

Aus dem Walther-Straub-Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. T. Gudermann

**Humanes Biomonitoring:
Nachweis von DNA-Addukten der aromatischen Amine
ortho-Toluidin und 4-Aminobiphenyl in Harnblasengewebe**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Francine Böhm

aus

Freudenstadt

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Elmar Richter

Mitberichterstatter: PD Dr. Michael Seitz

PD Dr. Oliver Peschel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2012

Sicher zu sein, dass man das glaubt,
was man sagt und tut,
ist der erste Schritt zur Weisheit.

Pam Braun, geb. 1928

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abkürzungen | III |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Krebserkrankungen in Deutschland | 1 |
| 1.1.1 Harnblasenkrebs | 3 |
| 1.1.2 Risikofaktoren für den Harnblasenkrebs | 4 |
| 1.2 Vorkommen aromatischer Amine | 7 |
| 1.2.1 o-Toluidin im Zigarettenrauch | 7 |
| 1.2.2 Entstehung von o-Toluidin durch Spaltung von Azofarbstoffen | 8 |
| 1.2.3 o-Toluidin aus Pharmazeutika | 8 |
| 1.2.4 4-Aminobiphenyl | 8 |
| 1.3 Toxizität der aromatischen Amine | 9 |
| 1.4 Toxikokinetik der aromatischen Amine | 9 |
| 1.4.1 Cytochrom-P450-Monooxygenasen | 11 |
| 1.4.2 N-Acetyltransferasen | 11 |
| 1.4.3 Metabolisierung der aromatischen Amine | 12 |
| 1.5 Kanzerogenese | 14 |
| 1.6 Erkennung, Überwachung und Bewertung von Krebsrisiken durch humanes Biomonitoring | 15 |
| 1.6.1 Bestimmung des Rauchstatus durch Biomonitoring | 17 |
| 1.6.2 DNA-Addukte | 19 |
| 1.6.2.1 Nachweismethoden von DNA-Addukten | 20 |
| 1.6.2.2 DNA-Addukte von 4-ABP und o-Toluidin | 22 |
| 1.7 Ziel der Arbeit | 22 |
| 2 Material und Methoden | 24 |
| 2.1 Material | 24 |
| 2.1.1 Geräte/Zubehör und Parameter | 24 |
| 2.1.2 Materialien | 25 |
| 2.1.3 Chemikalien | 25 |
| 2.1.4 Lösungen und Reagenzien | 26 |
| 2.1.4.1 Stammlösungen der internen Standards | 26 |
| 2.1.4.2 Stammlösungen der Standards | 26 |
| 2.1.4.3 Sonstige Lösungen | 27 |
| 2.1.5 Proben | 27 |
| 2.1.5.1 Proben der Rechtsmedizin | 27 |
| 2.1.5.2 Proben der Universitätsklinik Regensburg | 28 |

| | | |
|------------|--|----|
| 2.2 | Methoden | 28 |
| 2.2.1 | Gewinnung von DNA-Addukten aus humanem Blasengewebe | 28 |
| 2.2.1.1 | Vorbereiten der Gewebe..... | 28 |
| 2.2.1.2 | Isolierung der DNA | 28 |
| 2.2.1.3 | Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration..... | 29 |
| 2.2.1.4 | Saure Hydrolyse und Isolierung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion..... | 29 |
| 2.2.1.5 | Derivatisierung der aromatischen Amine | 30 |
| 2.2.1.6 | Chromatographische Bedingungen..... | 31 |
| 2.2.1.7 | Berechnung des Gehaltes an aromatischen Aminen..... | 32 |
| 2.2.2 | Validierung der Methoden | 33 |
| 2.2.2.1 | Identifizierung der aromatischen Amine in der GC/MS | 33 |
| 2.2.2.2 | Präzision der GC/MS-Anlage | 33 |
| 2.2.2.3 | Bestimmung von Linearität in der GC/MS..... | 33 |
| 2.2.2.4 | Präzision und Wiederfindung in der Bestimmung der DNA-Addukte | 34 |
| 2.3 | Bestimmung der Tabakalkaloide in Urin und Zehennägeln | 34 |
| 2.4 | Statistische Auswertung der Daten | 35 |
| 3 | Ergebnisse | 36 |
| 3.1 | GC/MS-Analyse und Parameter | 36 |
| 3.1.1 | Identifizierung der aromatischen Amine..... | 36 |
| 3.1.2 | Überprüfung der Präzision der GC/MS Anlage..... | 37 |
| 3.1.3 | Bestimmung der Linearität und Wiederfindungsrate | 37 |
| 3.1.4 | Methodenvalidierung für DNA-Addukte aus Gewebeprobe n | 38 |
| 3.2 | Demographische Daten und Raucherstatus | 39 |
| 3.2.1 | Proben von Sektionen aus der Rechtsmedizin | 39 |
| 3.2.2 | Proben von Tumorpatienten aus Regensburg | 42 |
| 3.3 | Bestimmung der DNA-Addukte | 43 |
| 4 | Diskussion | 50 |
| 5 | Zusammenfassung | 57 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 59 |

Abkürzungen

| | |
|-------|---|
| ABP | Aminobiphenyl |
| ADI | Acceptable Daily Intake |
| BG | Berufsgenossenschaft |
| CYP | Cytochrom-P ₄₅₀ -Enzyme |
| dd | doppeldestilliert |
| DFG | Deutsche Forschungsgemeinschaft |
| DCM | Dichlormethan |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| GC | Gaschromatographie |
| Hb | Hämoglobin |
| HBM | Humanes Biomonitoring |
| HFBA | Heptafluorbuttersäureanhydrid |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeitschromatographie |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| IST | Interner Standard |
| HFBA | Heptafluorbuttersäureanhydrid |
| HWZ | Halbwertszeit |
| LA | Lokalanästhetikum |
| MAK | maximale Arbeitsplatzkonzentration |
| MetHb | Methämoglobin |
| MW | arithmetischer Mittelwert |
| MS | Massenspektroskopie |
| NAT | <i>N</i> -Acetyltransferase |
| NCI | Negativ chemische Ionisierung |
| NR | Nichtraucher |
| p.a. | pro analyse |
| PP | Polypropylen |
| R | Raucher |
| RKI | Robert-Koch-Institut |
| SD | Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert (standard deviation) |
| SE | Standardfehler (standard error) |
| S/N | Signal-Rausch-Verhältnis in den Chromatogrammen (signal/noise) |
| s.s. | supra solve |

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen in Deutschland

Nach wie vor stehen Krebserkrankungen als Todesursache in Deutschland mit an vorderster Stelle. Sie sind nach den Erkrankungen des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache für beide Geschlechter. Bei 26% (ca. 216.000 Personen) aller Todesfälle, also jedem vierten Sterbefall, wurden 2008 in Deutschland Tumoren als Ursache festgestellt. Dabei ist der Anteil bei Männern mit 29,2% etwas höher als bei Frauen mit 22,3% [1] (Abb. 1-1).

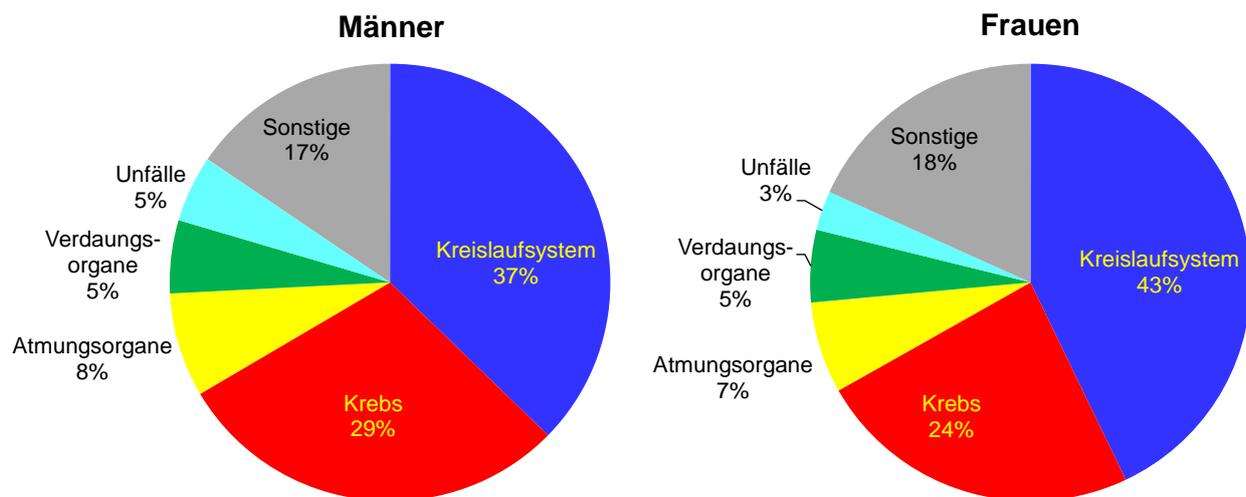


Abb. 1-1: Todesursachen in Deutschland 2008: Prozentualer Anteil an allen Todesfällen (modifiziert nach Becker und Wahrendorf [1])

Bei Männern ist der Lungenkrebs mit 25,9% aller Tumoren die häufigste zum Tode führende Krebskrankheit, bei Frauen ist das mit 19,4% der Brustkrebs (Abb. 1-2). Lange Zeit war bei beiden Geschlechtern der Darmkrebs mit 10-12% die zweithäufigste Krebstodesursache. Erst in den letzten Jahren wurde er bei Frauen vom stark zunehmenden Lungenkrebs überholt (Abb. 1-3), der 2008 mit 15,2% den zweiten Rang einnimmt. Bei Männern hingegen haben die Todesfälle durch Lungenkrebs in den 1980er Jahren ein Plateau erreicht und nehmen seit 1990 deutlich ab. Der Prostatakrebs rangiert bei Männern als Todesursache an dritter Stelle aller Krebserkrankungen, der weitgehend therapieresistente Krebs der Bauchspeicheldrüse bei beiden Geschlechtern an vierter Stelle. Den auffälligsten Rückgang als Todesursache verzeichnet der Magenkrebs, der bei Männern an fünfter und bei Frauen nur mehr an sechster Stelle liegt.

