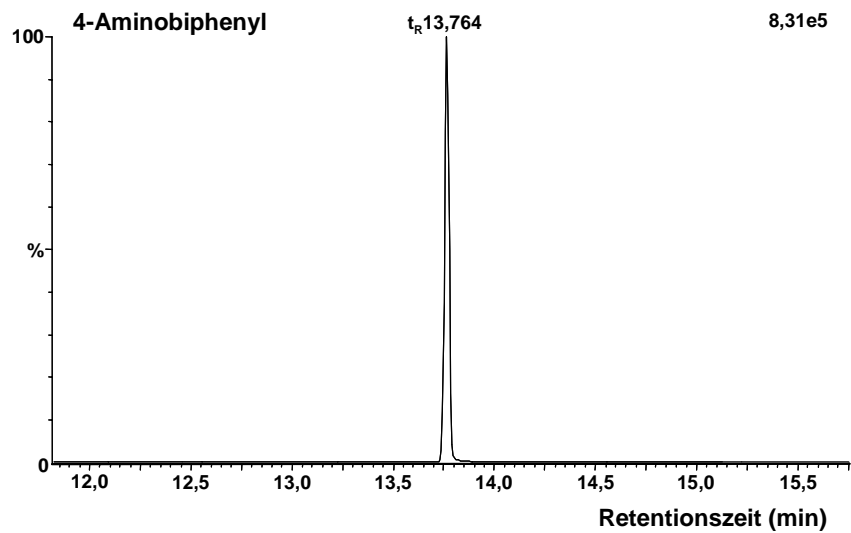


Abbildung 20: Chromatogramm von 4-ABP im SIM-Modus bei m/z 345

## 2.4.2 Überprüfung der Präzision der GC-MS Anlage

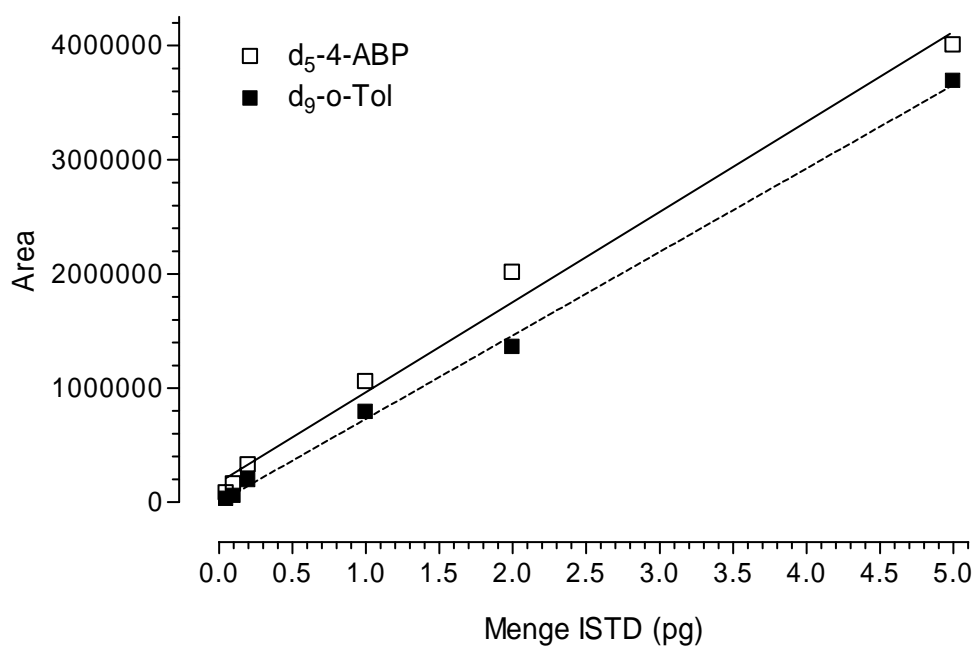
Aus einer Lösung von aromatischen Aminen und zugehörigen internen Standards der Konzentration 16 pg/ $\mu$ L wurde fünfmal je 1  $\mu$ L eingespritzt und auf den entsprechenden Massenspuren vermessen (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Wiederholte Messungen von 16 pg der Testsubstanzen in der GC-MS Anlage (M.W. $\pm$ S.D.; N=5)**

Substanz	Flächeneinheiten	Abweichung vom Mittelwert (%)
o-Toluidin	10148022 $\pm$ 303136	2,99
d <sub>9</sub> -o-Toluidin	10858300 $\pm$ 304635	2,81
4-ABP	11351493 $\pm$ 591344	5,21
d <sub>5</sub> -4-ABP	10947167 $\pm$ 458375	4,19

### 2.4.2.1 Bestimmung von Linearität und Nachweisempfindlichkeit

Aus einer Standardlösung, mit den derivatisierten aromatischen Aminen und internen Standards in einer Konzentration von 100 pg/ $\mu$ L, wurde eine Verdünnungsreihe mit 0,05-5,0 pg erstellt und vermessen. Für beide Substanzen konnten 50 fg noch mit einem S/N von 4 zu 1 quantifiziert werden. (Abbildungen 21 und 22)



**Abbildung 21: Kalibriergeraden der internen Standards**

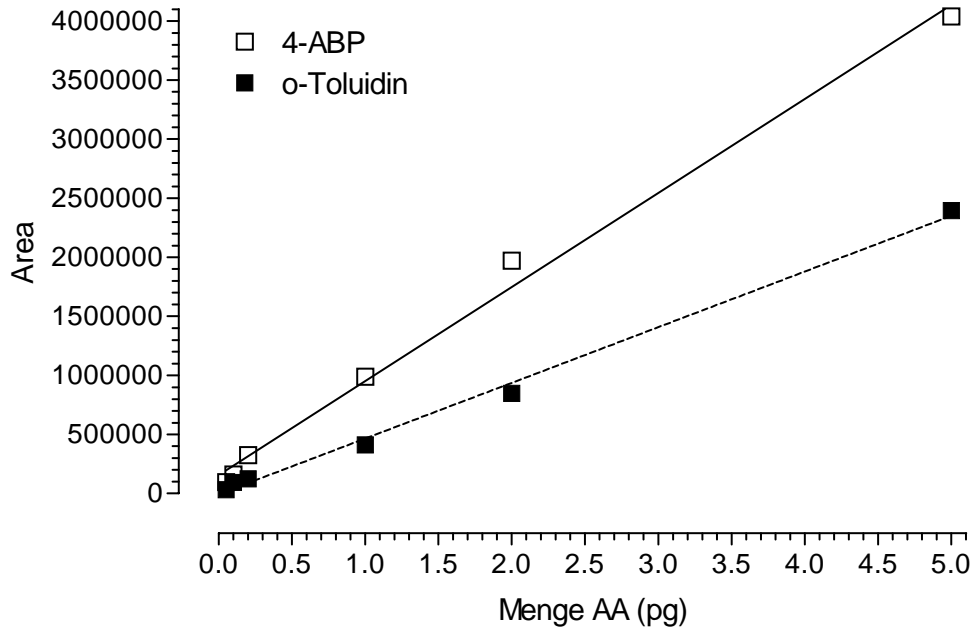


Abbildung 22: Kalibriergeraden für die aromatischen Amine

## 2.4.3 Methode zur Bestimmung von Hämoglobinaddukten aromatischer Amine

### 2.4.3.1 Identifizierung der aromatischen Amine in Humanblutproben

Zur Identifizierung von o-Toluidin und 4-ABP wurden die Hämoglobinproben im SIM-Modus auf den charakteristischen Massenspuren vermessen. Die Identifizierung der Amine erfolgte über deren zugehörigen internen Standard (Abbildung 23).

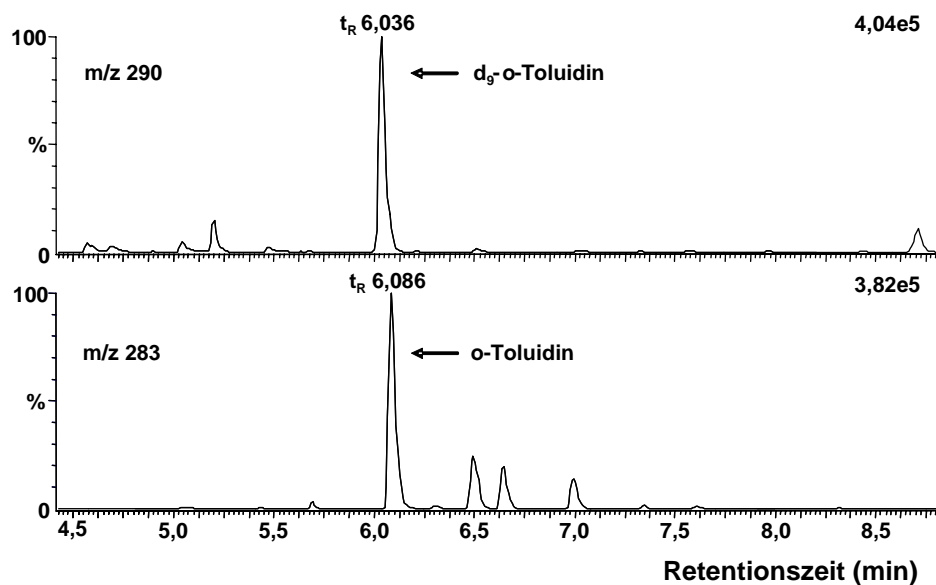


Abbildung 23: Chromatogramm einer Humanblutprobe, aufgenommen im SIM-Modus. Dargestellt sind  $d_9$ -o-Toluidin bei  $m/z$  290 (oben) und o-Toluidin bei  $m/z$  283 (unten)



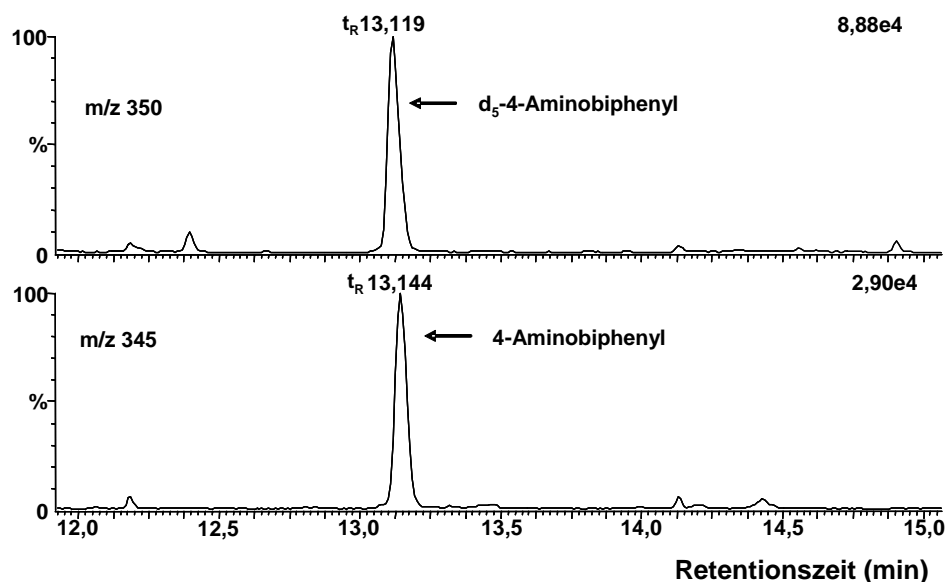


Abbildung 24: Chromatogramm von  $d_5$ -4-ABP und 4-ABP aus einer Humanblutprobe, aufgenommen jeweils im SIM-Modus bei den entsprechenden Massenspuren m/z 345 und m/z 350

#### 2.4.3.2 Linearität und Nachweisgrenze

Die Bestimmtheitsmaße beider Verdünnungsreihen (Abbildung 25) liegen bei  $r^2=0,9965$  für  $d_9$ -o-Toluidin, sowie bei  $r^2=0,9986$  für das deuterierte 4-ABP. Beide interne Standards konnten bis zu einer Menge von 4 pg/g Hb mit einem Signal/Rausch Verhältnis von größer drei quantifiziert werden. Das LOQ lag jeweils bei 8 pg/g Hb.

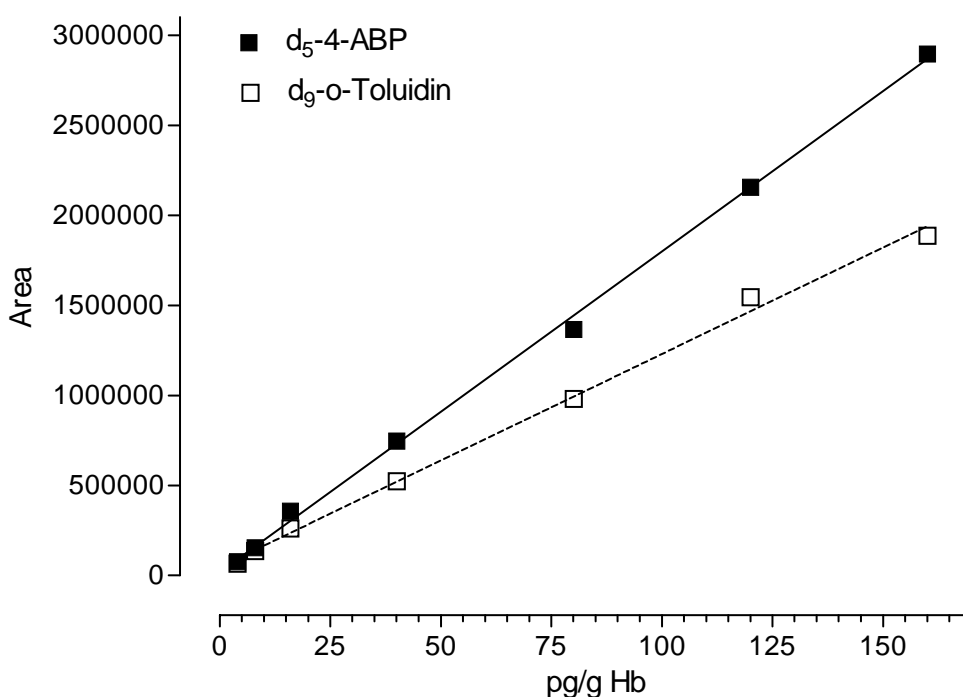


Abbildung 25: Kalibrierkurven für  $d_9$ -o-Toluidin und  $d_5$ -4-ABP aus Hämoglobin im Bereich von 4 pg/g Hb bis 160 pg/g Hb

### 2.4.3.3 Wiederfindung der internen Standards

Die Wiederfindung bei einer zugesetzten Menge von 16 pg internen Standards je Mikroliter Probe liegt für  $d_9$ -o-Toluidin bei 57,4%, für  $d_5$ -4-ABP bei 59,7% (Tabelle 8).

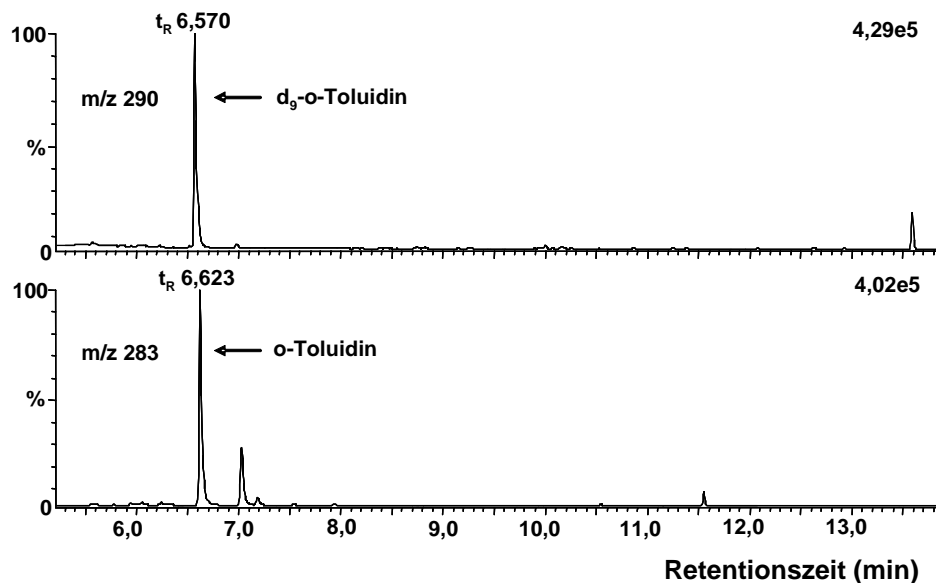
**Tabelle 8: Wiederfindung der internen Standards aus Rinderhämoglobin (M.W.±S.D.; N=5)**

Substanz	$d_9$ -o-Toluidin	$d_5$ -4-ABP
Flächeneinheit	6054397±206823	8858740±941561
Wiederfindung [%]	57,4±3,4	59,7±10,6

## 2.4.4 Methode zur Bestimmung der DNA-Addukte aromatischer Amine aus Urin

### 2.4.4.1 Identifizierung der aromatischen Amine

Zur Identifizierung von o-Toluidin und 4-ABP wurden die Lachssperma-DNA-Proben im SIM-Modus auf den charakteristischen Massenspuren vermessen. Die Identifizierung der Amine erfolgte über deren zugehörigen internen Standard (Abbildungen 26 und 27).



**Abbildung 26: Chromatogramm von  $d_9$ -o-Toluidin und o-Toluidin aus einer Lachssperma-DNA-Probe, aufgenommen jeweils im SIM bei den entsprechenden Massenspuren  $m/z$  283 und  $m/z$  290**

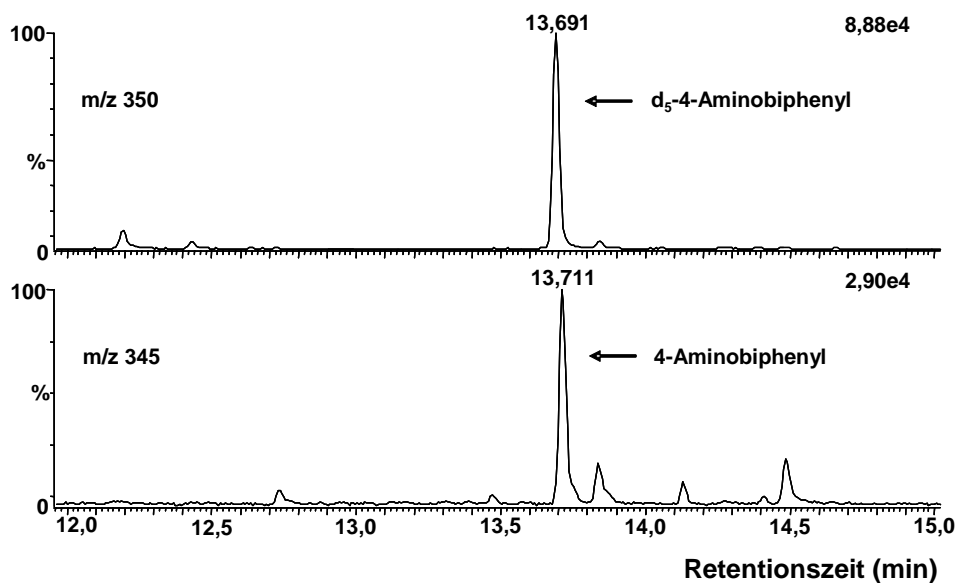


Abbildung 27: Chromatogramm von  $d_5$ -4-ABP und 4-ABP aus einer Lachssperma-DNA-Probe, aufgenommen jeweils im SIM bei den entsprechenden Massenspuren m/z 345 und m/z 350

#### 2.4.4.2 Linearität und Nachweisgrenze

Die Bestimmtheitsmaße beider Verdünnungsreihen liegen bei  $r^2=0,9992$  für  $d_9$ -o-Toluidin, sowie bei  $r^2=0,9981$  für das deuterierte 4-ABP. Beide interne Standards konnten bis zu einer Menge von 0,02 pg/ $\mu$ g DNA mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von größer drei quantifiziert werden, das LOQ lag jeweils bei 0,04 pg/ $\mu$ g DNA (Abbildung 28).

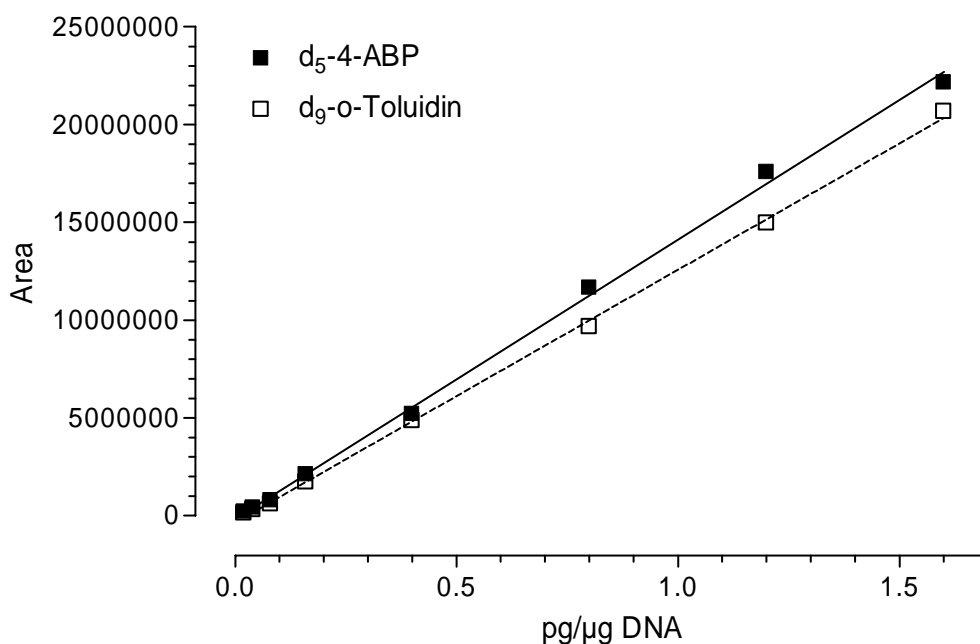


Abbildung 28: Kalibrierung der internen Standards aus Lachssperma-DNA

### 2.4.4.3 Wiederfindung der internen Standards

Die Wiederfindung der internen Standards (16 pg/ $\mu$ L) aus einer Lachssperma-DNA-Lösung beträgt 96,7% für d<sub>9</sub>-o-Toluidin und 82,5% für d<sub>5</sub>-4-ABP (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Wiederfindung der ISTD aus Lachssperma-DNA (M.W.±S.D.; N=5)**

Substanz	d <sub>9</sub> -o-Toluidin	d <sub>5</sub> -4-ABP
Flächeneinheit	12746734±467543	13514091±487220
Wiederfindung [%]	96,7±3,7	82,5±3,6

## 2.5 Bestimmung der Hämoglobinaddukte der HNO-Patienten

### 2.5.1 Probanden

Im Rahmen der Studie wurden 23 Humanblutproben untersucht (Tabelle 10). Es handelte sich dabei um 8 weibliche und 15 männliche Probanden. Unter allen Probanden fanden sich 11 Raucher und 12 Nichtraucher, deren Rauchstatus anhand des Fragebogens erfragt wurde. Das Alter der Probanden lag im Mittel bei 52 Jahren (17-81 Jahre), das durchschnittliche Gewicht betrug 75 kg (55 -108 kg) bei einer mittleren Körpergröße von 172 cm (157-198 cm). Die verabreichte Menge Prilocain betrug 100 mg, 3 Probanden erhielten eine Menge von 50 mg, 120 mg bzw. 200 mg. Für die Berechnung der Mittelwerte wurden nur Probanden berücksichtigt, die 100 mg Prilocain erhalten haben. Bei den Probanden handelte es sich um Patienten der HNO-Abteilung der Poliklinik der LMU, München, die aufgrund verschiedener operativer Eingriffe wie beispielsweise kleinerer Tumorentfernungen im HNO-Bereich mit Prilocain lokal betäubt wurden (Tabelle 17 im Anhang).

**Tabelle 10: Demographische Daten und Angaben der Probanden laut Fragebogen**

Prilocaindosis	50 – 200 mg	100 mg
Anzahl Probanden	23	20
Geschlecht, m/w	15 / 8	12 / 8
Alter [Jahre], M.W.±S.D. (Min./Max.)	51±19 (17/81)	51±20 (17/81)
Gewicht [kg], M.W.±S.D. (Min./Max.)	72±15 (50/108)	75±14 (55/108)
Größe [cm], M.W.±S.D. (Min./Max.)	171±10 (157/198)	172±10 (157/198)
Raucherstatus, Ja / Nein	11 / 12	8 / 12
Tumor, Ja / Nein	12 / 11	9 / 11

## 2.5.2 Bestimmung der Hämoglobinaddukte

### 2.5.2.1 Hämoglobinaddukte von *o*-Toluidin

#### 2.5.2.1.1 Addukte vor und nach der Gabe von Prilocain

Die Hb-Addukte von *o*-Toluidin vor und nach der Gabe von Prilocain zeigten bei allen Probanden deutliche Unterschiede. Im Mittel lagen die Werte vor der Anästhesie bei 667 pg/g Hämoglobin, wobei der niedrigste Wert mit 61 pg/g Hb und der höchste mit 4832 pg/g Hb gemessen wurden. Der 24 h-Wert betrug durchschnittlich 22629 pg/g Hb. Als untere Grenze konnten 4366 pg/g Hb bestimmt werden, während der höchste gemessene Wert bei 57656 pg/g Hb lag. Für die Berechnung der Mittelwerte wurde eine Patientin nicht herangezogen, da der 0 h-Wert mit 40980 pg/g Hb bereits mehr als 60-fach gegenüber dem Mittel aller anderen 0 h-Werte erhöht war (Tabelle 11, Abbildung 29). Die Abbildung 30 zeigt die Chromatogramme der Blutproben eines Probanden vor und nach Prilocaingabe. Bei den Basalwerten vor Prilocainbehandlung war kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern ( $317 \pm 225$  pg/g Hb) und Nichtrauchern ( $909 \pm 1356$  pg/g Hb) gegeben ( $p=0,1873$ ).

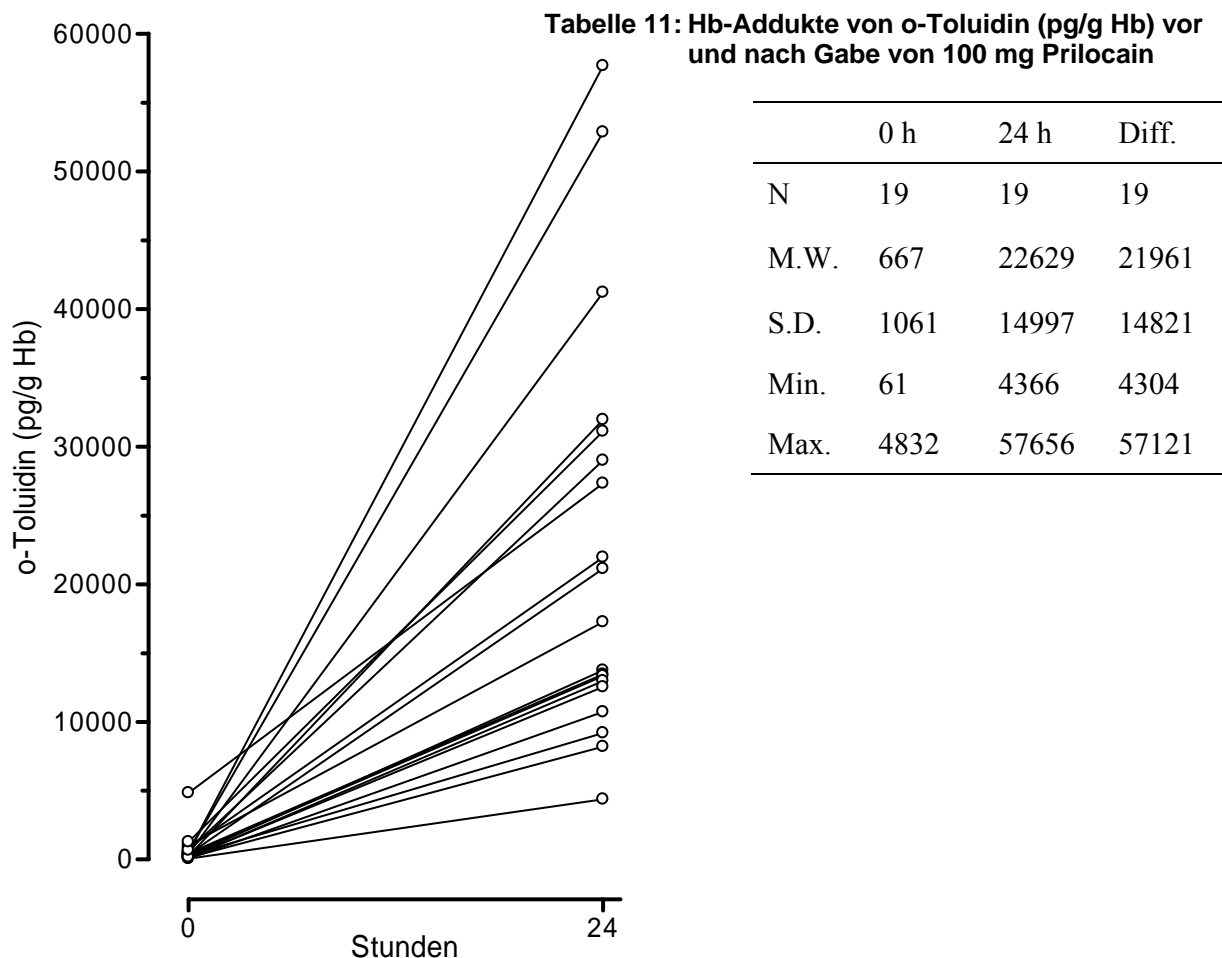
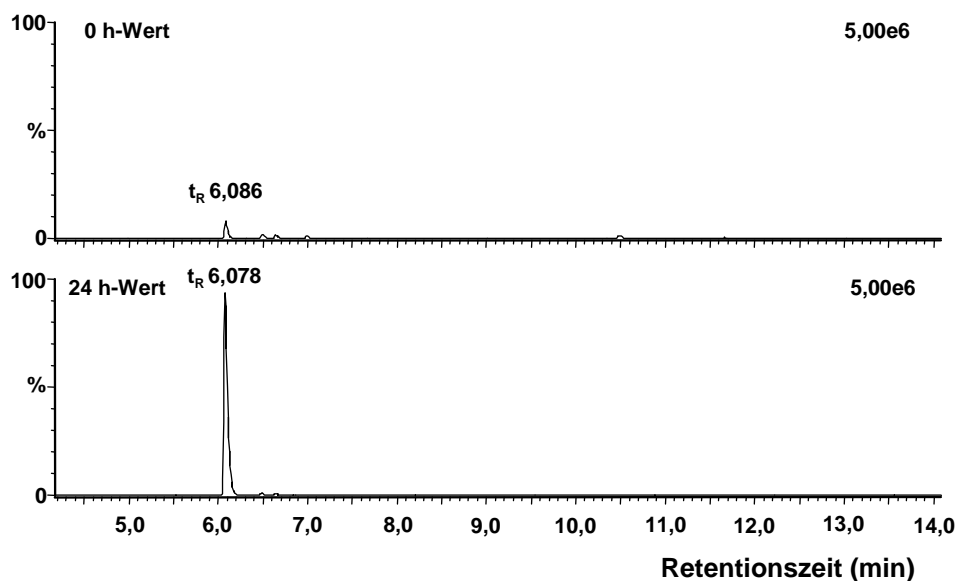


Abbildung 29: Hb-Addukte von *o*-Toluidin vor und nach Applikation von 100 mg Prilocain



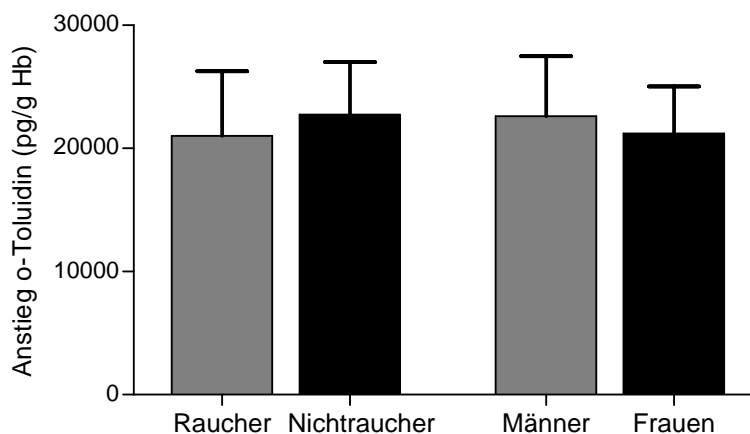
**Abbildung 30: Chromatogramm von o-Toluidin in einer Humanblutprobe vor (oben) und nach (unten) einer Anästhesie mit Prilocain**

#### 2.5.2.1.2 Absoluter Anstieg nach Prilocaingabe

Die Unterschiede zwischen den Hb-Addukten vor und nach der Prilocaingabe lagen bei den 20 Patienten bei  $22036 \pm 14430$  pg/g Hb mit einem Maximalwert von 57121 pg/g und einem Minimalwert von 4304 pg/g.