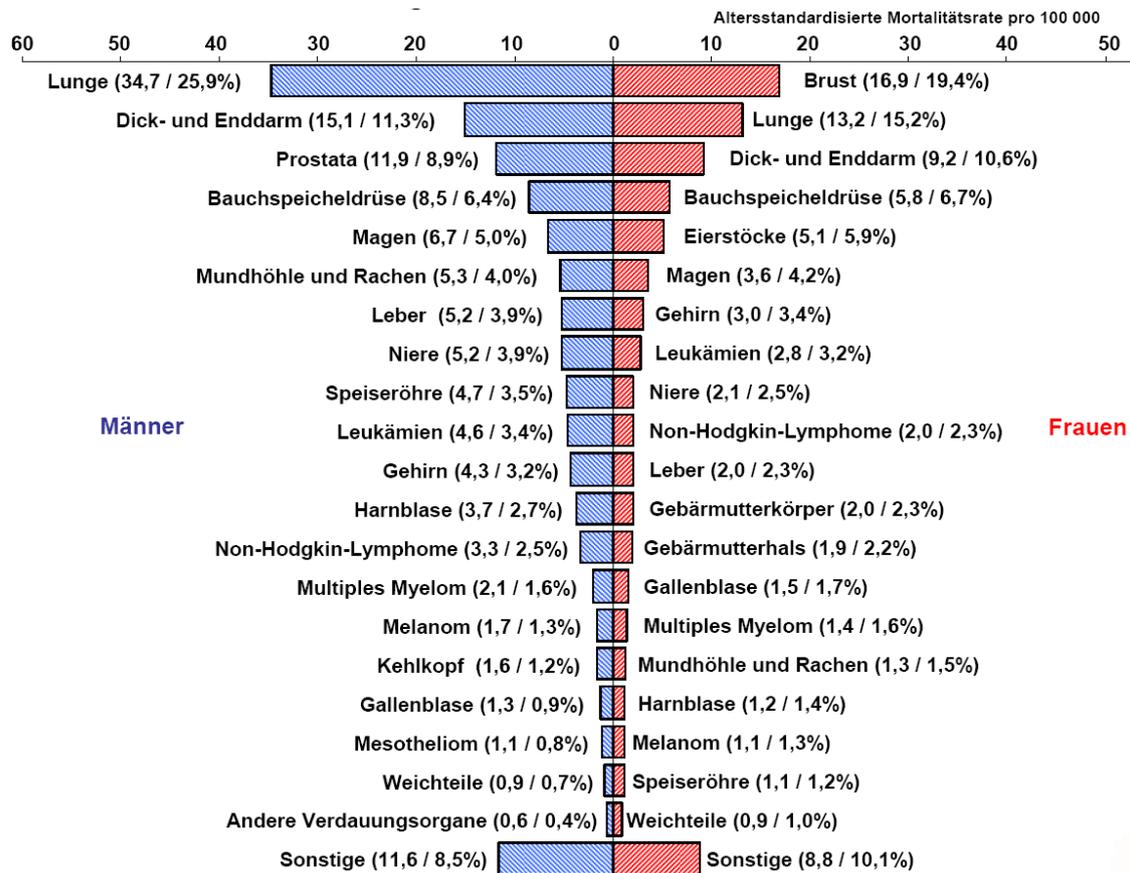


Abb. 1-2: Die 20 häufigsten Krebstodesursachen in Deutschland 2008: Altersstandardisierte Mortalitätsraten und prozentualer Anteil an allen Krebsneuerkrankungen (aus Becker und Wahrendorf [1]).

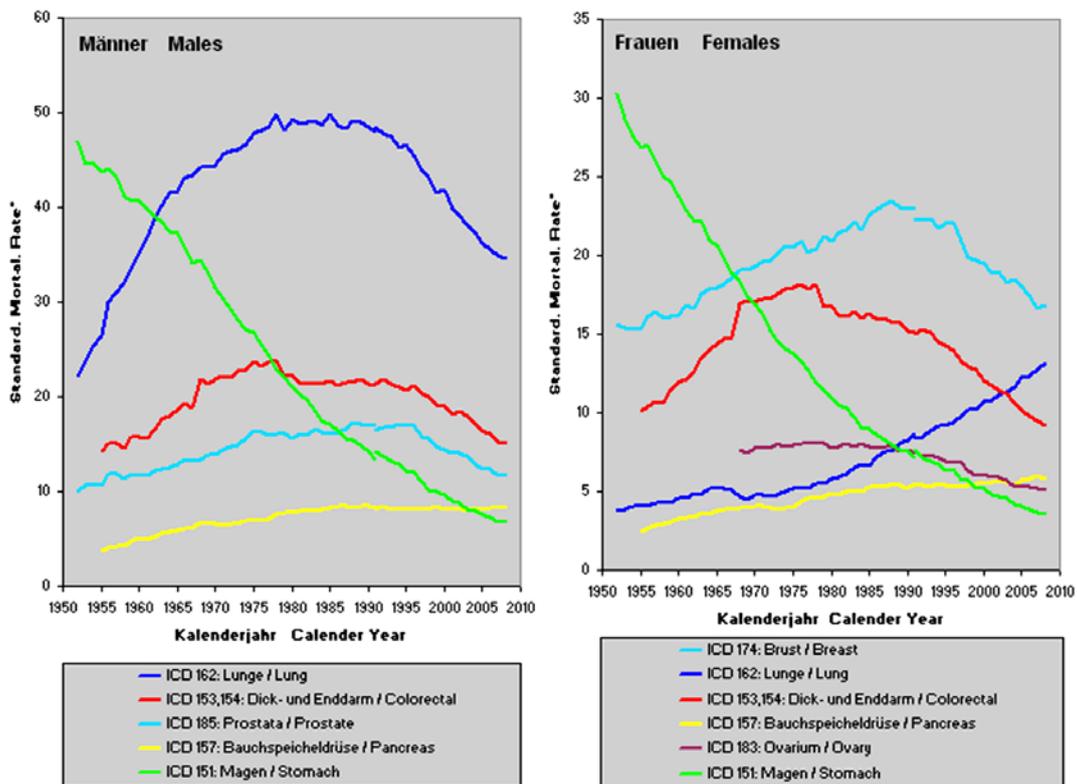


Abb. 1-3: Entwicklung der standardisierten Mortalitätsraten für die 5 (Männer) und 6 (Frauen) häufigsten Krebstodesursachen in Deutschland (aus Becker und Wahrendorf [1]).

Die altersbereinigte Sterblichkeit an bösartigen Neubildungen geht in Deutschland bei Frauen bereits ab den 1950er Jahren kontinuierlich zurück. Seit 1990 ist auch für Männer dieser rückläufige Trend zu beobachten (Abb. 1-4). Trotzdem steigt, bedingt durch die zunehmende Lebenserwartung, die Anzahl der Jahr für Jahr an Krebs versterbenden Personen bei beiden Geschlechtern weiter an. Allerdings deutet sich in den letzten Jahren auch hier eine Verlangsamung an. Wenn sich auf dem Gebiet der Krebsprävention in der nächsten Zeit keine ähnlich durchschlagenden Erfolge einstellen wie bei den Erkrankungen des Kreislaufsystems, wird Krebs in 15-20 Jahren die Todesursache Nummer Eins in Deutschland sein [1].

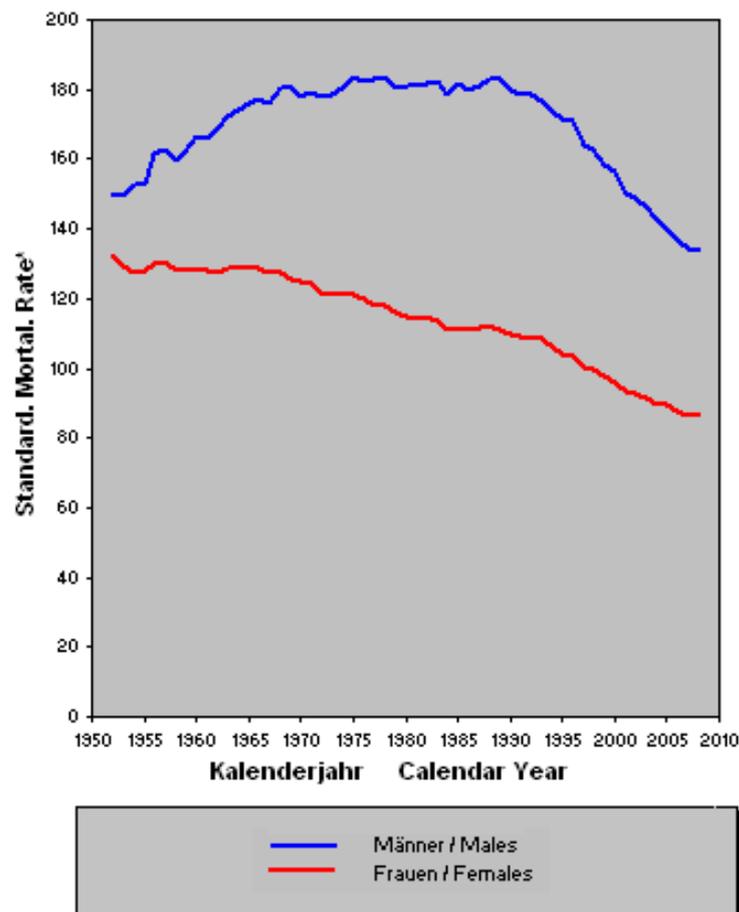


Abb. 1-4: Altersbereinigte Sterblichkeitsrate in Deutschland (aus Becker und Wahrendorf [1]).

1.1.1 Harnblasenkrebs

Tumoren der Harnblase sind in Deutschland derzeit bei Männern dreimal häufiger als bei Frauen. Wie beim Lungenkrebs nahmen die Todesfälle durch Harnblasenkrebs seit 1990 bei Männern stark ab, bei Frauen zeigt sich bislang nur eine schwache Tendenz zur Abnahme (Abb. 1-5)

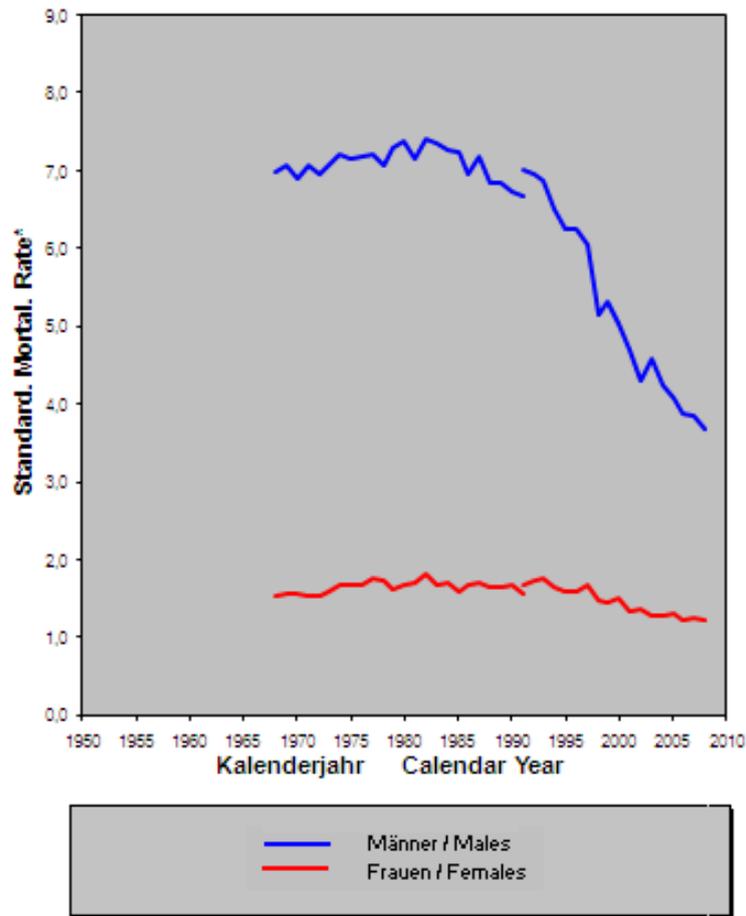


Abb. 1-5: Entwicklung der standardisierten Mortalitätsraten für Harnblasenkrebs in Deutschland (aus Becker und Wahrendorf [1]).