#### 2.5.2.1.3 Absoluter Anstieg in Abhängigkeit vom Raucherstatus und Geschlecht

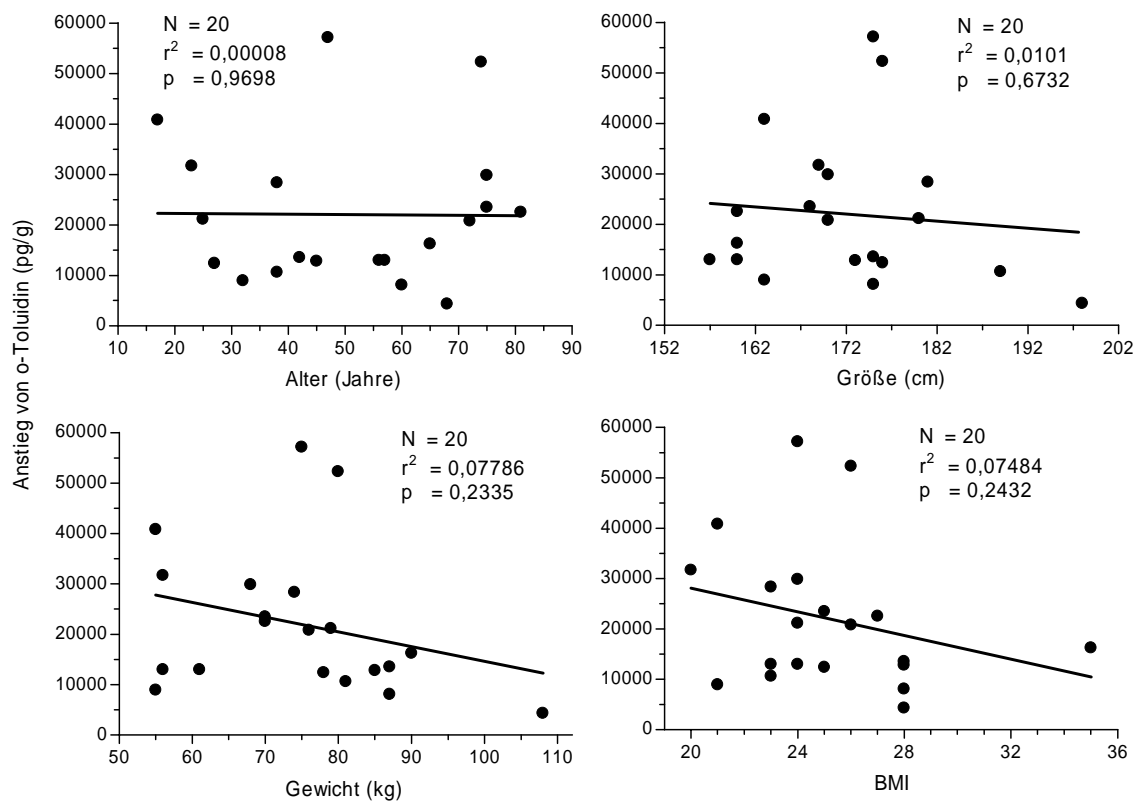
Der mittlere Anstieg der Addukte betrug bei den 8 Rauchern 21006 pg/g Hb, bei den 12 Nichtrauchern lag der Mittelwert bei 22723 pg/g Hb. Somit war keine Abhängigkeit vom Rauchen gegeben. Das Gleiche gilt für die Abhängigkeit vom Geschlecht. Hier unterscheiden sich die mittleren Anstiege zwischen den 12 Männern, 22598 pg/g Hb, und den 8 Frauen, 21194 pg/g Hb, ebenfalls nicht (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Anstieg in Abhängigkeit von Raucherstatus und Geschlecht**

#### 2.5.2.1.4 Absoluter Anstieg in Abhängigkeit von Alter, Gewicht, Größe und BMI

Die Korrelationen zwischen dem Anstieg der Hb-Addukte von o-Toluidin nach Prilocaingabe und verschiedenen Körpermerkmalen werden in Abbildung 32 gezeigt. Die verwendeten Daten beziehen sich dabei nur auf Probanden, die 100 mg Prilocain erhalten haben. Es ergaben sich keine signifikanten Korrelationen des Anstiegs der Hb-Addukte mit Alter, Größe, Gewicht oder BMI. Es lässt sich jedoch eine Tendenz in Abhängigkeit von Gewicht und BMI erkennen. Der Anstieg der Addukte sinkt mit steigendem Gewicht und BMI.



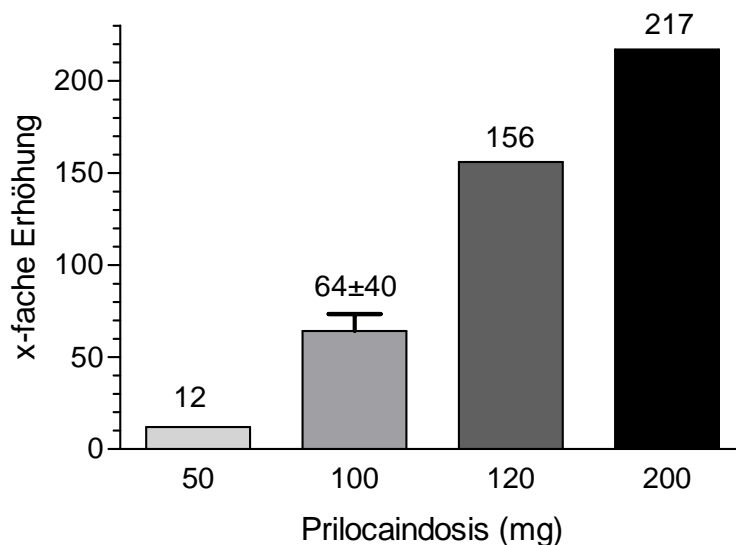
**Abbildung 32: Anstieg der Hb-Addukte von o-Toluidin in Abhängigkeit von Alter, Größe, Gewicht und BMI**

#### 2.5.2.1.5 Relativer Anstieg nach Prilocaingabe

Bei 19 Probanden, die mit 100 mg Prilocain behandelt worden waren, stiegen die Hb-Addukte von o-Toluidin im Mittel um das 64-fache an. In der Spitze konnte eine 152-fache Erhöhung festgestellt werden. Der niedrigste 24 h-Wert war um das 6-fache höher als der entsprechende 0 h- Wert. Bei dem Probanden, der wegen seines hohen 0 h-Wertes nicht in die Berechnungen aufgenommen wurde, betrug die Erhöhung nur das zweifache.

Die Abhängigkeit der Erhöhung der Hb-Addukte von o-Toluidin von der verabreichten Menge an Prilocain wird in Abbildung 33 deutlich. Nach Anästhesie mit 50 mg zeigt sich eine

deutlich geringere Erhöhung als nach Verabreichung höherer Prilocainmengen. Es sei darauf hingewiesen, dass es sich den Daten für 50 mg, 120 mg und 200 mg jeweils nur um Einzelwerte handelt.



**Abbildung 33: Abhängigkeit der Erhöhung von der verabreichten Menge Prilocain**

### 2.5.2.2 Hämoglobinaddukte von 4-ABP

#### 2.5.2.2.1 Vor und nach Gabe von Prilocain

Die Hb-Addukte von 4-ABP zeigen keinen Anstieg in Abhängigkeit von der Prilocainbehandlung (Tabelle 12). Bei den ersten zwei Patienten wurden die 4-ABP Addukte noch nicht bestimmt. Bei drei weiteren Patienten lagen die Adduktwerte 24 Stunden nach Prilocain unter der Nachweisgrenze. Für diese Werte wurde die Hälfte des LOD (4 pg) in die Berechnung aufgenommen.

**Tabelle 12: Hb-Addukte von 4-ABP (pg/g Hb) vor und nach Prilocaingabe**

	0 h-Wert	24 h-Wert
Anzahl	21	21
M.W.±S.D.	77±79	73±98
Minimum	4,3	< 4,0
Maximum	296	305



### 2.5.2.2.2 Abhängigkeit vom Rauchstatus

Die Abhängigkeit der Hb-Addukte des 4-ABP vom Rauchstatus konnte deutlich nachgewiesen werden. Raucher haben dabei wesentlich höhere Addukte als Nichtraucher. Zur Berechnung der Werte wurden für jeden Probanden jeweils die Mittelwerte aus den 0 h- und 24 h- Werten herangezogen. Die Addukte bei den Nichtrauchern liegen im Mittel bei  $25,0 \pm 19,0$  pg/g Hb, während sie bei den Rauchern mit  $129,8 \pm 96,0$  pg/g Hb im Durchschnitt deutlich höher sind. Wie aus der Abbildung 34 hervorgeht gibt es trotzdem eine gewisse Überlappung zwischen den Werten für Nichtraucher und Raucher. Die Minimal- und Maximalwerte betragen bei Nichtrauchern 4 und 53 pg/g, bei Rauchern 8 und 301 pg/g.

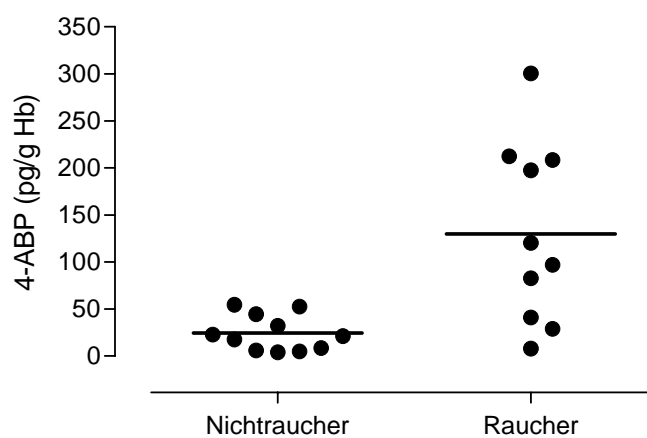


Abbildung 34: Abhängigkeit der Hb-Addukte von 4-ABP vom Raucherstatus

## 2.6 Prilotstudie

### 2.6.1 Probanden

Es wurde 6 männlichen Probanden jeweils 100 mg Prilocain (10 mL Xylonest<sup>®</sup> 1%) in eine Bauchfalte gespritzt. Blut wurde unmittelbar vor und 24 Stunden nach der Injektion gesammelt. Der gesamte Urin wurde von den Probanden jeweils 24 Stunden vor und bis 24 Stunden nach der Injektion gesammelt. Die Daten zu Alter Gewicht und Größe sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Bei allen Probanden handelte es sich um gesunde Nichtraucher.

Tabelle 13: Demographische Daten und Angaben der Probanden laut Fragebogen

Anzahl	6
Alter [Jahre], M.W.±S.D. (Min./Max.)	32±5 (28/41)
Gewicht [kg], M.W.±S.D. (Min./Max.)	74±7 (64/81)
Größe [cm], M.W.±S.D. (Min./Max.)	183±5 (174/187)

## 2.6.2 Bestimmung der DNA-Addukte aus Urin

### 2.6.2.1 DNA-Addukte von *o*-Toluidin

Die urothelialen DNA-Addukte von *o*-Toluidin vor der Prilocaingabe lagen im Mittel bei 6,2 fmol/ $\mu$ g DNA. Dabei lag der höchste Wert bei 10,4 fmol/ $\mu$ g DNA, während mit 1,3 fmol/ $\mu$ g DNA der niedrigste Wert gemessen wurde (Abbildung 35).

Im Sammelurin 24 Stunden nach der Injektion konnte ein durchschnittlicher Wert von 11,0 fmol/ $\mu$ g DNA gemessen werden. Das Minimum betrug hier 1,6 fmol/ $\mu$ g DNA, der maximale Wert 30,5 fmol/ $\mu$ g DNA.

Ein Anstieg der DNA-Addukte von *o*-Toluidin nach Prilocaingabe konnte nur bei der Hälfte der Probanden festgestellt werden, wobei der größte Unterschied 21,9 fmol/ $\mu$ g DNA oder das 3,5-fache des 0-h Wertes betrug. Im t-Test für verbundene Daten erreicht der Unterschied zwischen den Werten vor und nach Prilocainbehandlung keine Signifikanz ( $p=0,232$ ).