Nach der Gesundheitsberichterstattung des RKI erkrankten einer von 23 Männern und eine von 62 Frauen im Laufe ihres Lebens an Harnblasenkrebs, allerdings zumeist erst im höheren Lebensalter: Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer mit 72 und für Frauen mit 74 Jahren vergleichsweise hoch [2]. Im Jahr 2006 erkrankten 27.410 Menschen in Deutschland an Harnblasenkrebs, davon 19.360 Männer und 8.480 Frauen. Für die noch nicht vorliegenden Daten von 2010 wurden in diesem Bericht fast 30.000 Erkrankungen vorhergesagt. Die deutlich geringere Zahl an Sterbefällen durch Harnblasenkrebs, 5.442 (19,8% der Neuerkrankungen) in 2006, zeigt die relativ günstigen Überlebenschancen für die Gesamtheit dieser Tumoren, die in diesem Maße nicht für die bösartigen Neubildungen der Harnblase gilt, bei denen es sich fast immer um Urothelkarzinome handelt, die auch als Transitionalzellkarzinome (Übergangszellkarzinome) bezeichnet werden. Sehr viel seltener sind Plattenepithelkarzinome oder Adenokarzinome der Harnblase.

Harnblasenkrebs ist in Deutschland der zweithäufigste Tumor im Urogenitalsystem und steht mit 2,7% aller Todesfälle bei Männern im Mittelfeld aller Tumoren, bei Frauen mit 1,4% im unteren Drittel (Abb. 1-2).

Im internationalen Vergleich steht Deutschland hinsichtlich der Neuerkrankungsraten bei Männern wie Frauen an zweiter Stelle hinter Dänemark, während der Vergleich der Sterberaten deutlich günstiger ausfällt (Abb. 1-6).

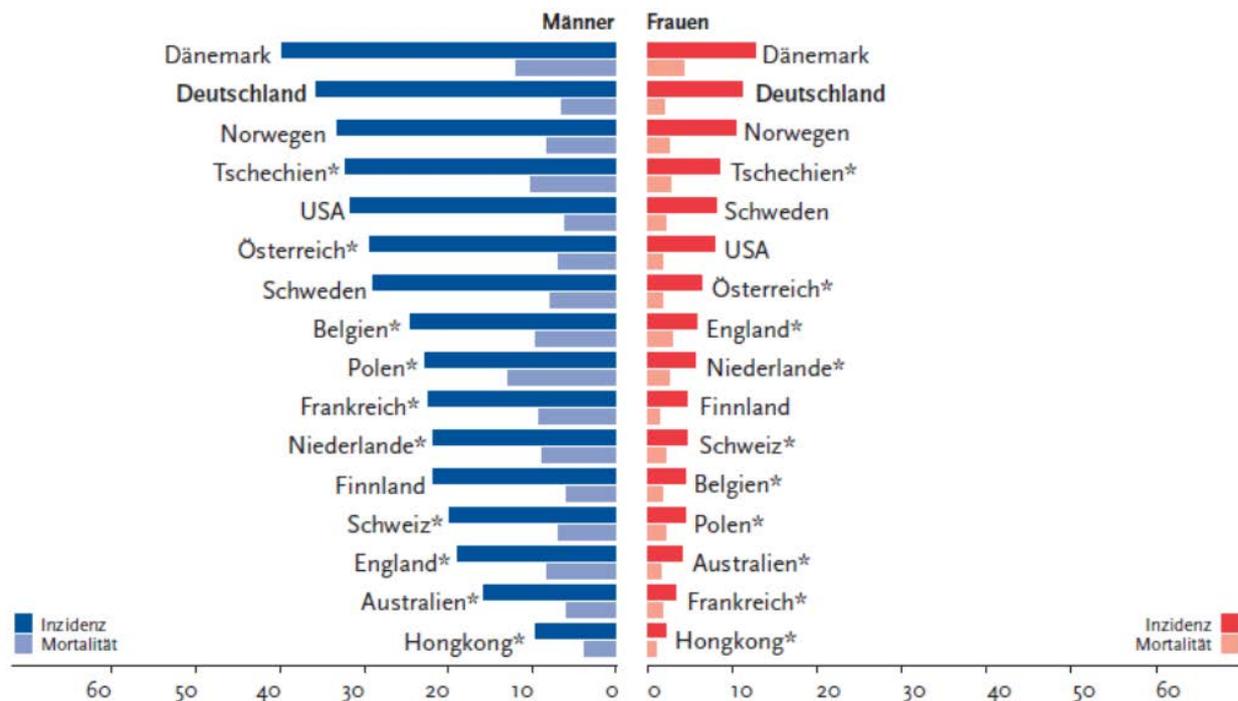


Abb. 1-6: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Mortalitätsraten in Deutschland im internationalen Vergleich 2006 (aus Husmann et al. [2]).

1.1.2 Risikofaktoren für den Harnblasenkrebs

Die wichtigsten Risikofaktoren für den Harnblasenkrebs (Abb. 1-7) sind das Rauchen und berufliche Belastungen mit bestimmten aromatischen Aminen [3]. Man geht davon aus, dass in Deutschland pro Jahr etwa 2.700 Todesfälle durch das Harnblasenkarzinom vermeidbar wären, die Hälfte aller Fälle bei Männern und ein Viertel bei Frauen.

Bei beruflich unbelasteten Menschen ist das Rauchen mit Abstand der wichtigste Risikofaktor. Dies gilt insbesondere für das Zigarettenrauchen und, etwas weniger ausgeprägt, auch für das Rauchen von Zigarren und Pfeifen. Das relative Risiko erhöht sich bei Rauchern von einer Schachtel Zigaretten pro Tag in Fall-Kontroll-Studien aus Europa um durchschnittlich den Faktor 5, in 24 Kohortenstudien aus aller Welt schwankte die Risikoerhöhung zwischen 3- und 5,4-fach [4]. Raucher von Zigaretten aus schwarzem luftgetrockneten (air-cured)

Tabak haben offensichtlich ein höheres Harnblasenkarzinomrisiko als Raucher von Zigaretten aus hellem heißluftgetrockneten (flue-cured) Tabak. Das wird vor allem auf den höheren Gehalt von aromatischen Aminen im Tabakrauch der dunklen Zigaretten zurückgeführt [5].

Aromatischen Aminen ist auch die Allgemeinbevölkerung ausgesetzt (siehe Kapitel 1.2). Als weitere umweltassoziierte Faktoren werden Stoffe diskutiert, die im Trinkwasser als Nebenprodukte der Chlorierung und der Ozonbehandlung entstehen, und in bestimmten Regionen der Erde die erhöhte Belastung mit Arsen. Auch für das im Trinkwasser enthaltene Nitrat wird ein kanzerogenes Potenzial angenommen, weil es nach endogener Reduktion zu Nitrit in Gegenwart von Aminen zur Bildung kanzerogener *N*-Nitroso-Verbindungen führen kann.

Hinsichtlich der Ernährung wird sowohl zu große als auch zu geringe Flüssigkeitsaufnahme als Risikofaktor diskutiert. Die Verwendung von Süßstoffen, die im Tierversuch in hohen Dosen Blasenkrebs erzeugten, tragen aufgrund neuerer Untersuchungen nicht zu einer merklichen Erhöhung des Harnblasenkarzinomrisikos bei. Schutzeffekte durch erhöhten Verzehr von Obst und Gemüse und Vitaminzufuhr spielen im Vergleich zu anderen Krebsformen beim Harnblasenkarzinom nur eine untergeordnete Rolle.

Außerberufliche Risikofaktoren für das Harnblasenkarzinom

- **Deutlich erhöhtes Risiko:**
Zigarettenrauchen
- **Gering erhöhtes Risiko:**
Zigarrenrauchen, Pfeifenrauchen
- **Mögliches Risiko:**
Kaffeekonsum
- **Leicht vermindertes Risiko:**
häufiger Obstverzehr
- **Kein oder unklarer Zusammenhang:**
Alkohol- und Teekonsum, Gemüseverzehr, Aufnahme der Vitamine A oder C

Berufe und Expositionen mit erhöhtem Harnblasenkarzinomrisiko

| Sehr stark erhöhtes Risiko | Deutlich erhöhtes Risiko | Erhöhtes Risiko |
|----------------------------|--|------------------------------------|
| Benzidin | Benzidinfarbstoffe | Teerexposition |
| β-Naphthylamin | Gummiindustrie | Friseure |
| 4-Aminobiphenyl | Kokereiarbeiter | Steinkohlenbergleute untertage |
| 4-Chlor-o-toluidin | Maler (vor 1960) | Chemische Reinigung |
| | Aluminiumelektrolyse nach Söderberg | Dinitrotoluol-haltige Sprengstoffe |
| | Massive Exposition gegenüber Verbrennungsprodukten | |
| | Toluidin | |

Abb. 1-7: Risikofaktoren für das Harnblasenkarzinom (modifiziert nach Golka et al. [3]).

Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid führen zu vermehrtem Auftreten von Harnblasenkarzinomen, die offensichtlich eine ungünstigere Prognose haben. Auch die Strahlentherapie im Beckenbereich, z.B. bei Zervixkarzinompatientinnen erhöht das Risiko. Historische Beispiele für medikamentös ausgelöste Harnblasenkarzinome stellen die durch Chlornaphazin (bis 1963 eingesetzt) oder Phenacetin (bis 1986 erhältlich) induzierten Tumoren dar. Schließlich ist auch bei mehrjähriger Ableitung des Harns mittels Katheter zumindest bei Quer-

schnittgelähmten ein erhöhtes Harnblasenkarzinomrisiko bekannt. Das steht in Einklang mit der Beobachtung, dass Infektionen und/oder Steine der ableitenden Harnwege das Harnblasenkarzinomrisiko erhöhen.

Die kanzerogene Wirkung aromatischer Amine wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts erkannt. 1895 beschrieb Rehn gehäuft auftretende Fälle von Blasenkrebs bei Arbeitern in einer Farbenfabrik als „Anilinkrebs“ [6]. In der Folgezeit wurden die Krebserkrankungen hauptsächlich auf die im Produktionsprozess anfallenden bicyclischen Amine 4-Aminobiphenyl (4-ABP), Benzidin und Naphthylamin zurückgeführt [7]. Diese Substanzen gehörten mit zu den ersten Krebsgiften, die von dem Krebsforschungsinstitut der WHO, der International Agency for Research on Cancer (IARC), in die Klasse 1 als sicher kanzerogen für den Menschen eingestuft wurden [8]. Trotz weitgehender Vermeidung der Belastung mit diesen Aminen gibt es eine anhaltend erhöhte Inzidenz von Harnblasenkrebs in bestimmten Berufsgruppen. Das hat dazu geführt, dass neben einem weiteren bicyclischen Amin, dem 4,4'-Methylenbis(2-chloranilin), auch das monocyclische *ortho*-Toluidin als Humankanzerogen eingestuft wurde (Abb. 1-8) [8,9].