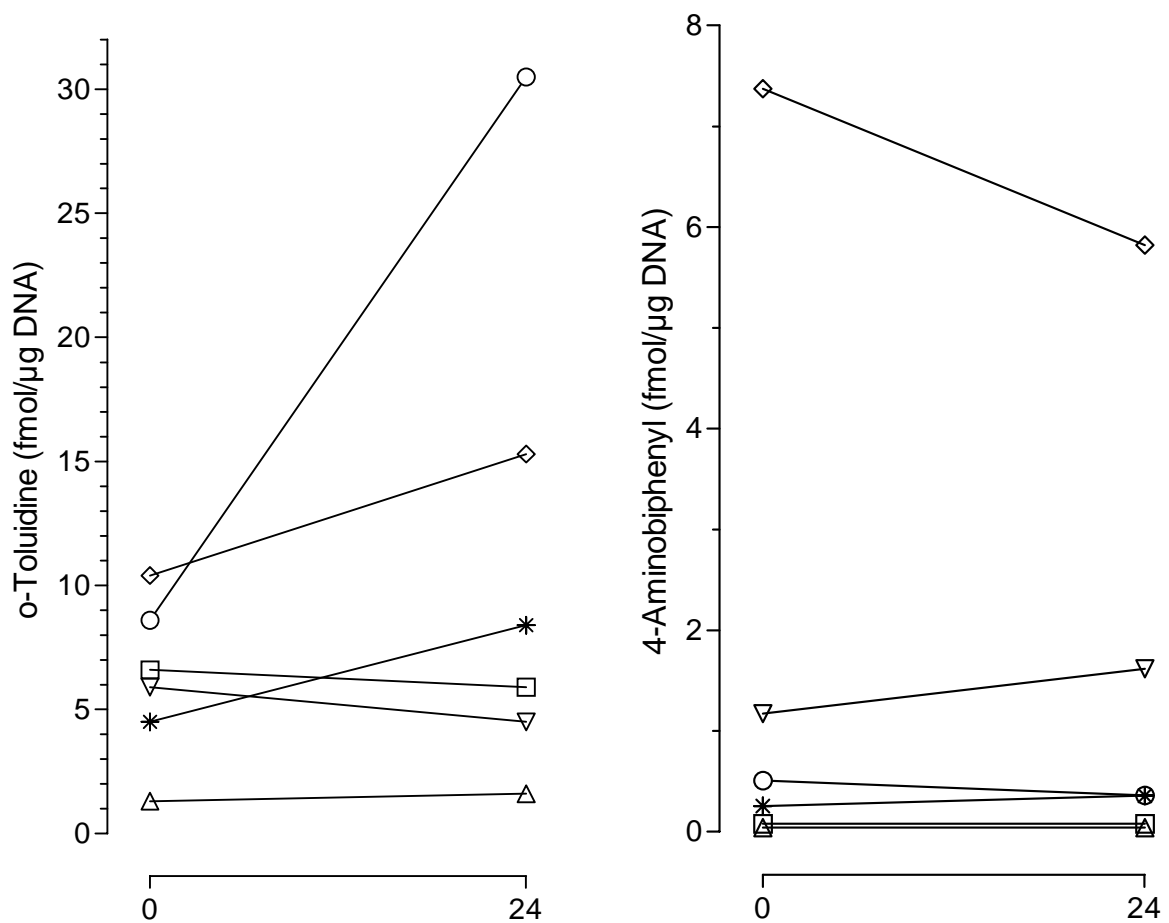


Abbildung 35: Urotheliale DNA-Addukte von *o*-Toluidin und 4-ABP 24 h vor und 24 h nach der s.c. Injektion von 100 mg Prilocain

### 2.6.2.2 DNA-Addukte von 4-ABP

Die Konzentration der DNA-Addukte von 4-ABP war im Mittel viermal niedriger als die von o-Toluidin (Abbildung 35). Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Bei 2 Probanden lagen die Werte sowohl vor wie nach Prilocaininjektion unter der Nachweisgrenze (LOD=0,12 fmol/ $\mu$ g DNA). Es zeigt sich kein Unterschied in Abhängigkeit von der Behandlung

**Tabelle 14: Urotheliale DNA-Addukte (fmol/ $\mu$ g DNA) von o-Toluidin und 4-ABP vor und 24 h nach s.c. Injektion von Prilocain**

	o-Toluidin		4-ABP	
	0 h	24 h	0h	24h
Anzahl	6	6	6	6
M.W. $\pm$ S.D. <sup>1</sup>	6,2 $\pm$ 3,2	11,0 $\pm$ 10,6	1,6 $\pm$ 2,8	1,4 $\pm$ 2,3
Minimum	1,3	1,6	n.d.	n.d.
Maximum	10,4	30,5	7,4	5,8

<sup>1</sup>Für Werte unterhalb des LOD wurden 0,06 fmol/ $\mu$ g DNA eingesetzt.

### 2.6.3 Bestimmung der Hämoglobinaddukte

#### 2.6.3.1 Hämoglobinaddukte von o-Toluidin

Die Hb-Addukte waren bei allen 6 Probanden nach der Gabe von 100 mg Prilocain signifikant höher als vor der Behandlung ( $p < 0,001$ ). Im Mittel lagen die Werte nach 24 h 185-fach über den 0 h-Werten, maximal 359-fach und minimal 107-fach (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Hb-Addukte von o-Toluidin (pg/g Hb) vor und 24 h nach Gabe von 100 mg Prilocain an gesunden Probanden**

	0 h	24 h	Differenz
Anzahl	6	6	6
Mittelwert $\pm$ S.D.	130 $\pm$ 58	20063 $\pm$ 4944	19933 $\pm$ 4908
Minimum	37	13198	13162
Maximum	206	25964	25840

### 2.6.3.2 Hämoglobinaddukte von 4-ABP

Bei den Hb-Addukten von 4-ABP konnte ebenfalls keine Abhängigkeit von der Prilocaingabe festgestellt werden. Die Adduktraten waren vor und nach der Prilocaingabe nahezu identisch (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Hb-Addukte von 4-ABP (pg/g Hb) vor und 24 h nach Gabe von 100 mg Prilocain an gesunde Probanden**

	0 h	24 h
M.W. ± S.D.	56±40	59±57
Minimum	6	17
Maximum	112	170

### 3 Diskussion

Bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts werden aromatische Amine mit der Entstehung von Blasenkrebs in Verbindung gebracht. Rehn führte erstmals 1895 drei Fälle von Blasenkrebs in einer Farbenfabrik auf die Exposition der Arbeiter mit Anilin zurück. Es stellte sich jedoch heraus, dass nicht das schwach kanzerogene Anilin, sondern vielmehr Verunreinigungen und Begleitstoffe wie 2-Naphthylamin, Benzidin und 4-ABP für das Auftreten von Blasenkrebs verantwortlich waren. Diese werden mittlerweile von der IARC in Gruppe 1 sowie von der DFG in der MAK-Liste im Abschnitt III in die Kategorie 1 als „eindeutig kanzerogen für den Menschen“ eingestuft. Neben einer Reihe weiterer aromatischer Amine steht vor allem o-Toluidin ebenfalls im begründeten Verdacht, Blasenkrebs beim Menschen zu verursachen [88]. Es wird allerdings momentan bei IARC (Gruppe 2A) und DFG (Kategorie 2) nur als „wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen“ geführt. Grund hierfür ist die Tatsache, dass in den bisher berücksichtigten Studien eine zusätzlich zum o-Toluidin bestehende Belastung mit anderen Blasenkanzerogenen wie beispielsweise 2-NA und 4-ABP nicht ausgeschlossen werden konnte. o-Toluidin war deshalb nicht als eindeutig verantwortliches Agens für die Blasentumoren zu identifizieren [27]. Mittlerweile existieren allerdings mehrere Studien, in denen o-Toluidin als Humankanzerogen eindeutig identifiziert werden konnte. So konnten Ward et al. [68] bereits im Jahr 1991 in einer Studie über Arbeiter einer Chemiefabrik in New York wiederholt auftretende Fälle von Blasenkrebs auf eine Exposition der Arbeiter mit o-Toluidin zurückführen. Zwar konnte in dieser Studie eine Belastung mit dem schwach kanzerogenen Anilin nicht ausgeschlossen werden. Dennoch wurde aufgrund der Erfahrungen in Tierversuchen o-Toluidin als das wesentlich stärkere Kanzerogen für die Blasentumoren verantwortlich gemacht. Diese Ergebnisse wurden 1996 von Ward et al. [67] und 2004 von Markowitz und Levin [66,89] bestätigt.

Aromatische Amine sind in der Umwelt weit verbreitet. Sie dienen als Ausgangsstoffe zur Herstellung von Farben, Arzneimittel und Pflanzenschutzmittel und sind in Haupt- und Nebenstromrauch von Zigaretten zu finden [12,90]. Zudem konnten sie in Dieselabgasen und Haarfärbemitteln nachgewiesen [55,91] werden. Obgleich die berufliche Exposition zu den größten Belastungen führt, werden eine Reihe von aromatische Aminen auch bei der Allgemeinbevölkerung nachgewiesen. Hierbei ist das Tabakrauchen für einige bicyclische Amine wie 3- und 4-ABP und 2-Naphthylamin als Hauptbelastung zu sehen. Selbst bei diesen Aminen liefert die Passivrauchbelastung nur einen kleinen Beitrag, so dass andere Quellen als Hauptursache für die Grundbelastung der Bevölkerung mit aromatischen Aminen vermutet

werden [49,92]. Um welche Quellen es sich dabei handelt, wird derzeit weltweit von verschiedenen Arbeitsgruppen intensiv erforscht.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, das Lokalanästhetikum Prilocain als eine mögliche Quelle für die Belastung mit o-Toluidin zu identifizieren. Dazu wurden im Rahmen zweier Studien Hämoglobin- und DNA-Addukte von o-Toluidin in Abhängigkeit von Prilocain untersucht.

### **3.1 Prilocain als Lokalanästhetikum**

Prilocain findet zwar seit 1960 Verwendung als Lokalanästhetikum, war aber im Vergleich zu Lidocain von untergeordneter Bedeutung. Erst mit Einführung der eutektischen Mischung EMLA<sup>®</sup> [74,75] und der Tumeszenztechnik [77] hat Prilocain in den letzten Jahren immer größere Bedeutung erlangt. Bei der in den USA von Klein [77] entwickelten Tumeszenzlokalanästhesie werden für eine großflächigen Anästhesie bis zu 6 L einer Tumeszenzlösung infiltriert, die 0,05% Lidocain enthalten. In Deutschland wird in jüngster Zeit diese Rezeptur von Klein abgeändert und bevorzugt Prilocain anstatt Lidocain eingesetzt. Dass dabei die empfohlene Höchstmenge von 7 mg/kg Körpergewicht Prilocain um das 5 bis 8-fache erhöht wird, wird als „bedenkenlos“ bezeichnet, ohne dass bisher ausreichend Studien über mögliche Nebenwirkungen gemacht wurden [93]. Es ist jedoch bereits lange bekannt, dass die Freisetzung von o-Toluidin bei der Metabolisierung von Prilocain zu einer Methämoglobinbildung bei den Patienten führt, die aufgrund der großen Mengen an verabreichtem Prilocain weit mehr als 20% vom Gesamt-Hb ausmachen kann, ein Wert, der bereits als gefährlich eingestuft werden muss [94], insbesondere dann, wenn ein Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel beim Patienten vorliegt. Obwohl diese Nebenwirkung von Prilocain auf der Bildung großer Mengen von o-Toluidin beruht, wurde das mit diesem Metaboliten verbundene Krebsrisiko bisher weitgehend außer Acht gelassen. o-Toluidin hat ein höheres kanzerogenes Potenzial als der Amin-Metabolit von Lidocain, 2,6-Dimethylanilin, der von der WHO im Gegensatz zu o-Toluidin nicht in die Gruppe 2A der wahrscheinlich für den Menschen kanzerogenen Stoffe, sondern nur in die Gruppe 2B der möglicherweise kanzerogenen Stoffe aufgeführt wird.

Der Metabolismus von Prilocain beruht in erster Linie auf der Spaltung der Amidbindung [79]. Nach einer frühen Untersuchung von Hjelm et al. [82] wird das dabei gebildete o-Toluidin vom Menschen hauptsächlich in Form eines Folgemetaboliten, dem p-Hydroxy-o-toluidin über den Urin ausgeschieden. Eine quantitative Bilanz der Prilocainmetabolisierung und

Ausscheidung war damals noch nicht möglich, auch konnte o-Toluidin in diesem Zusammenhang nicht im Plasma nachgewiesen werden. Trotzdem mittlerweile in einer Reihe von Studien zum Prilocainmetabolismus die Konzentration von o-Toluidin im Plasma bestimmt wurde [80,95,96], fehlte bis dato eine Untersuchung der Bindung von o-Toluidin an Hämoglobin und DNA.

## **3.2 Hämoglobinaddukte**

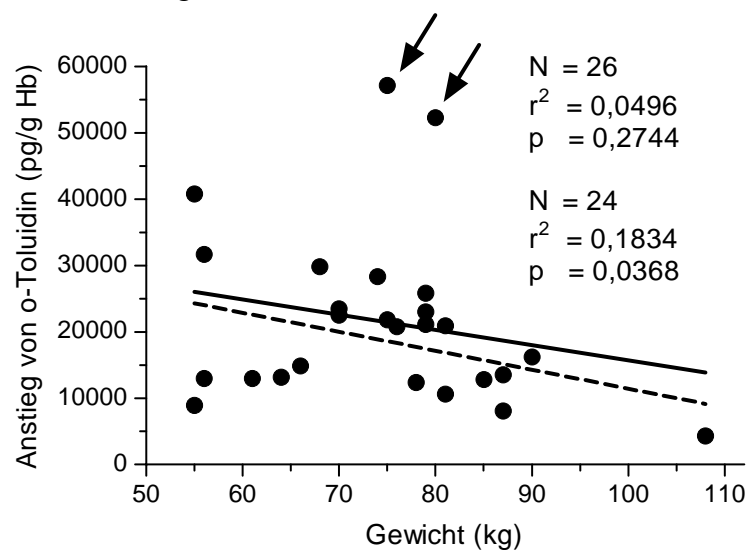
### **3.2.1 Hämoglobinaddukte von o-Toluidin**

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen eine deutliche Zunahme der Hb-Addukte von o-Toluidin bei allen Prilocain-behandelten Probanden. Die 0 h-Werte lagen bei 22 der 23 Patienten der HNO-Studie zwischen 61 und 4832 pg/g Hb, ein Patient hatte einen Basalwert von 40908 pg/g Hb. Bei den 6 gesunden Probanden der Prilotstudie lagen die 0 h-Werte deutlich niedriger und schwankten zwischen 37 und 206 pg/g Hb. Bei 19 der 23 HNO-Patienten, die 100 mg Prilocain erhalten hatten, betragen 24 h nach der Injektion die Werte 4366-57656 pg/g Hb, bei den Probanden der Prilotstudie waren die Werte nach der gleichen Dosis auf 13198-25964 pg/g Hb angestiegen. Die Patientin der HNO-Studie mit dem höchsten Basalwert hatte auch nach der Behandlung mit 64364 pg/g Hb den höchsten Wert, aber mit 23456 pg/g Hb keinen höheren Anstieg als die restlichen Patienten, die nach 100 mg Prilocain eine durchschnittliche Erhöhung der Hb-Addukte von o-Toluidin um 21961 pg/g Hb zeigten. Auch in der Prilotstudie war bei der gleichen Dosis der Anstieg mit 19933 pg/g Hb vergleichbar hoch. Bei drei Patienten der HNO-Studie, die mit 50, 120 und 200 mg eine andere Prilocaindosis bekommen haben, zeigt sich eine Dosisabhängigkeit der Adduktbildung (Abbildung 33), die sich aber wegen der geringen Anzahl von Werten statistisch nicht absichern lässt.

Die im Rahmen dieser Arbeit vor der Prilocaingabe gemessenen Basalwerte der Hb-Addukte von o-Toluidin bestätigen die Ergebnisse früherer Untersuchungen [49,97]. Höhere Durchschnittswerte wurden mit 40830 pg/g Hb bei Arbeitern einer Farbenfabrik in New York gefunden. In dieser Fabrik, hatten aber auch Mitarbeiter, die nicht in der Produktion gearbeitet haben, mit 3500 pg/g Hb eine wesentlich höhere Grundbelastung [67]. Bei der Untersuchung von Schwangeren kurz vor der Geburt wurde von Branner et al. [98] bei einer Patientin mit 106813 pg/g Hb ebenfalls ein extrem hoher Wert gefunden, der die durchschnittliche Belastung von 298 pg/g Hb bei den anderen Frauen um das 300-fache überschritten hatte. Dies könnte bei dieser Patientin auf der vorausgegangen Behandlung mit einer noch höheren Prilo-

caindosis beruht haben, ebenso wie der hohe Basalwert bei einer Patientin der hier vorliegenden HNO-Studie, der mit 40908 pg/g Hb fast 60-Mal höher als der Durchschnittswert aller anderen Patienten war. In beiden Fällen liegen keine Informationen zu einer möglichen Arbeitsplatzbelastung vor. Ein wesentlicher Arbeitsplatz bedingter Beitrag ist jedoch im ersten Fall aufgrund der Schwangerschaft, bei der HNO-Patientin wegen des hohen Alters von 75 Jahren, äußerst unwahrscheinlich.

Die vorliegenden Ergebnisse zu den Basalwerten vor Prilocainbehandlung bestätigen auch die in bisherigen Untersuchungen festgestellte geringe oder fehlende Abhängigkeit der Hb-Addukte von o-Toluidin vom Rauchstatus [49]. Nicht nur die bei den Basalwerten, sondern auch beim Anstieg der Addukte nach der Verabreichung von 100 mg Prilocain ist keine Abhängigkeit vom Zigarettenrauchen erkennbar (Abbildung 31). Dies stellt die Beteiligung von CYP1A2 an der metabolischen Aktivierung von o-Toluidin in Frage. Obwohl das Rauchen eindeutig zu einer Induktion dieses Enzyms führt [11], kommt es zu keinem höheren Anstieg bei den Rauchern im Vergleich zu den Nichtrauchern. Auch bei Ratten hatte die Verabreichung des starken CYP1A2-Induktors  $\beta$ -Naphthoflavon keine erhöhten Hb-Addukte von o-Toluidin im Vergleich zur Kontrolle zur Folge [99]. Vielmehr waren die Addukte bei den Ratten, die mit dem Induktor der CYP2B-Enzyme Phenobarbital behandelt worden waren, signifikant gegenüber der Kontrolle und den  $\beta$ -Naphthoflavon-induzierten Tieren erhöht. Obwohl o-Toluidin in der Ratte die CYP1A2-abhängige Metabolisierung von Koffein steigert [100], könnten, anders als bisher von Ergebnissen mit anderen aromatischen Aminen wie beispielsweise 4-ABP abgeleitet [11,101], andere Enzyme als das CYP1A2 hauptsächlich für die metabolische Aktivierung von o-Toluidin verantwortlich sein.

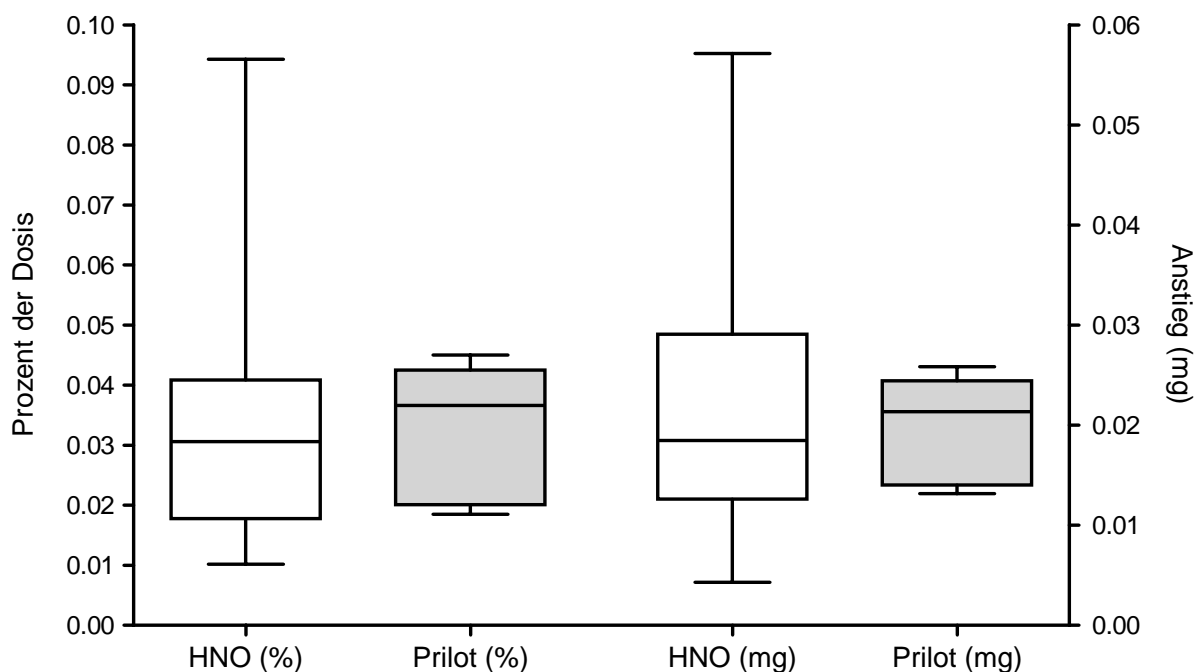


**Abbildung 36: Anstieg der Hb-Addukte von o-Toluidin in Abhängigkeit vom Gewicht mit und ohne Berücksichtigung der beiden Maximalwerte (> 50000 pg/g Hb)**



Der Anstieg der Hb-Addukte von o-Toluidin nach Prilocaingabe korreliert nicht mit Alter und Größe, und obwohl Prilocain nicht pro kg KG gegeben wurde, sondern jeder Patient die gleiche Dosis erhalten hatte, auch nicht mit Gewicht und BMI der Patienten. Die Korrelation mit dem Gewicht erreicht allerdings Signifikanz, wenn man die beiden höchsten Anstiegswerte der mit 100 mg Prilocain behandelten Patienten aus der Rechnung nimmt (Abbildung 36).

Legt man bei Männern und Frauen einen mittleren Hb-Gehalt im Blut von 153 bzw. 145 g/L und ein durchschnittliches Blutvolumen von 70 bzw. 65 g/kg zugrunde, dann entspricht die nach Prilocainbehandlung erhöhte o-Toluidinbindung am Hämoglobin bei den 23 HNO-Patienten  $0,0348 \pm 0,0218$  Prozent der Dosis, bei den 6 Prilot-Probanden  $0,0331 \pm 0,0106$  Prozent der Dosis. Auch die Standardabweichung vom Mittelwert (S.E.) ist mit 0,0045 bei den HNO-Patienten und 0,0041 in der Prilotstudie nahezu identisch. Trotz der Korrektur auf den Hb-Gehalt in Abhängigkeit von Geschlecht und Körpergewicht verringert sich die Streuung im Vergleich zum absoluten Anstieg nach Prilocaingabe nicht (Abbildung 37). Nachdem der Anstieg der Hb-Addukte von o-Toluidin weder von Rauchstatus und Geschlecht abhängt (Abbildung 31), noch mit den Körperdaten, Alter, Größe, Gewicht und BMI korreliert (Abbildung 32), müssen andere Faktoren für die Streuung der Werte verantwortlich sein.



**Abbildung 37:** Hb-Addukte von o-Toluidin berechnet als Differenz zwischen den Adduktwerten 24 h vor und 24 h nach der s.c. Injektion von 100 mg Prilocain (Anstieg in mg) und als Prozent der Dosis unter Berücksichtigung der individuellen Hb-Menge.

Hierfür kommen Unterschiede in der Aktivität der Enzyme infrage, die *o*-Toluidin entweder zum *N*-Hydroxylamin aktivieren oder über andere Wege abbauen. Für diese bis heute im Zusammenhang mit *o*-Toluidin nicht näher charakterisierten Enzyme, zu denen neben den CYP auch NAT1, NAT2, Gluthation-S-, Glucuronosyl- oder Sulfotransferasen gehören können, sind sowohl genetische Polymorphismen wie auch Nahrungs- und Umwelt-bedingte Einflüsse denkbar [18,102-104].

Stillwell et al. [105] berichteten 1987 erstmals über Hb-Addukten monocyclischer Amine, darunter auch *o*-Toluidin, beim Menschen. Kurz danach veröffentlichten Birner und Neumann [106] die erste experimentelle Arbeit über die Erzeugung von Hb-Addukten durch monocyclische Amine. Nach oraler Gabe von 0,6 mmol *o*-Toluidin/kg KG an Ratten errechneten sie einen HBI von 4,0. Für Mäuse erhielten sie nach Gabe von 1,0 mmol *o*-Toluidin/kg KG mit einem HBI von 2,1 einen geringeren Wert. Einen wesentlich höheren HBI von 22,5 fanden DeBord et al. [99] bei Ratten nach oraler Gabe von radioaktiv markiertem *o*-Toluidin. Nach i.p. Injektion war der HBI mit 51,8 nochmals mehr als doppelt so hoch. Für den großen Unterschied zu dem HBI-Wert von Birner und Neumann können verschiedene Gründe angeführt werden. Im Gegensatz zu Birner und Neumann bestimmten DeBord et al. die gesamte Bindung von Radioaktivität und nicht das durch alkalische Hydrolyse freigesetzte *o*-Toluidin. Sowohl die unvollständige Hydrolyse als auch die Bindung anderer Metaboliten des *o*-Toluidins, z.B. der *N*-Hydroxlyamine von 4- und 6-Hydroxy-*o*-Toluidin [81] können eine höhere Bindung bei der Bestimmung der gesamt gebundenen Radioaktivität ergeben. Ein weiterer Unterschied könnte durch die Wahl der Versuchstiere, weibliche Wistarratten bei Birner und Neumann und männliche Sprague-Dawley Ratten bei DeBord et al., bedingt sein. In der vorliegenden Arbeit wurde wie bei Birner und Neumann das nach alkalischer Hydrolyse freigesetzte *o*-Toluidin gemessen. Allerdings haben die Probanden kein *o*-Toluidin erhalten, sondern Prilocain. Dieses kann auch über andere Wege als die Amidesterspaltung metabolisiert werden [82]. Dazu liegen aber keine quantitativen Daten vor. Andererseits wurde das Prilocain injiziert und nicht oral verabreicht.

Aus der Adduktbindung in Prozent der Dosis lässt sich der Hämoglobin-Bindungsindex (HBI) nach Sabbioni [107] folgendermaßen berechnen:

$$HBI = \frac{\text{Prozent der Dosis} \times 6800}{100}$$

Dabei geht man davon aus, dass ein HBI von 6800 der Bindung von 100% der Dosis an das Hämoglobin entspricht. In der vorliegenden Arbeit beträgt der HBI von *o*-Toluidin nach s.c.

Injektion von Prilocain bei den 29 Probanden  $2,34 \pm 1,35$  (max 6,4 / min 0,7) und ist nahezu identisch mit dem Wert von Birner und Neumann für Mäuse und etwa halb so hoch wie der Wert für Ratten. Angesichts der oben diskutierten Unterschiede in der Applikation und des unbekanntem Anteils von Prilocain, der beim Menschen über o-Toluidin verstoffwechselt wird, ist dies eine erstaunlich gute Übereinstimmung.

Prilocain ist das einzige LA, welches zu o-Toluidin metabolisiert wird. Eine Reihe von weiteren LA ergeben nach Amidspaltung 2,6-Dimethylanilin (2,6-Xylidin), welches ebenfalls Hb-Addukte bildet. Dies wurde von Bryant et al. [108] 1994 für Lidocain gezeigt. Wegen der sehr unterschiedlichen Dosierung, die Probanden erhielten zwischen 70 und 3760 mg Lidocain, und der unvollständigen Angabe der quantitativen Daten in der Publikation, ist ein Vergleich mit der vorliegenden Studie mit Prilocain nur eingeschränkt möglich. Die Erhöhung der Adduktwerte nach Lidocainbehandlung betrug 93-636 ng/g Hb. Nach der niedrigsten Lidocain-Dosis von 70 mg muss es demnach mindestens zu einer Erhöhung der 2,6-Dimethylanilinaddukte um 93 ng/g Hb gekommen sein. Dies ist fast doppelt so hoch als der höchste von uns gemessene Wert von 57 ng o-Toluidin/g Hb nach Gabe von 100 mg Prilocain. Die Gründe für diesen Unterschied sind nicht bekannt. Der HBI-Wert als Maß für die Bindungskapazität der Arylamine bei Ratten, der für 2,6-Dimethylanilin 1,1 fast viermal niedriger ist als der von o-Toluidin [107], kann nicht als Erklärung dienen. Das kanzerogene Potenzial von 2,6-Dimethylanilin, das im Fütterungsversuch mit Ratten dosisabhängig vor allem zu Nasenhöhlenkrebs führt [2,109] ist mit einer  $TD_{50}$  von 20,4 mg/kg KG/Tag vergleichbar zu dem von o-Toluidin mit einer  $TD_{50}$  von 23,3 mg/kg KG/Tag [110]. Im Gegensatz zu 2,6-Dimethylanilin erzeugt o-Toluidin aber in verschiedenen Organen und Geweben Krebs, neben der Harnblase auch in Nieren, Nebenniere, Milz, Leber, Hypophyse, Lunge, Blutgefäßen und an der Einstichstelle in Haut und Bauchhaut [12,111]. Wegen fehlender Daten zum Risiko für den Menschen und der Beschränkung der kanzerogenen Wirkung auf die Nase wird es von der IARC derzeit nur in der Liste 2B als „vielleicht kanzerogen für den Menschen“ eingestuft.

### 3.2.2 Hämoglobinaddukte von 4-ABP

Wie erwartet konnte in beiden vorliegenden Studien kein Einfluss von Prilocain auf die Hb-Addukte von 4-ABP festgestellt werden. Wie aus den Tabelle 12 und 16 hervorgeht, verändert sich durch die Injektion von Prilocain die Adduktrate von 4-ABP nicht. Die Hb-Addukte von 4-ABP liegen vor und nach Prilocainbehandlung im Mittel bei 77 und 73 pg/g Hb (HNO-Studie) bzw. 56 und 59 pg/g Hb (Prilotstudie).

Vergleicht man hingegen die Addukte in Abhängigkeit des Rauchens, erkennt man einen eindeutigen Trend (Abbildung 34). Im Gegensatz zu den Nichtrauchern (25,0 pg/g Hb) haben Raucher mit durchschnittlich 129,8 pg/g Hb 5-fach höhere Addukte von 4-ABP. Dies bestätigt zahlreiche Untersuchungen, die eine deutliche Abhängigkeit der 4-ABP-Addukte vom Rauchen gezeigt haben. Im Schnitt haben Raucher 3-6 mal höhere Addukte von 4-ABP als Nichtraucher [49]. Trotzdem gibt es Überlappungen zwischen den Werten von Nichtrauchern und Rauchern, die es nicht erlauben vom 4-ABP-Adduktwert auf den Rauchstatus zu schließen. Im Gegensatz zu dem Nikotinmetaboliten Cotinin lässt sich für 4-ABP kein Grenzwert für aktive Raucher, ein so genannter Cut-off-Wert, definieren [90,112]. Cotinin ist beim Raucher in Blut, Speichel und Urin durchschnittlich mehr als 100-fach höher als bei Nichtrauchern [113,114]. Der vergleichsweise geringere Unterschied in den Hb-Addukten von 4-ABP zwischen Rauchern und Nichtrauchern lässt sich hauptsächlich durch die wesentlich höhere Hintergrundbelastung erklären, die beim Nikotin vernachlässigbar gering ist. Trotzdem sich aromatische Amine wie 4-ABP stärker im Nebenstromrauch anreichern [115,116], trägt das Passivrauchen nur ca. 10% zu dieser Hintergrundbelastung bei [49]. Andere, weitgehend noch unbekannte Quellen müssen daher für die Grundbelastung von Rauchern wie Nichtrauchern mit 4-ABP verantwortlich gemacht werden.