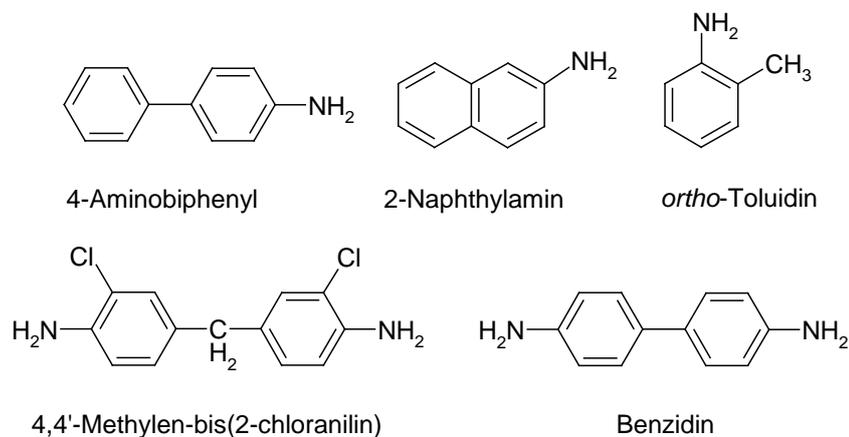


Abb. 1-8: Strukturformeln, der von der IARC als Humankanzerogen, Klasse 1, eingestuften aromatischen Amine [8]

Im Zusammenhang mit aromatischen Aminen werden von der IARC Tätigkeiten in der Produktion von Auramin, Magenta und Farben, die Benzidin freisetzen, in die Klasse 1 der für den Menschen gesicherten kanzerogenen Belastungen eingestuft [8]. Auch Beschäftigungen als Maler und in der Gummiindustrie gelten als Risikofaktoren. Bei Friseuren, die jahrelang mit Haarfärbemitteln gearbeitet haben, wurden in epidemiologischen Untersuchungen in den USA und in Europa Hinweise auf eine erhöhte Inzidenz von Harnblasenkrebs gefunden [10,11].

Weitere beruflichen Expositionen, die mit einem erhöhten Harnblasenkarzinomrisiko einhergehen, sind eine langjährige Tätigkeit unter Tage im Steinkohlenbergbau, die Tätigkeit als Schornsteinfeger, eine hohe Exposition gegenüber dem Sprengstoff Dinitrotoluol, der insbesondere in der früheren DDR verwendet wurde, sowie eine hohe Exposition gegenüber Tetrachlorethen in chemischen Reinigungen [3].

1.2 Vorkommen aromatischer Amine

Aromatische Amine sind Stoffe, die bei der Herstellung von Farbstoffen, Pharmazeutika, Pflanzenschutzmittel, Kunststoffen und Gummiprodukten als Zwischenprodukte auftreten. Eine Exposition des Menschen mit diesen Stoffen wird möglich, wenn aromatische Amine aus Produkten freigesetzt werden z.B. durch die reduktive Abspaltung aus Azofarbstoffen, Reduktion von Nitroaromaten oder Metabolisierung von Stoffen z.B. Arznei- und Pflanzenschutzmittel im menschlichen Organismus. Ein weitere wichtige Quelle ist das Rauchen. Hier entstehen die aromatischen Amine beim Verbrennen des Tabaks. Auch bei anderen Verbrennungs- und Erhitzungsvorgängen entstehen aromatische Amine und Nitroaromaten, die z.B. in Autoabgasen, Bratfetten und selbst in Tierfutterpellets nachzuweisen sind. Durch die weite Verbreitung der aromatischen Amine als Verunreinigungen der Umwelt kommt der Mensch auch über die Luft, das Trinkwasser und die Nahrung mit diesen Stoffen in Kontakt [10,12].

In der vorliegenden Arbeit wurden die aromatischen Amine *o*-Toluidin und 4-ABP untersucht, weshalb deren Quellen vermehrt hier im Fokus stehen.

1.2.1 *o*-Toluidin im Zigarettenrauch

Im Hauptstromrauch, das ist der Anteil, den der Raucher einsaugt und wieder ausatmet, finden sich Konzentrationen von 0,011-0,5 µg pro Zigarette [10]. Die unterschiedlichen Mengen sind auf verschiedene Zigarettenmarken zurückzuführen. Im Nebenstromrauch, der zwischen den Zügen beim Verglimmen der Zigarette entsteht, wurden von einer Arbeitsgruppe pro Zigarette fast 100-fach höhere Konzentrationen, 2-4 µg im Vergleich zu 0,024-0,049 µg im Hauptstromrauch gefunden [13]. Trotzdem war die Konzentration von *o*-Toluidin in der Innenraumluft von Raucherhaushalten mit 5-10 ng/m³ nur geringfügig höher als in der Innenraumluft von Nichtraucherhaushalten mit 3-6 ng/m³. Das spricht für signifikante weitere Quellen von *o*-Toluidin und bestätigt die Ergebnisse des Biomonitoring (siehe Kap. 1.6.1).

1.3 **Toxizität der aromatischen Amine**

Die aromatischen Amine besitzen nur eine geringe akute Toxizität. Die orale LD₅₀ liegt bei Ratten und Kaninchen für 4-ABP bei 2 g/kg [20] und für *o*-Toluidin bei 0,6-1 g/kg [21]. Bei *o*-Toluidin kommt es zu Symptomen wie Zyanose und Lethargie, ein Hinweis auf die Methämoglobinbildung, die auch nach Prilocaingabe beim Menschen beobachtet wird [22,23]. Ausgelöst durch die Reduktion des Hydroxylamins zum Nitrosoaromaten (Abb. 1.11), einer metabolischen Zwischenstufe der aromatischen Amine, wird das zweiwertige Eisen im Oxyhämoglobin zum dreiwertigen Eisen oxidiert, es entsteht das Methämoglobin (MetHb). Die Fähigkeit Sauerstoff zu transportieren, vermag lediglich das Oxyhämoglobin nicht das MetHb. Es resultiert ein Sauerstoffmangel im Blut. Eine MetHb-Rate von weniger als 20% wird meist problemlos vertragen, sind jedoch mehr als 50% des Hämoglobins (Hb) oxidiert, kann das für den Menschen lebensbedrohlich sein. In diesem Zusammenhang ist es verständlich, dass bei Verwendung von Prilocain vor der durch *o*-Toluidin ausgelösten MetHb-Bildung gewarnt wird, insbesondere bei Säuglingen, bei denen die MetHb-Reduktase noch nicht ausgereift ist [16,17].

Das Hauptproblem ist jedoch die kanzerogene Wirkung nach Langzeitbelastung mit den aromatischen Aminen und die beiden hier untersuchten Amine 4-ABP und *o*-Toluidin sind als krebserzeugend für die menschliche Harnblase eingestuft worden (Kap. 1.1.2). Bei den durch die Berufsgenossenschaften (BG) als Berufskrankheiten anerkannten Fälle, nehmen die der ableitenden Harnwege durch aromatische Amine etwa 5% ein. Damit liegt diese Art der Krebserkrankung an vierter Stelle der anerkannten Berufskrankheiten. Bei den BG wurden in den letzten drei Jahren ca. 400 Fälle gemeldet, wovon 20-30% anerkannt wurden [24].

Im Tierversuch werden jedoch nicht immer Tumoren in der Harnblase, sondern auch in der Leber und anderen Organen und Geweben gesehen [12,21,25]. Dies hat lange Zeit dazu geführt, dass das krebserzeugende Potenzial von *o*-Toluidin für die Harnblase in Zweifel gezogen wurde.

1.4 **Toxikokinetik der aromatischen Amine**

Unter Toxikokinetik versteht man in Anlehnung an die Pharmakokinetik die Umsetzung des Giftes im Organismus oder, anders ausgedrückt, was das Lebewesen mit dem Gift macht. Sie veranschaulicht quantitativ die Vorgänge, die bei der Invasion und Elimination eines Stoffes und seiner toxikologisch relevanten Metaboliten im Organismus ablaufen (Abb. 1-10). Die Invasion umfasst nach dem so genannten „ADME-Prinzip“ die Resorption (Absorption), die

Verteilung in verschiedene Gewebe und Körperregionen (**Distribution**), die häufig zur reversiblen Bindung der Fremdstoffe an Gewebebestandteile führt, die für die Wirkung, die Toxikodynamik, verantwortlich ist. Die Stoffe können aber auch durch Bindung an Plasmaproteine oder Ablagerung im Fettgewebe gespeichert werden und sich so der Elimination entziehen. Die **Elimination** kann durch Ausscheidung des Gifts, meist über die Nieren, seltener auch über den Darm und die Lunge erfolgen. Viele Stoffe müssen jedoch erst durch **Metabolisierung** im Körper hydrophiler und somit leichter ausscheidbar gemacht werden. Dies gilt auch für die aromatischen Amine, die aufgrund ihrer Lipophilie sehr gut über den Gastrointestinaltrakt, die Atemwege und die Haut resorbiert werden. Die Elimination erfolgt im wesentlichen erst nach Metabolisierung.

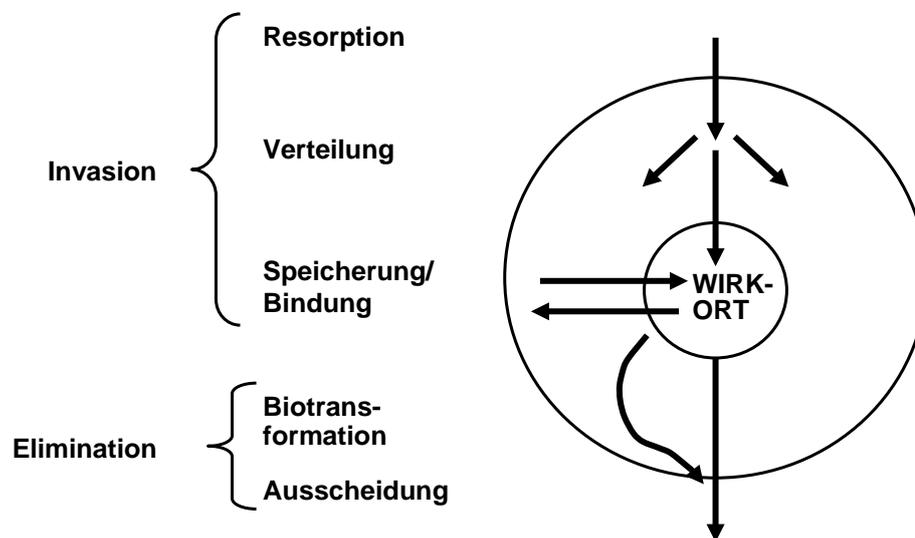


Abb. 1-10: Toxikokinetik [26]

Die Biotransformation der Gifte erfolgt durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme, deren Reaktionen in **Phase I**, Funktionalisierungsreaktionen mit Einführung oder Freilegung funktioneller Gruppen, häufig Hydroxylgruppen, und **Phase II**, Konjugationsreaktionen, d.h. Kopplungen mit polaren Molekülen wie Glucuronsäure, Sulfat, Acetat oder Glutathion, unterschieden werden (Abb. 1-11). Obwohl die Biotransformation in erster Linie der Elimination der Fremdstoffe dient, können dabei auch reaktive Zwischenstufen entstehen, die an der DNA und anderen Makromolekülen binden und für cytotoxische und genotoxische Wirkungen verantwortlich sind.

Für den Metabolismus der aromatischen Amine spielen in der Phase I Enzyme des Cytochrom-P₄₅₀ Systems die Hauptrolle und bei den Phase II Enzymen die Glucuronidierung und die N-Acetylierung [27].

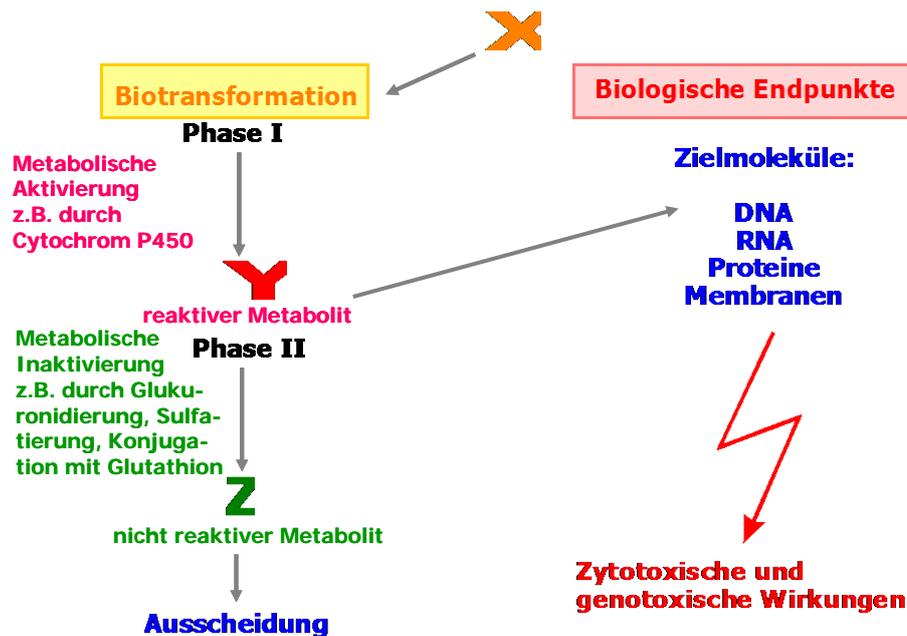


Abb. 1-11: Die Rolle des Fremdstoffmetabolismus für Elimination und Giftung

1.4.1 Cytochrom-P₄₅₀-Monooxygenasen

Die zentralen Enzyme des Phase-I-Metabolismus sind die **Cytochrom-P₄₅₀-Monooxygenasen** (CYP). Von den 18 beim Menschen identifizierten CYP-Genfamilien sind die ersten drei Familien mit zwölf Isoformen von größter Bedeutung für den Fremdstoffwechsel [28]. Die Umsetzung von Stoffen durch CYP geschieht in einer NADPH-abhängigen Reaktion, wobei molekularer Sauerstoff auf das Substrat in Form einer Epoxidierung, Hydroxylierung oder auch durch die N-Oxidation (bei aromatischen Aminen) übertragen wird.

1.4.2 N-Acetyltransferasen

Die im Cytosol der Leberzellen vorliegenden N-Acetyltransferasen (NAT) zählen zu den Phase-II-Enzymen und sind für die Metabolisierung der aromatischen Amine wichtig. Die NAT benötigen als Cofaktor Acetyl-Coenzym A und übertragen den Acetylrest auf den Stickstoff der Aminogruppe. Beim Menschen sind zwei Formen bekannt, die NAT1 und 2, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden und für die Aktivierung bzw. Inaktivierung der aromatischen Amine wichtig sind. Für beide Enzyme ist eine Vielzahl von Mutationen bekannt, die mit einer veränderten biologischen Aktivität einhergehen. Dieser in der Arzneimitteltherapie aber auch toxikologisch bedeutsame Polymorphismus ist bei der NAT2 besonders stark ausgeprägt [29]. Weltweit herrschen große ethnische Unterschiede in der Aktivität der NAT2. In den arabischen Ländern sind 80-90%, in Europa und Afrika 40-70% der Bevöl-

kerung langsame Acetylierer. In Asien dagegen sind es nur 10-20%, die eine geringe Aktivität der NAT2 aufzeigen. Dagegen spielen Umwelteinflüsse, wenn überhaupt, bei den NAT nur eine untergeordnete Rolle.

1.4.3 Metabolisierung der aromatischen Amine

In der Abbildung 1-12 sind wichtige Schritte der Metabolisierung von aromatischen Aminen zusammengefasst. Auf eine vollständige Darstellung mit Einschluss von Ringhydroxylierungen, Sulfatierung und weiteren Reaktionen wurde verzichtet, obwohl sie wie z.B. die Hydroxylierung in para-Stellung beim *o*-Toluidin durchaus einen hohen Anteil am Gesamtstoffwechsel ausmachen [30].

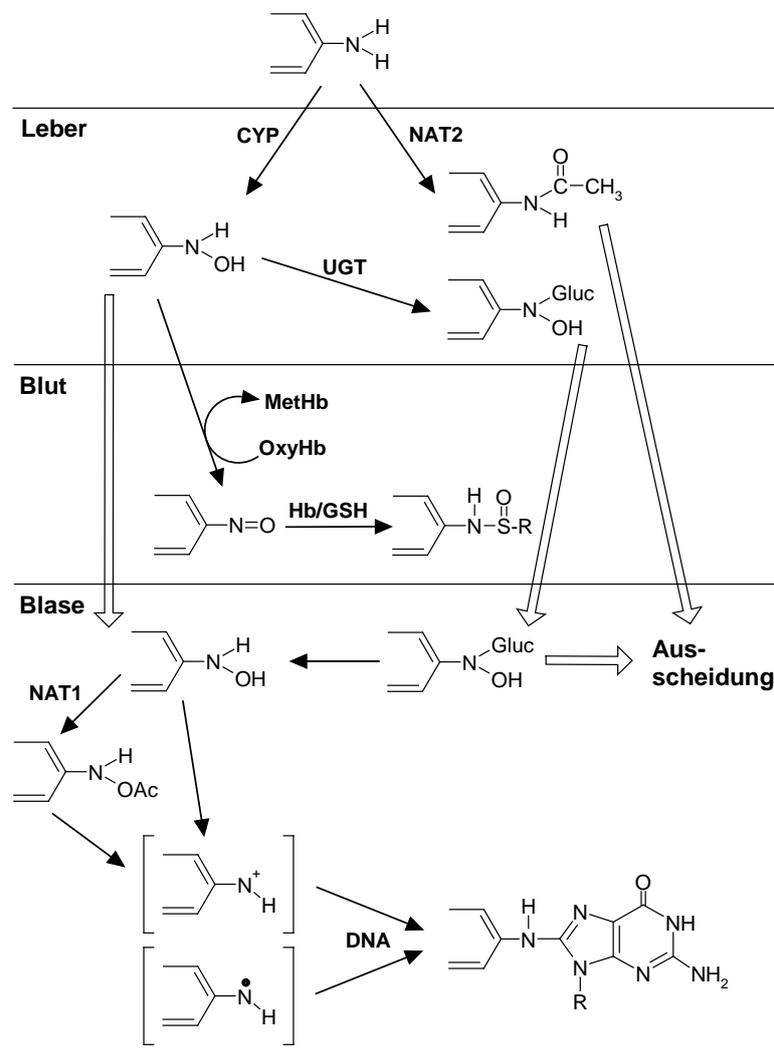


Abb. 1-12: Metabolisierung aromatischer Amine (modifiziert nach Richter und Pfau [12]).

Das aromatische Amin wird durch die CYP-vermittelte N-Hydroxylierung in der Leber aktiviert oder durch die NAT2 entgiftet. Auch die N-Glucuronidierung wird überwiegend als Entgiftungsreaktion betrachtet. Das N-Hydroxylamin wird nun von der Leber über das Blut zur Blase transportiert. Auf zweierlei Wegen können dort reaktive Nitrenium-Ion Intermediate

gebildet werden. Zum einen über die *O*-Acetylierung durch die NAT1, zum anderen durch Wasserabspaltung bei saurem pH. Diese Nitrenium-Intermediate können nun an die DNA binden. Aromatische Amine lagern sich am häufigsten an das C8-Atom des Guanins an [12].

Für die metabolische Aktivierung der aromatischen Amine wurde lange Zeit dem CYP1A2 die entscheidende Rolle zugesprochen [31]. 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. Inhaltsstoffe des Zigarettenrauches induzieren CYP1A2. In einer Studie mit über 800 Probanden wurde eine Erhöhung der Enzymaktivität bei Rauchern um das 1,7-Fache im Vergleich zu Nichtrauchern gefunden [32]. Neben dem Einfluss von Umweltfaktoren kann die Aktivität von CYP1A2 auch von einem Polymorphismus abhängen. Neuere Daten zeigen, dass neben dem CYP1A2 auch die Isoenzyme CYP1A1 und CYP1B1 für die metabolische Aktivierung von Bedeutung sind. Diese Isoenzyme werden ebenfalls durch das Rauchen und andere Umweltfaktoren induziert [31].

Hinsichtlich der NAT lässt sich sagen, dass die NAT2 hier eine Entgiftungsfunktion hat, wohingegen es durch die NAT1 zur Giftung kommt [29]. Schnelle Acetylierer mit funktioneller NAT2 sind weniger empfindlich gegenüber den Giftwirkungen der aromatischen Amine. Dies wurde anhand niedrigerer Hb-Adduktraten bei gleicher Belastung gegenüber aromatischen Aminen nachgewiesen [33,34]. Auch ist bekannt, dass schnelle Acetylierer ein vermindertes Blasenkrebsrisiko haben [29]. Der Polymorphismus der NAT2 beeinflusst auch die renale Elimination der aromatischen Amine. Welchen quantitativen Einfluss der Acetyliererstatus auf die Höhe der Belastung der Normalbevölkerung hat, ist bisher nicht bekannt [10].