### **3.3 DNA-Addukte**

Die Ergebnisse zu DNA-Addukten von o-Toluidin in Abhängigkeit einer Prilocainbehandlung besitzen wegen der geringen Anzahl von Probanden nur vorläufigen Charakter. Es ist jedoch die erste Studie in der überhaupt DNA-Addukte von o-Toluidin in menschlichen Gewebe nachgewiesen wurden. Die Methodik stützt sich dabei im wesentlichen auf frühere Untersuchungen zu DNA-Addukten von 4-ABP, die sowohl im Harnblasenepithel wie auch in der Lunge nachweisbar sind [32,117-119]. In einer neueren Studie wurden 4-ABP-Addukte mit einer LC-MS Methode auch im Pankreas beim Menschen nachgewiesen [45]. Im Rattenversuch wurden 4-ABP-Addukte ebenfalls mit LC-MS nachgewiesen, aber keine Addukte von o-Toluidin und anderen monocyclischen Aminen [120]. Im eigenen Arbeitskreis wurden dagegen o-Toluidinaddukte in Leber-DNA durch <sup>32</sup>P-Postlabeling mit einer spezifischen HPLC-Trennung und Vergleich mit einem synthetischen Standard des C8-Guaninaddukts zweifelsfrei detektiert [121].

### 3.3.1 Bewertung der Methode

Das Prinzip der Bestimmung der DNA-Addukte basiert auf der Gewinnung der DNA per Festphasenextraktion, saurer Hydrolyse der DNA, Isolierung und Aufreinigung der aromatischen Amine durch Flüssig-Flüssig-Extraktion und anschließender Detektion als HFBA-Derivate per GC-MS.

Die Gewinnung der Urothelien erfolgte durch mehrfache Zentrifugation des Urins, was sich als Standardmethode zur Gewinnung von Urothelien-DNA erwiesen hat [122,123]. Nach mehrfachem Waschen des Pellets wurde die DNA mit einem kommerziellen Kit per Festphasenextraktion aus den Zellen isoliert und nicht durch die übliche Phenolextraktion mit anschließender ethanolischer Fällung gewonnen [124,125]. Die saure Hydrolyse der DNA-Addukte und die Isolierung und Aufreinigung der freigesetzten Amine durch Festphasenextraktion mit anschließender Detektion per GC-MS erfolgte in Anlehnung an die innerhalb unseres Arbeitskreises erfolgreich etablierte Methode zur Bestimmung von DNA-Addukten tabakspezifischer Nitrosamine [125,126].

Obgleich die GC-MS-Analyse als sensitive Methode zur spezifischen Bestimmung von DNA-Addukten gilt, sind ihr bei den extrem geringen Mengen der aromatischen Amine, die an der DNA gebunden vorliegen, dennoch Grenzen gesetzt. Die notwendige Nachweisempfindlichkeit kann zwar durch Einsatz der negativ-chemischen Ionisation nach Derivatisierung der Amine erreicht werden, aber letztlich erhält man bei dieser Detektionsmethode nur den Molekülpeak und nicht wie bei der EI aussagekräftige Fragmente. Der qualitative Nachweis stützt sich deshalb nur auf die Zuordnung der Peaks anhand der Retentionszeit und dem Vergleich mit dem zugehörigen ISTD. Ein weiterer Nachteil der Methode ist, dass nur die hydrolytisch freisetzbare Substanz gemessen wird. Man erhält keine Information zur Struktur der Addukte und zur Position der Addukte innerhalb der DNA. Dies wäre aber von entscheidender Bedeutung für die Risikobewertung. Addukte an verschiedenen Nukleotiden oder auch nur an verschiedenen Positionen innerhalb einer Base können äußerst unterschiedliches mutagenes und kanzerogenes Potenzial besitzen. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Methylierung von Guanin an der N7- und der O6-Position [29]. Mehr Informationen zu den Addukten kann man mit der sich derzeit rasch fortentwickelnden LC-MS erhalten, die jedoch in den meisten Fällen noch nicht die ausreichende Nachweisempfindlichkeit für kleinere DNA-Mengen besitzt [41]. Mit der hochsensitiven Methode des  $^{32}\text{P}$ -Postlabelings können die Addukte zwar auf Nukleotidbasis bestimmt werden, der Nachweis ist aber nur über die Retentionszeiten in der HPLC oder dem chromatographischen Verhalten auf DC-Platten möglich, ein struktureller Nachweis gelingt auch mit dieser Methode nicht [43]. Auch die Ausbeute der DNA-Hydroly-

se lässt sich mit der hier verwendeten Methode nicht abschätzen. Hierfür wäre ein Tierversuch mit radioaktivem o-Toluidin hilfreich, bei dem die gesamte Bindung an der DNA durch Szintillationsmessung bestimmt und mit der Ausbeute an Addukten mit der hier verwendeten Methode verglichen werden könnte.

### 3.3.2 Bewertung der Ergebnisse

Vor der Behandlung der Probanden wurde eine Grundbelastung der Harnblasenepithelien mit o-Toluidin von durchschnittlich 6,2 fmol/ $\mu$ g DNA gemessen. Im 24 h-Urin nach der Prilocaininjektion konnten im Mittel 11,0 fmol/ $\mu$ g DNA detektiert werden. Dieser Anstieg in Abhängigkeit von Prilocain ist nicht signifikant und beruht auch nur auf 3 Probanden, die eine Erhöhung der Adduktwerte zeigen, während bei den 3 anderen Probanden kein Anstieg zu verzeichnen war (Abbildung 35). Die gleichzeitig bestimmten Adduktraten von 4-ABP zeigen dagegen keinerlei Veränderung nach der Prilocaininjektion. Sie lagen durchschnittlich bei 1,6 fmol/ $\mu$ g DNA (0 h-Wert) bzw. 1,4 fmol/ $\mu$ g DNA (24 h-Wert). Der im Vergleich zu den Hb-Addukten geringe oder fehlende Anstieg der DNA-Addukte von o-Toluidin nach Prilocain könnte an der zu kurzen Urinsammeldauer liegen. Es ist zu erwarten, dass die Urothelien, in denen eine Adduktbildung stattgefunden hat, erst im Laufe einiger Tage abschilfern und mit dem Urin ausgeschieden werden.

Für o-Toluidin wurden bisher keine Daten über DNA-Addukte beim Menschen publiziert. Vergleichbare Messungen wurden nur mit DNA-Addukten von 4-ABP aus humanen Harnblasenkrebsbiopsien von zwei Arbeitsgruppen durchgeführt. In der ersten Arbeit von Lin et al. [117] lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung der Methode. Die zweite Arbeitsgruppe fand 4-ABP-abspaltende DNA-Addukte nur bei 37 von 75 Patienten bei einer Nachweisgrenze von 0,1 fmol/ $\mu$ g DNA [32]. Obwohl in dieser Studie 46 Patienten aktive Raucher waren, lag die mittlere Adduktrate mit 2,7 fmol/ $\mu$ g DNA nur weniger als das Doppelte über unseren Werten für 6 Nichtraucher. Der Maximalwert war mit 35,8 fmol/ $\mu$ g DNA in der Studie von Airoidi allerdings fünfmal höher als unser Maximalwert von 7,4 fmol/ $\mu$ g DNA.

### 3.4 Risikobewertung von Prilocain

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass nach Prilocainbehandlung nicht nur mit einer erhöhten Methämoglobinbildung durch o-Toluidin zu rechnen ist, sondern auch mit einer deutlichen Belastung durch Addukte dieses Blasenkarzinogens. Bereits bei Verabreichung von 100 mg Prilocain erhöhen sich die Hb-Addukte um durchschnittlich 20 ng/g Hb (Tabelle 11 und 15) und die DNA-Addukte bei drei von sechs Probanden um das 1,5- bis 3,5-fache

(Abbildung 35). Sehr viel höhere Adduktraten sind bei Anwendung der Tumescenztechnik zu erwarten, wenn bis zu 6 Liter einer 0,05%igen Prilocainlösung infiltriert werden, was einer Gesamtmenge von 3000 mg Prilocain entspricht. Nachdem für kanzerogene Substanzen mit initiierenden Eigenschaften kein Grenzwert festgelegt werden kann, führt bereits eine einmalige Behandlung mit Prilocain zu einem erhöhten Krebsrisiko. Man muss außerdem davon ausgehen, dass viele Patienten nicht nur einmal mit Prilocain behandelt werden. Für die Tumescenzanästhesie gibt es neben der Liposuktion viele weitere Anwendungsgebiete wie beispielsweise für die Shafe-Therapie bei Ulcus cruris, für Arthroskopien und endoskopische Untersuchungen [127]. Seit Einführung der eutektischen Mischung mit Lidocain findet Prilocain auch Anwendung als EMLA-Pflaster und -Creme. Hier sollte vor allem bei Kindern der häufige Einsatz solcher Pflaster zur Vermeidung von Schmerzen durch Stiche bei Impfungen und Blutentnahmen gegen ein möglicherweise erhöhtes Krebsrisiko abgewägt werden.

Das Bundesgesundheitsamt hat aufgrund von Untersuchungen an Ratten mit 2,6-Dimethylanilin bereits 1992 einen Stufenplan der Stufe 1 zur Abwehr von Arzneimittelrisiken durch Lidocain eröffnet [128]. Grundsätzlich muss man sich in diesem Zusammenhang fragen, warum in Deutschland Prilocain anstatt Lidocain für die Tumescenzanästhesie eingesetzt wird, obwohl sein Metabolit o-Toluidin als stärker kanzerogen eingeschätzt wird als der Metabolit von Lidocain, das 2,6-Dimethylanilin. Untersuchungen haben ergeben, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich Wirksamkeit und Verträglichkeit bei der Tumescenzanästhesie zwischen diesen beiden LA bestehen [129].

Die Bestimmung der Hb-Addukte hat sich für Lidocain und Prilocain als die empfindlichste Methode erwiesen, mit der die Bildung potenziell kanzerogener Metaboliten beim Menschen festgestellt werden kann. Sie sollte auch für die Risikobewertung anderer LA eingesetzt werden, die ebenfalls aufgrund ihrer chemischen Struktur krebserzeugende Arylamine freisetzen können. Zwar hat man bisher z.B. für Bupivacain und Mepivacain kein freies 2,6-Dimethylanilin als Metabolit nachgewiesen [130], die wesentlich empfindlichere Methode der Hb-Adduktbestimmung könnte hier aber genauere Auskunft über das relative Risiko im Vergleich zu Lidocain liefern.

## 4 Zusammenfassung

Das blasenkanzerogene Potenzial aromatischer Amine ist bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts bekannt. Drei Fälle von Blasenkrebs bei Arbeitern einer Farbenfabrik wurden von Rehn 1895 auf die Belastung mit Anilin zurückgeführt. Mittlerweile weiß man, dass nicht das schwache Kanzerogen Anilin, sondern neben 4-Aminobiphenyl (4-ABP), 2-Naphthylamin und Benzidin auch o-Toluidin für die Entstehung von Blasenkrebs verantwortlich ist. In Deutschland erkranken jährlich ca. 18000 Männer und 7000 Frauen an Blasenkrebs.

Neben der beruflichen Exposition mit aromatischen Aminen wird vor allem das Rauchen von Tabak als Expositionsquelle verantwortlich gemacht. Allerdings konnte bei o-Toluidin im Gegensatz zu 4-ABP keine Abhängigkeit vom Rauchen festgestellt werden. Die Ursachen für die Belastung der Allgemeinbevölkerung mit o-Toluidin sind derzeit noch weitgehend unbekannt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Lokalanästhetikum Prilocain als mögliche Quelle für die Belastung mit o-Toluidin. In diesem Zusammenhang wurden bei insgesamt 23 Patienten der Poliklinik München Hämoglobin (Hb)-Addukte von o-Toluidin und 4-ABP 24 Stunden vor und nach s.c. Injektion von Prilocain untersucht. Dabei erhielten 20 Patienten 100 mg Prilocain, je ein Patient 50, 120 bzw. 200 mg Prilocain. Zusätzlich erhielten 6 freiwillige, gesunde Probanden der Uniklinik Regensburg („Prilotstudie“) 100 mg s.c. gespritzt. Von diesen Probanden wurde außer den Blutproben für die Bestimmung von Hb-Addukten auch Urinproben jeweils 24 Stunden vor und nach der Injektion zur Bestimmung der DNA-Addukte in den Urothelien gesammelt.

Für die Bestimmung der Hb- und DNA-Addukte wurden die aromatischen Amine durch alkalische bzw. saure Hydrolyse freigesetzt. Nach Aufreinigung, Isolierung durch Festphasen- bzw. Flüssig-Flüssig-Extraktion und Derivatisierung wurden die Arylamine mit GC-MS mit negativ-chemischer Ionisation detektiert.

Die Ergebnisse zeigen bei allen Probanden einen deutlichen Anstieg der Hb-Addukte in Abhängigkeit von Prilocain, der sich bei 25 Probanden, die 100 mg Prilocain erhalten hatten, auf  $21475 \pm 13059$  pg/g Hb belief. Die vor der Prilocaininjektion gemessenen Werte lagen bei 25 Probanden zwischen 37 und 4832 pg/g Hb, während 24 h nach der Injektion zwischen 4366 und 57656 pg/g Hb detektiert werden konnten. Ein Patient hatte mit 40908 pg/g Hb vor und 60364 pg/g Hb nach der Behandlung deutlich höhere Werte, aber einen vergleichbar hohen Anstieg. Bei den drei Patienten mit anderer Prilocaindosis stiegen die Hb-Addukte dosisabhängig in vergleichbarem Ausmaß an.



Die Hb-Addukte von 4-ABP zeigten bei HNO-Patienten mit durchschnittlich 77 pg/g Hb vor und 73 pg/g Hb nach der Behandlung bzw. bei den Probanden der Pilotstudie mit 56 pg/g Hb und 59 pg/g Hb keine Abhängigkeit von Prilocain. Bei den Rauchern der HNO-Studie waren die Hb-Addukte von 4-ABP mit 130 pg/g Hb gegenüber 25 pg/g Hb bei den Nichtrauchern erwartungsgemäß signifikant erhöht ( $p=0,0246$ ). Dagegen zeigte sich für die Hb-Addukte von o-Toluidin keinerlei Abhängigkeit vom Raucherstatus. Dies gilt nicht nur für die Basalwerte mit 909 bzw. 317 pg/g Hb bei Nichtrauchern und Rauchern, sondern auch für den Prilocain bedingten Anstieg auf 21006 pg/g Hb bei 8 Rauchern und 22723 pg/g Hb bei 12 Nichtrauchern. Dieses Ergebnis schließt das Rauchen als nennenswerte Quelle für o-Toluidin-Hb-Addukte beim Menschen aus. Es zeigt auch, dass das beim Raucher induzierte Cytochrom P450 1A2 keine Rolle für die metabolische Aktivierung von o-Toluidin spielt.

Erstmals konnten im Rahmen dieser Arbeit neben DNA-Addukten von 4-ABP auch DNA-Addukte von o-Toluidin im Harnblasenepithel des Menschen nachgewiesen werden. Im Schnitt betragen die Basalwerte der DNA-Addukte bei den 6 Probanden  $6,2 \pm 3,2$  fmol/ $\mu$ g DNA. Der Anstieg auf  $11,0 \pm 10,6$  fmol/ $\mu$ g DNA erreichte nicht Signifikanzniveau ( $p=0,232$ ). Bei der Bestimmung der DNA-Addukte von 4-ABP ( $1,6 \pm 2,9$  fmol/ $\mu$ g bzw.  $1,4 \pm 2,3$  fmol/ $\mu$ g DNA) konnten wie bei den Hb-Addukten keine Unterschiede in Abhängigkeit von Prilocain festgestellt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Prilocain zu einer deutlichen Erhöhung der Belastung des Menschen mit Addukten führt, die auf einer metabolischen Aktivierung des Blasenkanzerogens o-Toluidin beruht. Nachdem es für Kanzerogene mit initiierenden Eigenschaften keine Grenzwerte gibt, kann jede Behandlung mit Prilocain zu einem erhöhten Krebsrisiko führen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Anon (2004) Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland: Krebs in Deutschland Häufigkeit und Trends. Robert- Koch- Institut
2. <http://www-cie.iarc.fr/monoeval/grlist.html>
3. Vineis P Alavanja M Garte S (2004) Dose-response relationship in tobacco-related cancers of bladder and lung: a biochemical interpretation. *Int J Cancer* 108:2-7
4. Bryant MS Vineis P Skipper PL Tannenbaum SR (1988) Haemoglobin adducts of aromatic amines in peoples exposed to cigarette smoke. *IARC Sci Publ* 89:133-136
5. Freudenthal RI Anderson DP (1997) Monitoring of aromatic amine exposures in workers at a chemical plant with known bladder cancer excess. *J Natl Cancer Inst* 89:734-736
6. Yu MC Skipper PL Taghizadeh K Tannenbaum SR Chan KK Henderson BE Ross RK (1994) Acetylator phenotype, aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels, and bladder cancer risk in white, black, and Asian men in Los Angeles, California. *J Natl Cancer Inst* 86:712-716
7. Scheuenpflug J (2004) Heterologe Koexpression von humanem Cytochrom P450 1A2 und polymorphen Formen humaner N-Acetyltransferase Typ-2 in V79 Chinesischen Hamsterzellen zur in vitro- Untersuchung von Toxizität und Metabolismus von Chemikalien und Arzneimitteln. Dissertation aus dem Fachgebiet Lebensmittelchemie der Technischen Universität München
8. Wei C Caccavale RJ Kehoe JJ Thomas PE Iba MM (2001) CYP1A2 is expressed along with CYP1A1 in the human lung. *Cancer Lett* 171:113-120
9. Faber MS Fuhr U (2004) Time response of cytochrome P450 1A2 activity on cessation of heavy smoking. *Clin Pharmacol Ther* 76:178-184
10. Badawi AF Stern SJ Lang NP Kadlubar FF (1996) Cytochrome P-450 and acetyltransferase expression as biomarkers of carcinogen-DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Prog Clin Biol Res* 395:109-140
11. Landi MT Zocchetti C Bernucci I Kadlubar FF Tannenbaum S Skipper P Bartsch H Malaveille C Shields P Caporaso NE Vineis P (1996) Cytochrome P4501A2: enzyme induction and genetic control in determining 4-aminobiphenyl hemoglobin adduct levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:693-698
12. Richter E Pfau W (2004) Aromatische Amine, Nitroaromaten und heterozyklische Amine. *Lehrbuch der Toxikologie*; Ch. 29 pp 731-745; eds: Marquardt H Schäfer SG, Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
13. Agúndez JAG Lozano L Ladero JM Sastre J Cerdán FJ Diaz-Rubio M Benítez J (2000) *N*-acetyltransferase 2 (NAT2) genotype and colorectal carcinoma: risk variability according to tumour site? *Scand J Gastroenterol* 35:1087-1091

14. Le Marchand L Hankin JH Wilkens LR Pierce LM Franke A Kolonel LN Seifried A Custer LJ Chang W Lum-Jones A Donlon T (2001) Combined effects of well-done red meat, smoking, and rapid *N*-acetyltransferase 2 and CYP1A2 phenotypes in increasing colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1259-1266
15. Tamer L Ercan B Ates NA Degirmenci U Unlu A Ates C Dirlik M Atik U (2004) *N*-acetyltransferase 2 gene polymorphism in patients with colorectal carcinoma. *Cell Biochem Funct* in press
16. Evans DA Manley KA McKusick VA (1960) Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J* 5197:485-491
17. Meyer UA (1994) Polymorphism of human acetyltransferases. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 6:213-6.:213-216
18. Hein DW (2002) Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 506:65-77
19. Bartsch H Caporaso N Coda M Kadlubar F Malaveille C Skipper P Talaska G Tannenbaum SR Vineis P (1990) Carcinogen hemoglobin adducts, urinary mutagenicity, and metabolic phenotype in active and passive cigarette smokers. *J Natl Cancer Inst* 82:1826-1831
20. Lewalter J Korallus U (1985) Blood protein conjugates and acetylation of aromatic amines. New findings on biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health* 56:179-196
21. Marquardt H Schäfer SG (2004) *Lehrbuch der Toxikologie. 2*; Stuttgart, Germany Wissenschaftliche Verlagsges.mbH
22. Boogaard PJ (2002) Use of haemoglobin adducts in exposure monitoring and risk assessment. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 778:309-322
23. Yu MC Skipper PL Tannenbaum SR Chan KK Ross RK (2002) Arylamine exposures and bladder cancer risk. *Mutat Res* 506:21-28
24. Sabbioni G Beyerbach A (1995) Determination of hemoglobin adducts of arylamines in humans. *J Chromatogr B Biomed Appl* 667:75-83
25. Skipper PL Tannenbaum SR (1990) Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 11:507-518
26. Weiss T Angerer J (2004) Belastung der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland durch nitroaromatische Verbindungen - Einfluss von Ernährung und Bekleidung-. <http://bwplus.fzk.de/berichte/SBer/BWB20007SBer.pdf>
27. Anon (2005) MAK- und BAT-Wert-Liste. Mitteilung 41 der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe vom 1. Juli 2005; Wiley-VCH Verlag GmbH, D-69451 Weinheim, Germany

28. Anon. (2003) Verwendung von Hämoglobinaddukten als Biomarker für das Monitoring von Belastungen und Beanspruchungen durch gentoxische Stoffe. Stellungnahme der Kommission "Human-Biomonitoring" des Umweltbundesamtes. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 2003:918-922
29. Beach AC Gupta RC (1992) Human biomonitoring and the <sup>32</sup>P-postlabeling assay. Carcinogenesis 13:1053-1074
30. Kaderlik KR Kadlubar FF (1995) Metabolic polymorphisms and carcinogen-DNA adduct formation in human populations. Pharmacogenetics 5:S108-S117
31. Hemminki K Koskinen M Rajaniemi H Zhao C (2000) Dna adducts, mutations, and cancer 2000. Regul Toxicol Pharmacol 32:264-275
32. Airoidi L Orsi F Magagnotti C Coda R Randone D Casetta G Peluso M Hautefeuille A Malaveille C Vineis P (2002) Determinants of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in bladder cancer biopsies. Carcinogenesis 23:861-866
33. Tang DL Phillips DH Stampfer M Mooney LA Hsu Y Cho S Tsai W-Y Ma J Cole KJ Ni Shé M Perera FP (2001) Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. Cancer Res 61:6708-6712
34. Vineis P Perera F (2000) DNA adducts as markers of exposure to carcinogens and risk of cancer. Int J Cancer 88:325-328
35. Schmitz OJ Wörth CCT Stach D Wiessler M (2002) Capillary electrophoresis analysis of DNA adducts as biomarkers for carcinogenesis. Angew Chem Int Ed 41:445-448
36. Wirtz M Schumann CA Schellenträger M Gäb S vom Brocke J Podeschwa MAL Altenbach H-J Oscier D Schmitz OJ (2005) Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence analysis of endogenous damage in mitochondrial and genomic DNA. Electrophoresis 26:2599-2607
37. Poirier MC (2004) Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. Nature Rev Cancer 4:630-637
38. Garner RC (1998) The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. Mutat Res 402:67-75
39. Randerath K Reddy MV Gupta RC (1981) <sup>32</sup>P-Labeling test for DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A 78:6126-6129
40. Gupta RC (1996) <sup>32</sup>P-Postlabeling for detection of DNA adducts. Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations;Ch. 4 pp 45-61; ed.: Pfeifer GP, New York, Plenum Press
41. Schmitz O Richter E (2000) Capillary zone electrophoresis with on-line blotting for separation and detection of <sup>32</sup>P-postlabeled DNA adducts. Biomarkers 5:314-321
42. Eriksson HL Zeisig M Ekström L-G Möller L (2004) <sup>32</sup>P-postlabeling of DNA adducts arising from complex mixtures: HPLC versus TLC separation applied to adducts from petroleum products. Arch Toxicol 78:174-181

43. 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
44. Möller L Grzybowska E Zeisig M Cimander B Hemminki K Chorazy M (1996) Seasonal variation of DNA adduct pattern in human lymphocytes analyzed by <sup>32</sup>P-HPLC. *Carcinogenesis* 17:61-66
45. 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
46. Haussmann H-J Gerstenberg B Göcke W Kuhl P Schepers G Stabbert R Stinn W Teredesai A Tewes F Anskeit E Terpstra P (1998) 12-month inhalation study on room-aged cigarette sidestream smoke in rats. *Inhal Toxicol* 10:663-697
47. Grimmer G Naujack KW Dettbarn G (1987) Gaschromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, aza-arenes, aromatic amines in the particle and vapor phase of mainstream and sidestream smoke of cigarettes. *Toxicol Lett* 35:117-124
48. Chen PX Moldoveanu SC (2003) Mainstream smoke chemical analyses for 2R4F Kentucky reference cigarette. *Beitr Tabakforsch Int* 20:448-458
49. Richter E Branner B (2002) Biomonitoring of exposure to aromatic amines: haemoglobin adducts in humans. *J Chromatogr B* 778:49-62
50. Bartsch H Malaveille C Friesen M Kadlubar FF Vineis P (1993) Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco cancer risk IV: molecular dosimetry studies implicate aromatic amines as bladder carcinogens. *Eur J Cancer* 29A:1199-1207
51. Bryant MS Skipper PL Tannenbaum SR Maclure M (1987) Hemoglobin adducts of 4-aminobiphenyl in smokers and nonsmokers. *Cancer Res* 47:602-608
52. Bryant MS Vineis P Skipper PL Tannenbaum SR (1988) Hemoglobin adducts of aromatic amines: associations with smoking status and type of tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9788-9791
53. El-Bayoumy K Donahue JM Hecht SS Hoffmann D (1986) Identification and quantitative determination of aniline and toluidines in human urine. *Cancer Res* 46:6064-6067
54. Skipper PL Tannenbaum SR Ross RK Yu MC (2003) Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:503-507
55. Czene K Tiikkaja S Hemminki K (2003) Cancer risks in hairdressers: assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels. *Int J Cancer* 105:108-112
56. Talaska G (2003) Aromatic amines and human urinary bladder cancer: Exposure sources and epidemiology. *J Environ Sci Health C21:29-43*

57. Turesky RJ Freeman JP Holland RD Nestorick DM Miller DW Ratnasinghe DL Kadlubar FF (2003) Identification of aminobiphenyl derivatives in commercial hair dyes. *Chem Res Toxicol* 16:1162-1173
58. Chiang T-A Wu P-F Ying LS Wang L-F Ko YC (1999) Mutagenicity and aromatic amine content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Food Chem Toxicol* 37:125-134
59. Palmiotto G Pieraccini G Moneti G Dolara P (2001) Determination of the levels of aromatic amines in indoor and outdoor air in Italy. *Chemosphere* 43:355-361
60. Richter E Rösler S Scherer G Gostomzyk JG Grübl A Krämer U Behrendt H (2001) Haemoglobin adducts from aromatic amines in children, in relation to area of residence and exposure to environmental tobacco smoke. *Int Arch Occup Environ Health* 74:421-428
61. Richter E Rösler S Becker A (2000) Effect of diet on haemoglobin adducts from 4-aminobiphenyl in rats. *Arch Toxicol* 74:203-206
62. Anon (1979) Bioassay of o-Toluidine Hydrochloride for Possible Carcinogenicity (CAS No. 636-21-5). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 153:1-147
63. Hoffmann D Hoffmann I (1997) The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health* 50:307-364
64. Phillips DH (2002) Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis* 23:1979-2004
65. Teass AW DeBord DG Brown KK Cheever KL Stettler LE Savage RE Weigel WW Dankovic D Ward E (1993) Biological monitoring for occupational exposures to o-toluidine and aniline. *Int Arch Occup Environ Health* 65:S115-S118
66. Markowitz SB Levin K (2004) Continued epidemic of bladder cancer in workers exposed to ortho-toluidine in a chemical factory. *J Occup Environ Med* 46:154-160
67. Ward EM Sabbioni G DeBord DG Teass AW Brown KK Talaska GG Roberts DR Ruder AM Streicher RP (1996) Monitoring of aromatic amine exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess. *J Natl Cancer Inst* 88:1046-1052
68. Ward E Carpenter A Markowitz S Roberts D Halperins W (1991) Excess numbers of bladder cancers in workers exposed to ortho-toluidine and aniline. *J Natl Cancer Inst* 83:501-506
69. Gan JP Skipper PL Gago-Dominguez M Arakawa K Ross RK Yu MC Tannenbaum SR (2004) Alkylaniline-hemoglobin adducts and risk of non-smoking-related bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 96:1425-1431
70. Case RAM Hosker ME McDonald DB Pearson JT (1954) Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. Part I. The role of aniline, benzidine, -naphthylamine, and  $\beta$ -naphthylamine. *Br J Ind Med* 11:75-104

71. Naito S Tanaka K Koga H Kotoh S Hirohata T Kumazawa J (1995) Cancer occurrence among dyestuff workers exposed to aromatic amines: a long term follow-up study. *Cancer* 76:1445-1452
72. Ringe D Turesky RJ Skipper PL Tannenbaum SR (1988) Structure of the single stable hemoglobin adduct formed by 4-aminobiphenyl in vivo. *Chem Res Toxicol* 1:22-24
73. Wendl HK (1965) Dosage of Citanest<sup>®</sup> (particularly for epidural anaesthesia). *Acta Anaesth Scand Suppl.* 16:249-256
74. Astra Zeneca GmbH (2004) Fachinformation emla<sup>®</sup> (Creme). [www.astra-zeneca.de](http://www.astra-zeneca.de)
75. Astra Zeneca GmbH (2004) Fachinformation EMLA<sup>®</sup> Pflaster. [www.astra-zeneca.de](http://www.astra-zeneca.de)
76. Astra Zeneca GmbH (2004) Fachinformation Xylonest 0,5. [www.astra-zeneca.de](http://www.astra-zeneca.de)
77. Klein JA (1987) The tumescent technique for liposuction surgery. *Am J Cosmet Surg*: 263-267
78. Astra Zeneca GmbH (2004) Fachinformation Xylonest 0,5. [www.astra-zeneca.de](http://www.astra-zeneca.de)
79. Åkerman B Åström A Ross S Telc A (1966) Studies on the absorption, distribution and metabolism of labelled prilocaine and lidocaine in some animal species. *Acta Pharmacol Toxicol* 24:389-403
80. Klein J Fernandes D Gazarian M Kent G Koren G (1994) Simultaneous determination of lidocaine, prilocaine and the prilocaine metabolite *o*-toluidine in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 655:83-88
81. Williamson JA Lieder PH Amegashitsi L (1995) Development of a biomonitoring assay for ortho-toluidine or its metabolites in human urine. *J Anal Toxicol* 19:256-260
82. Hjelm M Ragnarsson B Wistrand P (1972) Biochemical effects of aromatic compounds - III. Ferrihaemoglobinaemia and the presence of *p*-hydroxy-*o*-toluidine in human blood after the administration of prilocaine. *Biochem Pharmacol* 21:2825-2834
83. Bussen D Sailer M Fuchs KH Thiede A (2003) [Tumescent local anesthesia in proctologic surgery]. *Chirurg* 74:839-843
84. Schwarz M (2001) [Pitfalls in liposuction]. *Kongressbd Dtsch Ges Chir Kongr* 118:669-70.:669-670
85. Lewalter J Gries W (2000) Haemoglobin adducts of aromatic amines: aniline, *o*-, *m*- and *p*-toluidine, *o*-anisidine, *p*-chloroaniline,  $\alpha$ - and  $\beta$ -naphthylamine, 4-aminodiphenyl, benzidine, 4,4'-diaminodiphenylmethane, 3,3'-dichlorobenzidine. *Analyses of hazardous substances in biological materials*; pp 191-218; ed.: Greim H, Volume 7; D-69469 Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH
86. Needham LL Ryan JJ Fürst P (2002) Guidelines for analysis of human milk for environmental chemicals. *J Toxicol Environ Health A* 65:1893-1908
87. Baugh PJ (1997) *Gaschromatographie - Eine anwenderorientierte Darstellung*. Braunschweig/Wiesbaden, Germany: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsges.mmbH