Die Zusammenhänge zwischen N-Oxidation durch CYP1A2 und N-Acetylierung durch NAT2 erklären, dass starke Raucher (hohe CYP1A2-Aktivität), die zusätzlich langsame Acetylierer sind, die höchsten Hb-Adduktraten von 4-ABP hatten [33]. Bei monocyclischen Aminen sind diese Zusammenhänge noch weitgehend ungeklärt [35]. Der Anstieg der Hb-Addukte von *o*-Toluidin war nach Prilocaingabe bei Rauchern nicht höher als bei Nichtrauchern [36]. Dies spricht gegen eine wesentliche Beteiligung von CYP1A2 an der metabolischen Aktivierung von *o*-Toluidin und bestätigt Ergebnisse mit Ratten, bei denen die Hb-Addukte nach *o*-Toluidin-Gabe durch Vorbehandlung mit Phenobarbital, einem Induktor der CYP2-Familie, aber nicht mit β -Naphthoflavon, einem Induktor von Enzymen der CYP1-Familie, erhöht wurden [37].

1.5 Kanzerogenese

Unter der chemischen Kanzerogenese versteht man die Induktion von benignen (gutartigen) und malignen (böartigen) Tumoren durch chemische Substanzen. Der Stoffwechsel einer Tumorzelle ist verändert und die Zelle obliegt einem autonomen (unkontrollierbarem, überschießendem) Wachstum. Böartige Tumore gehen von einer Zelle aus. Sie sind monoklonal. Die Krebsentstehung ist ein langwieriger Prozess. Die Zeitspanne zwischen der Belastung mit Kanzerogenen und dem Auftreten klinisch manifester Tumoren kann Jahre betragen. In der Literatur sind bis zu 40 Jahre beschrieben. Zwar werden nur 7% der in der DNA enthaltenen genetischen Information in einer differenzierten Zelle exprimiert, diese Bereiche sind aber weniger stark verdichtet (Euchromatin) und somit angreifbarer für chemische Stoffe.

Man unterscheidet zwischen genotoxischen und epigenetischen 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, Alkylantizien, polycyclische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine. Für die epigenetische Kanzerogenese sind nicht Reaktionen des Kanzerogens mit der DNA für die Krebsentstehung verantwortlich, vielmehr spielen hier hormonelle Einflüsse, chronische Entzündungskrankheiten, Cytotoxizität und Tumorpromotoren eine entscheidende Rolle.

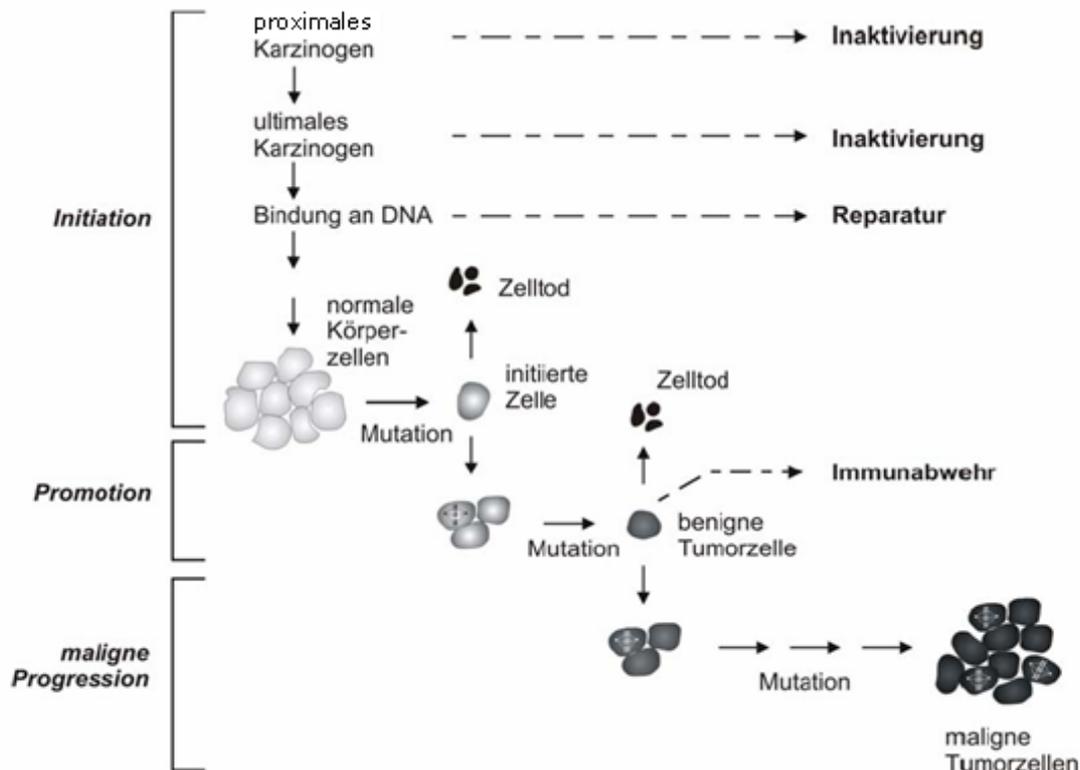


Abb. 1-13: Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese

Die Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle verläuft unter Veränderungen im Erbgut in mehreren Schritten (Abb. 1-13). Bei der Initiation kommt es zu einer irreversiblen vererbbaaren schädigenden Veränderung der DNA, wobei im Anschluss an die Replikation eine Mutation ausgelöst wird. Die initiierte Zelle teilt sich weiter und es kommt zur Promotion, also zur Beschleunigung der Tumorentstehung. Auch reagieren initiierte Zellen auf einen Tumorpromotor in deutlich stärkerem Maße als normale Zellen des gleichen Gewebes. In diesem Stadium ist der Tumor klinisch fassbar. Weitere Mutationen führen zu einer Zunahme der Wachstumsautonomie und des destruierenden Potenzials. Ebenfalls nimmt die Metastasierungsfähigkeit des Tumorgewebes zu und die Malignität steigt. Die Erhöhung der Malignität bezeichnet man als Progression [38].

1.6 Erkennung, Überwachung und Bewertung von Krebsrisiken durch humanes 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 Grenzwerten für die Aufnahme durch die Allgemeinbevölkerung (acceptable daily intake = ADI) und am Arbeitsplatz (maximale Arbeitsplatzkonzentrationen = MAK) waren erste wichtige Schritte, um die Gesundheitsgefährdung des Menschen durch diese Schadstoffe zu bestimmen und zu bewerten [39].

Im humanen Biomonitoring (HBM) werden Umwelteinflüsse auf den Menschen erfasst und überwacht. Darüber hinaus vervollständigt das HBM die erhobenen Daten zur äußeren Exposition. Es kann somit eine direkte Beziehung zwischen der äußeren Belastung und einer Gesundheitsgefährdung hergestellt werden. Das HBM wird in drei Kategorien geteilt: Man unterscheidet das Belastungsmonitoring, das Effektmonitoring und das Suszeptibilitätsmonitoring [40,41].

Beim **Belastungsmonitoring** werden Fremdstoffe oder deren Metaboliten in Körperflüssigkeiten, Ausscheidungsprodukten und leicht zugänglichen Geweben wie z.B. Blut, Speichel, Urin, Fäces, Atemluft, Mundschleimhaut, Biopsien, Haaren, Nägeln oder Zähnen gemessen. Es dient als Maß für die tatsächlich aufgenommene Schadstoffdosis und spiegelt zudem die Besonderheiten bezüglich der Aufnahme, Speicherung, Metabolisierung und Ausscheidung der Fremdstoffe im menschlichen Organismus wider.

Beim **Effektmonitoring** werden Parameter gemessen, die auf Fremdstoffbelastungen reagieren oder deren Wirkung anzeigen. Hierbei können quantitative Aussagen durch Erfassen von

Reaktionen und Wechselwirkungen der Fremdstoffe mit z.B. Proteinen (Hämoglobinaddukte) und Nukleinsäuren (DNA-Addukte) bei Belastung mit kanzerogenen Substanzen gemacht werden.

Das Messen modulierender Eigenschaften bestimmter Gene bzw. Gengruppen auf den Metabolismus und die Toxizität von Fremdstoffen bezeichnet man als **Suszeptibilitätsmonitoring**. Als Beispiel sei hier die Modulation der Expression von Tumorsuppressorgenen oder Wachstumsfaktoren genannt. Die Bestimmung von Phase I oder Phase II-Enzymen zählt hier ebenso dazu wie das Instrumentarium der DNA-Reparatur.

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 umweltmedizinischen Fremdstoffen so genannte HBM-Werte (Human-Biomonitoring-Werte) festgelegt [42]. HBM-Werte sind stoffbezogen, werden nach toxikologischen und epidemiologischen Erkenntnissen festgelegt und schließlich in Form von Stoffmonographien publiziert. Man unterscheidet dabei die HBM-Werte I und II (Abb. 1-14). Wird der HBM-Wert I unterschritten, ist keine Gesundheitsgefährdung zu erwarten und es besteht kein akuter Handlungsbedarf. Wird der HBM-I-Wert überschritten, ist eine gesundheitliche Beeinträchtigung nicht sicher auszuschließen. Man kontrolliert die Werte, sucht Belastungsquellen und vermindert die Belastung unter vertretbarem Aufwand. Bei einer Überschreitung des HBM-Wert II ist dagegen eine gesundheitliche Beeinträchtigung bei Exposition möglich. Es besteht hier akuter Handlungsbedarf zur Reduktion der Belastung und es bedarf einer umweltmedizinischen Betreuung.

| | <u>Gesundheitliche Beeinträchtigung</u> | <u>Handlungsbedarf</u> |
|---|--|---|
| HBM-II ----- (Interventionswerte) | möglich | - umweltmedizinische Betreuung - akuter Handlungsbedarf zur Reduktion der Belastung |
| | nicht ausreichend sicher ausgeschlossen | - Kontrolle der Werte (Analytik, zeitlicher Verlauf) - Suche nach spezifischen Belastungsquellen - ggf. Verminderung der Belastung unter vertretbarem Aufwand |
| HBM-I ----- (Prüfwert) | nach derzeitiger Bewertung unbedenklich | - kein Handlungsbedarf aus toxikologischer Sicht |

Abb. 1-14: Die Definition der HBM-Werte und ihre umweltmedizinische Bedeutung [42].

Die zweite Herangehensweise zur Bewertung von Analyseergebnissen ist neben der Ermittlung von HBM-Werten die Bestimmung von expliziten Referenzwerten bzw. Referenzbereichen, die von der Kommission Human-Biomonitoring erstellt werden. Man wertet dabei Messungen in biologischem Material von „Gesunden“ der Allgemeinbevölkerung aus. Als Berechnungsgrundlage dient hier ein 95 %-Konfidenzintervall. (das heißt: in 95 von 100 Fällen enthalten die errechneten Intervallgrenzen den wahren Wert). Wird der Referenzbereich deutlich überschritten, liegt mit ausreichender Wahrscheinlichkeit eine das allgemeine Maß übersteigende Schadstoffkontamination vor.

Während es sich bei den HBM-Werten um toxikologische Wertsetzungen handelt, beschreiben die statistisch abgeleiteten Referenzwerte das jeweilige Belastungsniveau (ubiquitäre Hintergrundbelastung) in der Allgemeinbevölkerung [42].

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 [41].

1.6.1 Bestimmung des Rauchstatus durch Biomonitoring

Das Rauchen ist der wichtigste singuläre Krebsrisikofaktor. Man schätzt, dass ein Drittel aller Krebserkrankungen durch Verzicht auf das Rauchen vermieden werden können (Abb. 1-15) [43].

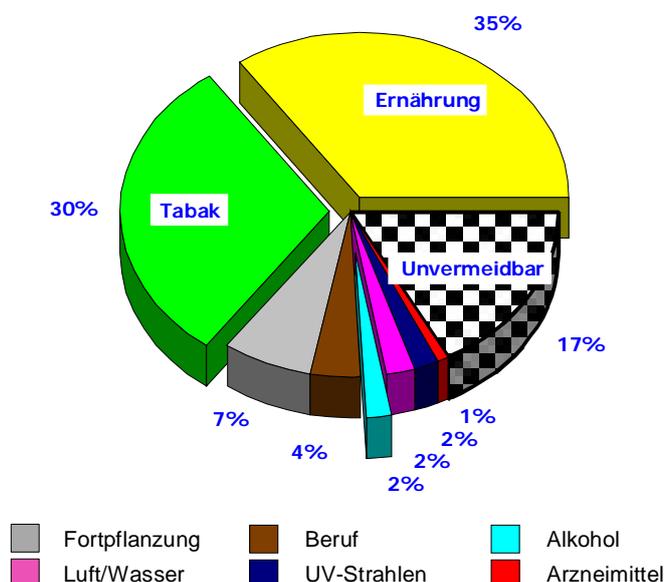


Abb. 1-15: Krebsrisikofaktoren

Selbst die Belastung von Nichtrauchern durch Tabakrauch, dem sogenannten "environmental tobacco smoke" (ETS), wird von der IARC als kanzerogen für den Menschen eingestuft [4]. Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen zu Krebsrisiken ist deshalb die Bestimmung des Rauchstatus von großer Bedeutung. Die sicherste Methode besteht in der Messung von Nicotin und seinen Metaboliten in Körperflüssigkeiten, bevorzugt im Urin [44]. Dieses Belastungsmonitoring wird am einfachsten durch Messung des Hauptmetaboliten Cotinin vorgenommen. Cotinin hat gegenüber Nicotin den Vorteil einer deutlich längeren Verweilzeit im menschlichen Körper, die Halbwertszeit beträgt 13-19 Stunden gegenüber nur 1,7-2,5 Stunden für Nicotin [45].

Vorteilhaft ist die Messung des Cotiningehalts im 24-Stunden Urin, welche die gesamte Belastung innerhalb eines Tages widerspiegelt. Häufig steht jedoch nur ein sogenannter Spot-Urin zur Verfügung. Die Messung der Cotininkonzentration kann hier zu fehlerhafter Einschätzung der Belastung führen, weil sie von der Konzentrierung des Urins abhängt. Deshalb wird die Cotininkonzentration häufig durch die Creatininkonzentration geteilt. So kommt man zu einer weitgehend zuverlässigen Einschätzung der Rauch- und Passivrauchbelastung. Für die Unterscheidung von Rauchern und Nichtrauchern werden Grenzwerte, sogenannte cut-off-Werte herangezogen, meist 150 ng Cotinin/mg Creatinin [44].

Gelegenheitsraucher und Raucher, die seit einigen Tagen nicht geraucht haben, können mit diesem Parameter aber nicht sicher erfasst werden. Man versucht diese Lücke durch Bestimmung von Nicotin oder Cotinin in Geweben mit langsamen Umbau zu umgehen. Wegen der leichten Zugänglichkeit bieten sich hier Haare und Zehennägel an [46-48].

Auch das Effektmonitoring von tabakspezifischen Kanzerogenen durch Bestimmung von Hämoglobinaddukten sollte ein gangbarer Weg sein. Wegen der beim Menschen mit 210 Tagen sehr langen Lebensdauer der Erythrozyten und der im Vergleich zu DNA-Addukten fehlenden Reparatur, spiegeln die Konzentrationen der Hämoglobinaddukte eine Durchschnittsbelastung während der letzten drei bis vier Monate wider [49]. Während Addukte der tabakspezifischen Nitrosamine überraschenderweise nicht die notwendige Spezifität für die Belastung mit Tabakrauch ergeben [50-53], sind Addukte von 3- und 4-ABP zumindest für die Unterscheidung von Rauchern und Nichtrauchern gut geeignet [54]. Hinsichtlich der ETS-Belastung ist auch dieser Parameter wegen stark schwankender Hintergrundbelastungen äußerst unsicher. Diese Hintergrundbelastung ist bei *o*-Toluidin um ein Vielfaches höher, so dass die Konzentrationen der Hämoglobinaddukte nicht einmal eine sichere Unterscheidung von Rauchern und Nichtrauchern erlauben [36,54].

1.6.2 DNA-Addukte

Die meisten Kanzerogene binden nach metabolischer Aktivierung kovalent an verschiedenen Stellen der DNA. Die Bestimmung der DNA-Addukte zählt zu dem Effektmonitoring. Am häufigsten binden die Kanzerogene am Guanin, wobei der Angriffspunkt von der Struktur des Kanzerogens abhängt (Abb. 1-16). So binden beispielsweise Alkylanzien und Nitrosamine hauptsächlich an der N7- und O6-Position, aromatische Amine an der C8-Position und polycyclische Kohlenwasserstoffe bevorzugt an der exocyclischen Aminogruppe von Guanin.

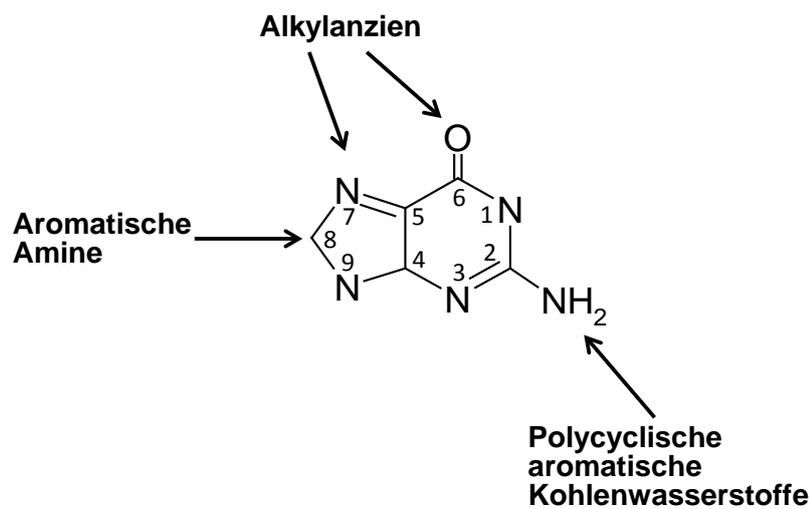


Abb. 1-16: Angriffspunkte von Kanzerogenen am Guanin (nach Beach und Gupta [55]).

In der chemischen Kanzerogenese gilt die Bildung von DNA-Addukten als ein erster, wichtiger Schritt [56]. Man geht davon aus, dass eine Vielzahl von krebserregenden Substanzen ihre biologische Wirkung durch kovalente Bindung an zelluläre DNA entfaltet. 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. Werden die Veränderungen durch die Addukte nicht durch die vielfältigen Reparaturmechanismen rechtzeitig vor der Zellteilung korrigiert, können sie aufgrund einer fehlerhaften DNA-Replikation zu Mutationen führen.

Das Ausmaß der DNA-Adduktbildung muss aber nicht immer mit der Exposition gegenüber Kanzerogenen und dem daraus resultierenden Tumorrisiko korrelieren. Dies trifft vor allem für Stoffe zu, die direkt, ohne vorherige Metabolisierung, mit der DNA interagieren. So wurden beispielsweise DNA-Addukte von Ethylen- und Propylenoxid auch in Geweben gefunden, die nicht Zielorgane für durch diese Stoffe ausgelöste Tumoren sind [57]. Auch bei

der Bestimmung von 4-ABP-Addukten am Hämoglobin und in der DNA der Harnblase wurde keine Korrelation zwischen dem Zielorgan und dem Surrogatmarker gefunden [58].

Die Interpretation der Untersuchungsergebnisse wird so formuliert, dass mögliche gesundheitsschädliche Folgen der DNA-Addukte Mutationen in Soma- oder Keimzellen, Zellalterung und Krebs z.B. infolge von Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen sind. Als niedrige Belastung gilt in der Zwischenzeit 1 Addukt pro 10^9 bis 10^{10} Nukleotide. In allen Zellen treten üblicherweise Addukte auch ohne besondere Belastung auf (Hintergrundbelastung). Ein Addukt in 10^8 Nukleotiden scheint die Reparatursysteme für Addukte zu induzieren. Der Schaden wird repariert und es entsteht keine Mutation. Folglich gilt zwar der Nachweis von Addukten alleine nicht als Beweis, aber niedrige Addukt mengen bedeuten ein niedrigeres Risiko im Vergleich zu hohen Addukt mengen. Bis heute sind keine Addukt-Schwellenwerte genau definiert, womit sich ein Risiko für die Adduktbeanspruchung quantifizieren lässt [59].

1.6.2.1 Nachweismethoden von DNA-Addukten

Für die Analyse von DNA-Addukten sind zahlreiche verschiedene Nachweismethoden entwickelt worden, die nachfolgend kurz besprochen werden.

Die **Fluoreszenzspektroskopie** ermöglicht einen hoch empfindlichen spezifischen Nachweis von DNA-Addukten, benötigt nur kleine Mengen des zu untersuchenden Gewebes und keine intensive Aufreinigung. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei etwa einem Addukt in 10^8 Nukleotiden. Die Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist allerdings die Fluoreszenz der nachzuweisenden Substanzen, wodurch ihre Einsatzmöglichkeit sehr begrenzt ist. Anwendung findet die Methode hauptsächlich bei Addukten von polycyclischen Kohlenwasserstoffen [60,61]. Durch spezifische Derivatisierung der Nukleotide mit fluoreszierenden Gruppen nach dem enzymatischem Verdau der DNA, gefolgt von chromatographischer Trennung, z.B. durch Kapillarelektrophorese, und Nachweis mit Laser-induzierter Fluoreszenz, können auch andere Addukte mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden [62,63].

Die Entwicklung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gegen DNA-Addukte ermöglicht den Nachweis mit Hilfe von **Immunoassays**, die bereits seit langer Zeit zur Analyse verwendet werden, beispielsweise auch zum Nachweis von 4-ABP-Addukten. Mit Methoden wie dem Radioimmunoassay (RIA) und dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) werden sowohl die Strukturanalyse als auch die quantitative Analyse mit einer Empfindlichkeit von etwa einem Addukt in 10^7 Nukleotiden bei Einsatz von 25 μ g DNA

ermöglicht [64,65]. Immunoassays werden auch für den semiquantitativen histochemischen Nachweis nach Anfärben von Gewebeschnitten verwendet.