88. Sellers C Markowitz S (1992) Reevaluating the carcinogenicity of ortho-toluidine: a new conclusion and its implications. *Regul Toxicol Pharmacol* 16:301-317
89. Markowitz SB (2005) Corrections to: Markowitz SB, Levin K. Continued epidemic of bladder cancer in workers exposed to ortho-toluidine in a chemical factory. *J Occup Environ Med*. 2004;46:154-160. *J Occup Environ Med* 47:875-877
90. Scherer G Richter E (1997) Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): a critical reappraisal. *Hum Exp Toxicol* 16:449-459
91. Scherer G (2005) Biomonitoring of inhaled complex mixtures - Ambient air, diesel exhaust and cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* 57:75-110
92. Weiss T Angerer J (2002) Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 778:179-192
93. Bein B Tonner PH Scholz J (2001) Diskussion zu dem Beitrag Tumescenz-Lokalanästhesie. *Dtsch Ärzteblatt* 98:1974-1977
94. Anon (2001) Tumescenz-Lokalanästhesie- Stellungnahme des Wissenschaftlichen Arbeitskreises Regionalanästhesie der DGAI. [www.dgai.de](http://www.dgai.de)
95. Friskopp J Huledal G (2001) Plasma levels of lidocaine and prilocaine after application of Oraqix<sup>®</sup>, a new intrapocket anesthetic, in patients with advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 28:425-429
96. Herdevall BM Klinge B Persson L Huledal G Abdel-Rehim M (2003) Plasma levels of lidocaine, o-toluidine, and prilocaine after application of 8.5 g Oraqix in patients with generalized periodontitis: effect on blood methemoglobin and tolerability. *Acta Odontol Scand* 61:230-234
97. Jones CR Liu Y-Y Sepai O Yan H Sabbioni G (2005) Hemoglobin adducts in workers exposed to nitrotoluenes. *Carcinogenesis* 26:133-143
98. Branner B Kutzer C Zwicklenpflug W Scherer G Heller WD Richter E (1998) Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and nonsmoking women. *Biomarkers* 3:35-47
99. DeBord DG Swearingin TF Cheever KL Booth-Jones AD Wissinger LA (1992) Binding characteristics of ortho-toluidine to rat hemoglobin and albumin. *Arch Toxicol* 66:231-236
100. Jodynys-Liebert J Matuszewska A (1999) Effect of toluidines and dinitrotoluenes on caffeine metabolic ratio in rat. *Toxicol Lett* 104:159-165
101. Hammons GJ Milton D Stepps K Guengerich FP Tukey RH Kadlubar FF (1997) Metabolism of carcinogenic heterocyclic and aromatic amines by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Carcinogenesis* 18:851-854
102. Glatt H Meinl W (2004) Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:55-68



103. Maruo Y Iwai M Mori A Sato H Takeuchi Y (2005) Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 6:91-99
104. Nakajima M Yokoi T (2005) Cancer pharmacogenomics: achievements in basic research. *Int J Clin Oncol* 10:14-19
105. Stillwell WG Bryant MS Wishnok JS (1987) GC/MS analysis of biologically important aromatic amines. Application to human dosimetry. *Biomed Environ Mass Spectrom* 14:221-227
106. Birner G Neumann H-G (1988) Biomonitoring of aromatic amines II: Hemoglobin binding of some monocyclic aromatic amines. *Arch Toxicol* 62:110-115
107. Sabbioni G (1992) Hemoglobin binding of monocyclic aromatic amines: molecular dosimetry and quantitative structure activity relationships for the N-oxidation. *Chem Biol Interact* 81:91-117
108. Bryant MS Simmons HF Harrell RE Hinson JA (1994) 2,6-Dimethylaniline-hemoglobin adducts from lidocaine in humans. *Carcinogenesis* 15:2287-2290
109. Koujitani T Yasuhara K Kobayashi H Shimada A Onodera H Takagi H Hirose M Mitsumori K (1999) Tumor-promoting activity of 2,6-dimethylaniline in a two-stage nasal carcinogenesis model in N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-treated rats. *Cancer Lett* 142:161-171
110. Neumann H-G (2005) Monocyclic aromatic amino and nitrocompounds: toxicity, genotoxicity and carcinogenicity, classification in a carcinogen category. *The MAK-Collection Part I: MAK Value Documentations*; pp 3-45; ed.: DFG, Vol. 21; Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
111. Anon (1986) o-Toluidin, -Hydrochlorid. in: *Begründungen der Gesundheitlichen Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten*, ed.: Greim, H.; D-69469 Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH
112. Moyer TP Charlson JR Enger RJ Dale LC Ebbert JO Schroeder DR Hurt RD (2002) Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles. *Clin Chem* 48:1460-1471
113. Benowitz NL (1996) Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 18:188-204
114. Hukkanen J Jacob P Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 57:79-115
115. Grimmer G Schneider D Naujack K-W Dettbarn G Jacob J (1995) Intercept-reactant method for the determination of aromatic amines in mainstream tobacco smoke. *Beitr Tabakforsch Int* 16:141-156
116. Pakhale SS Maru GB (1998) Distribution of major and minor alkaloids in tobacco, mainstream and sidestream smoke of popular Indian smoking products. *Food Chem Toxicol* 36:1131-1138

117. Lin DX Lay JO Bryant MS Malaveille C Friesen M Bartsch H Lang NP Kadlubar FF (1994) Analysis of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in human urinary bladder and lung by alkaline hydrolysis and negative ion gas chromatography-mass spectrometry. *Environ Health Perspect* 102(Suppl.6):11-16
118. Culp SJ Roberts DW Talaska G Lang NP Fu PF Lay JO Teitel CH Snawder JE von Tungeln LS Kadlubar FF (1997) Immunochemical, <sup>32</sup>P-postlabeling, and GC/MS detection of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in human peripheral lung in relation to metabolic activation pathways involving pulmonary *N*-oxidation, conjugation, and peroxidation. *Mutat Res* 378:97-112
119. Martone T Airoidi L Magagnotti C Coda R Randone D Malaveille C Avanzi G Merletti F Hautefeuille A Vineis P (1998) 4-Aminobiphenyl-DNA adducts and *p53* mutations in bladder cancer. *Int J Cancer* 75:512-516
120. Jones CR Sabbioni G (2003) Identification of DNA adducts using HPLC/MS/MS following in vitro and in vivo experiments with arylamines and nitroarenes. *Chem Res Toxicol* 16:1251-1263
121. Hock A (1998) Humanbiomonitoring von DNA-Addukten durch <sup>32</sup>P-Postlabeling: Methodenentwicklung für DC und HPLC. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
122. Roos PH Belik R Follmann W Degen GH Knopf HJ Bolt HM Golka K (2006) Expression of cytochrome P450 enzymes CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 and CYP4B1 in cultured transitional cells from specimens of the human urinary tract and from urinary sediments. *Arch Toxicol* 80:45-52
123. Talaska G Dooley KL Kadlubar FF (1990) Detection and characterization of carcinogen-DNA adducts in exfoliated urothelial cells from 4-aminobiphenyl-treated dogs by <sup>32</sup>P-postlabelling and subsequent thin-layer and high- pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis* 11:639-646
124. Talaska G Schamer M Skipper P Tannenbaum S Caporaso N Unruh L Kadlubar FF Bartsch H Malaveille C Vineis P (1991) Detection of carcinogen-DNA adducts in exfoliated urothelial cells of cigarette smokers: association with smoking, hemoglobin adducts, and urinary mutagenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1:61-66
125. Schlöbe D (2003) Entwicklung einer GC/MS-Analysenmethode zur Bestimmung von 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon-absplattend DNA-Addukten für die Untersuchung der endogenen Nitrosierung von Myosmin bei Ratten. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
126. 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
127. Sommer B Augustin M Schöpf E Sattler G (2001) Tumeszzenz-Lokalanästhesie - Ein neues Verfahren der Lokalanästhesie. *Dtsch Ärzteblatt* 98:545-548
128. Eisenmeier M (1992) Kanzerogenes Potential von Lidocain (Xylocain u.a.). *Arznei-Telegramm*

- 
129. Maier K (2003) Untersuchungen zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von Lokalanästhetika für die Lokalanästhesie und Tumeszynzlokanästhesie. Dissertation aus der Universitätshautklinik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
  130. Anon (1992) Zum kanzerogenen Potential einiger Lokalanästhetika. Arznei-Telegramm 9/92

## 6 Anhang

Tabelle 17: Demographische Daten der HNO-Studie

Patient	Alter (Jahr)	Gewicht (kg)	Größe (cm)	BMI	Prilocain (mg)	m/w	R/NR	Tumor	Krankheitsbild
1	53	50	172	17	50	m	R	J	Plattenepithelkrebs des Hypopharynx
2	47	75	175	24	100	m	NR	N	Cholesteatom
3	42	87	175	28	100	m	NR	J	Karzinom des Oropharynx
4	46	52	162	20	120	m	R	J	Plattenepithelkrebs der Zungenbasis
5	68	108	198	28	100	m	NR	J	Plattenepithelkrebs der Mundhöhle
6	32	55	163	21	100	w	R	N	Cholesteatom
7	60	87	175	28	100	m	R	J	Plattenepithelkrebs im Nackenbereich
8	57	56	157	23	100	w	NR	N	Chronische Mittelohrentzündung
9	75	70	168	25	100	w	NR	J	Plattenepithelkrebs des Nasopharynx
10	74	80	176	26	100	m	R	J	Adenom an der Speicheldrüse
11	38	81	189	23	100	m	NR	J	Lymphangiom der Zungenbasis
12	56	61	160	24	100	w	NR	N	Cholesteatoma
13	25	79	180	24	100	m	R	N	Bruch der Gesichtsknochen
14	23	56	169	20	100	w	R	N	Chronische Mittelohrentzündung
15	17	55	163	21	100	w	NR	N	Nasenseptumkorrektur
16	65	90	160	35	100	w	NR	N	Cholesteatom
17	45	85	173	28	100	m	R	N	Cholesteatom
18	81	70	160	27	100	w	NR	J	Basalzellenkarzinom
19	72	76	170	26	100	m	R	J	Plattenepithelkrebs am Aussenohr
20	27	78	176	25	100	m	R	N	Chronische Mittelohrentzündung
21	38	74	181	23	100	m	NR	N	Nasenseptumkorrektur
22	75	68	170	24	100	m	NR	J	Adenom an der Speicheldrüse
23	68	68	160	27	200	m	R	J	Plattenepithel der Zungenbasis

**Tabelle 18: Hb-Addukte der HNO-Studie**

Patient	o-Toluidin (pg/g Hb)		4-ABP (pg/g Hb)	
	0 h	24 h	0 h	24 h
1	2315	28459	*	*
2	536	57656	*	*
3	227	13729	4,1	4,1
4	186	29006	166,0	229,0
5	61	4366	14,9	n.d.
6	287	9200	34,7	23,0
7	129	8189	191,9	n.d.
8	455	13454	29,4	12,9
9	40908	64364	6,0	4,0
10	580	52856	61,5	20,6
11	70	10710	53,6	52,0
12	359	13328	47,7	16,8
13	829	21961	170,3	246,5
14	262	31961	72,6	92,7
15	407	41201	4,3	7,8
16	1033	17255	38,4	20,0
17	134	12975	14,2	n.d.
18	4832	27335	77,0	32,0
19	375	21131	84,5	156,3
20	159	12530	183,9	240,9
21	667	28998	47,4	41,7
22	1277	31113	17,8	17,8
23	232	50540	296,0	305,0

\* Bei den ersten beiden Probenen wurde noch auf die Bestimmung von 4-ABP verzichtet

**Tabelle 19: Demographische Daten der Prilot-Studie**

Patient	Alter (Jahr)	Gewicht (kg)	Größe (cm)	BMI	Prilocain (mg)	m/w	R/NR	Tumor	Krankheits- bild
1	41	75	186	22	100	m	NR	N	gesund
2	28	64	179	20	100	m	NR	N	gesund
3	28	79	183	24	100	m	NR	N	gesund
4	36	79	187	23	100	m	NR	N	gesund
5	30	66	174	22	100	m	NR	N	gesund
6	31	81	186	23	100	m	NR	N	gesund

**Tabelle 20: Hb-Addukte der Prilotstudie**

Patient	o-Toluidin (pg/g Hb)		4-ABP (pg/g Hb)	
	0h	24h	0h	24h
1	206	22020	47	33
2	37	13198	112	170
3	125	25964	74	52
4	175	23187	20	21
5	127	14989	6	17
6	113	21019	79	60

**Tabelle 21: DNA-Addukte der Prilotstudie**

Patient	o-Toluidin (fmol/µg DNA)		4-ABP (fmol/µg DNA)	
	0h	24h	0h	24h
1	8,62	30,50	0,51	0,36
2	6,62	5,92	n.d.	n.d.
3	1,28	1,59	n.d.	n.d.
4	5,85	4,54	1,17	1,62
5	10,40	15,30	7,37	5,82
6	4,48	8,43	0,25	0,36

## 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 kommissarischen Vorstand des Institutes, Herrn Professor Dr. Peter Eyer, gilt mein Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. Harreus, Herrn Dr. Matthias von der HNO-Abteilung der Poliklinik, München und Herrn Dr. Kleinsasser von der Uniklinik Regensburg danke ich für die Beschaffung der Blut- und Urin-Proben und ihr entgegengebrachtes Interesse an den Ergebnissen dieser Arbeit.

Danke möchte ich auch meinem Kollegen Dr. Manuel Maier, der mir insbesondere beim GC-Troubleshooting stets mit Rat und Tat zur Seite stand, und der durch die vielen gemeinsamen Gespräche über die fachliche Ebene hinaus ein wirklich guter Freund geworden ist.

Einen Dank auch an meine Kolleginnen Bettina Lassnack, Katharina Fuchs, Sarah Vogt und Christiana Oehlmann („Miss Uhli“) für die freundlich-entspannte Atmosphäre im Labor und die vielen, nicht immer rein wissenschaftlichen Gespräche.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da ist und ohne deren Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## Lebenslauf

Name: Gaber  
Vorname: Kerstin Ariane  
Geboren am: 11.07.1975 in München

Schule:

1982-1988	Grundschule an der Ostpreußenstraße, München
1988-1995	Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium, München
1995	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1996-2001	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2001	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2001-2002	Praktisches Jahr bei Protina Pharm. GmbH, Ismaning und in der Winthir-Apotheke, München
2002	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
01/2003	Approbation als Apothekerin

Promotion:

seit 01/2003	Anfertigen einer experimentellen Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Richter am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
--------------	--