Das **³²P-Postlabeling** wurde Anfang der 1980er Jahre von Reddy, Gupta und Randerath entwickelt [66]. Die DNA wird dabei zu 3'-Mononukleotiden enzymatisch verdaut, die anschließend enzymatisch mit [γ -³²P]-ATP phosphoryliert und damit radioaktiv markiert werden. Der Nachteil der Methode ist, dass die in hohem Überschuss vorliegenden normalen, d.h. adduktfreien, Nukleotide genauso phosphoryliert werden wie die DNA-Addukte. Deshalb erfolgt meist eine Anreicherung der modifizierten Nukleotide vor dem Labeling, beispielsweise durch Butanolextraktion oder weitere Verdauung mit Nuclease P1, die vor allem größere Addukte (bulky adducts) verschont. Nach dem Labeling folgt die Abtrennung der nicht umgesetzten Radioaktivität und der normalen Nukleotide durch verschiedene chromatographische Methoden. Am häufigsten findet die mehrdimensionale Dünnschichtchromatographie Verwendung [67], seltener auch die Trennung der Addukte durch HPLC [68] und Kapillarelektrophorese [69]. Das ³²P-Postlabeling ist eine äußerst empfindliche Methode zur Messung von Fremdstoffen, die kovalent an der DNA binden, mit einer Nachweisempfindlichkeit, die bei 1-10 Addukten in 10¹⁰ Nukleotiden bei Verwendung von 10 µg DNA liegt [55]. Es ist mit dieser Methode allerdings bislang noch nicht möglich in Umweltproben die chemische Struktur von DNA-Addukten aufzuklären [68,70].

Bei der Bestimmung der DNA-Addukte durch Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektroskopie, der **GC/MS-Analyse**, werden die adduzierten Kanzerogene hydrolytisch von der DNA abgespalten und nach Aufreinigung und gegebenenfalls Derivatisierung analysiert. Das abgespaltene Kanzerogen wird mit GC/MS anhand der Retentionszeit und seinem Spektrums charakterisiert. Die Methode besitzt deshalb eine hohe Spezifität für eine Vielzahl Addukt-auslösender Kanzerogene wie Nitrosamine, aromatische Amine und polycyclische Kohlenwasserstoffe und wird für eine große Anzahl verschiedener Krebsgifte eingesetzt. Ein Nachteil der Methode ist, dass keine Aussagen über die Struktur des Addukts gemacht werden können. Dafür besitzt sie eine vergleichbar hohe Nachweisempfindlichkeit wie das ³²P-Postlabeling, insbesondere bei Einsatz von hochauflösenden Massenspektrometern [71,72].

Die **HPLC/MS** ist die Kopplung von analytischer HPLC mit einem Massenspektrometer. Mit dieser Methode können Addukte direkt quantifiziert und einer Strukturaufklärung unterzogen werden. Obgleich diese Methode zur Charakterisierung unbekannter DNA-Addukte bereits erfolgreich herangezogen wird, ist sie für das Biomonitoring von Umweltbelastungen meist noch nicht empfindlich genug [73,74].

1.6.2.2 DNA-Addukte von 4-ABP und *o*-Toluidin

Für den Menschen liegen fast nur Ergebnisse zu DNA-Addukten von 4-ABP vor [58,73,75-98]. Dabei kamen hauptsächlich drei Nachweismethoden in absteigender Ordnung ihrer Spezifität zum Einsatz: Die Massenspektrometrie [58,73,75-80], Immunoassays und Immunhistochemie [77,81-88], sowie das ^{32}P -Postlabeling [75,77,89-98]. Mit GC/MS wurden bei Blasenkrebspatienten mit zunehmender Malignität höhere Konzentrationen an DNA-Addukten von 4-ABP gefunden [78]. Es gelang jedoch nicht, eine Korrelation zwischen Hb-Addukten als Surrogatmarker und DNA-Addukten von 4-ABP herzustellen [58].

Einen ersten Hinweis auf DNA-Addukte von *o*-Toluidin ergaben die Messungen von Gaber bei Probanden, die mit Prilocain behandelt worden waren [79,99]. Die DNA wurde vor und einen Tag nach der subkutanen Injektion von 100 mg Prilocain/kg Körpergewicht aus dem Sediment des 24 Stunden-Urins isoliert. Im Gegensatz zu den Hb-Addukten, die im Mittel um das Vierzigfache anstiegen, waren die DNA-Addukte von *o*-Toluidin nur um knapp das Zweifache erhöht (Abb. 1-17). Gleichzeitig gemessene Addukte von 4-ABP zeigten weder an der DNA, noch am Hb Veränderungen nach der Prilocainbehandlung.

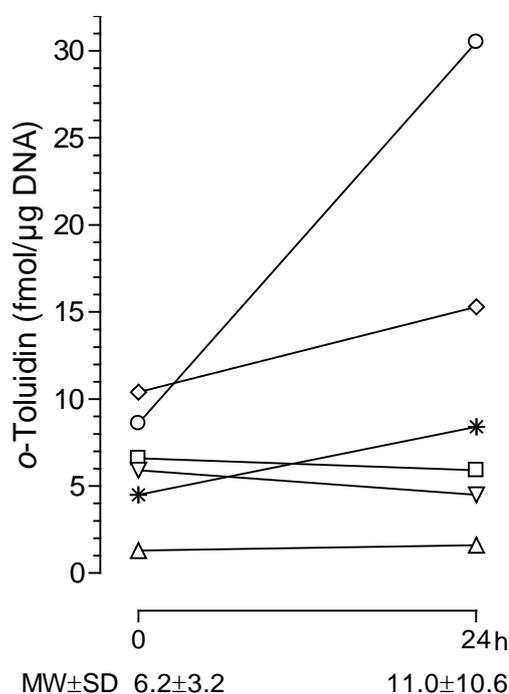


Abb. 1-17: *o*-Toluidin-abspaltende DNA-Addukte im Sediment von 24 Stunden-Urin vor und ein Tag nach Behandlung mit Prilocain [99].

1.7 Ziel der Arbeit

Die kanzerogene Wirkung aromatischer Amine für die Harnblase des Menschen ist bereits lange bekannt, wurde jedoch bisher hauptsächlich mit bicyclischen Aminen wie 4-Aminobiphenyl (4-ABP), Benzidin und Naphthylamin in Verbindung gebracht. Neuerdings häufen sich die Hinweise, dass das monocyclische *o*-Toluidin ebenfalls für eine erhöhte Inzidenz von Harnblasenkrebs am Arbeitsplatz verantwortlich sein kann. Neben spezifischen Quellen am Arbeitsplatz stellt der Tabakrauch eine signifikante Quelle für die Belastung mit aromatischen Aminen dar. Obwohl der Mensch, gemessen an den Hämoglobinaddukten, eine mindestens zehnfach höhere Belastung mit *o*-Toluidin hat als mit 4-ABP, trägt das Rauchen im Gegensatz zu 4-ABP nur sehr wenig zur Umweltbelastung mit *o*-Toluidin bei. DNA-Addukte von 4-ABP im Zielorgan, dem Harnblasenepithel, konnten bereits seit langem mit dem Krebsrisiko in Zusammenhang gebracht werden. Vergleichbare Ergebnisse lagen für DNA-Addukte von *o*-Toluidin bisher nicht vor. Deshalb konnte bisher für die krebserzeugende Wirkung von *o*-Toluidin ein genotoxischer Wirkungsmechanismus nicht zwingend angenommen werden.

Erste Hinweise auf DNA-Addukte von *o*-Toluidin im Harnblasenepithel des Menschen ergaben sich in einer Dissertation im eigenen Arbeitskreis, bei der die Addukte im Sediment von 24 Stunden-Urin bestimmt wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorhandensein von DNA-Addukten von *o*-Toluidin im menschlichen Harnblasengewebe zweifelsfrei durch Gaschromatographie mit Massenspektrometrie nachzuweisen und damit einen genotoxischen Mechanismus auch für das monocyclische Amin wahrscheinlich zu machen. Zu diesem Zweck wurden Proben von menschlichem Harnblasengewebe im Rahmen der Sektion von frisch Verstorbenen im Institut für Rechtsmedizin in München und Tumorgewebe von Harnblasenkrebspatienten aus der Universität Regensburg untersucht. Die Validität der Methode wurde durch gleichzeitige Bestimmung der Addukte von 4-ABP überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte/Zubehör und Parameter

GC/MS:

| | |
|----------------|---|
| GC: | Fisons Serie 8000 (Fisons Instruments, Mainz-Kastel) |
| Injektor: | Split/Splitless-Injektor (splitless) |
| GC-Trennsäule: | factor four 5 ms; 5% Phenyl-95% Dimethylsiloxanphase; L 30 m; ID 0,25 mm; df 0,25 µm, (Varian [®] , Frankfurt) |
| Trägergas: | Helium 5.0 (Linde Gas Deutschland, Pullach) |
| MS: | QMD 1000 Quadrupol (Carlo Erba Instruments) |
| Quelle: | CF ⁻ ; Rhenium 5 Windelfilament; Temperatur 250 °C |
| CI-Gas: | Methan 4.0 (Linde Gas Deutschland, Pullach) |
| Software: | Mass Lab Version 1.3 (Fisons Instruments) |

GC/MS Peripherie:

| | |
|-----------------|---|
| Autosampler: | AS 200S (Carlo Erba Instruments) |
| GC-Spritze: | Microliter Syringes 701 N, 10 µl (Hamilton, Frankfurt) |
| Kühlwasserbad: | Kühlmobil (Van der Heijden, Dörentrap) |
| Vorvakuumpumpe: | Edwards High Vacuum Pump E2M8 Two Stage, Edwards High Vacuum Int., Part of BOC Ltd., (Crawley, Sussex, England) |

Sonstige Geräte:

| | |
|-----------------------|---|
| Zentrifugen: | Vakuumkonzentrator BA-VC 300H (Bachofer, Reutlingen) Hettich Zentrifugen Universal 16 R & Mikro 20 R (Hettich, Tuttlingen) |
| Trockenschrank: | Heraeus (Thermo Scientific, Waltham, USA) |
| Sterilbank: | Hera safe (Heraeus-Kendro, Langensebold) |
| Vortex Rüttler: | Vortex-T Genie 2 (Scientific Industries, USA) |
| Analysenwaage: | Mettler Toledo Excellence (Mettler Toledo AG, Greifensee, Schweiz) |
| Digital pH-Meter: | Ino Lab (WTW, Weilheim) |
| Magnetrührer: | VMS-C7 (VWR International GmbH, Darmstadt) |
| Ultraschallbad: | Sonorex Bandelin Super Rk 106 (Bachofer, Reutlingen) |
| Thermorüttler: | Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg) |
| UV-Spectrophotometer: | Implen Nano Photometer Label Guard (Implen, München) |

2.1.2 Materialien

Glasgeräte:

| | |
|-------------------|--|
| Bechergläser: | 25, 50, 100, 250 und 1000 ml |
| Erlenmeyerkolben: | 100, 250, 500 ml |
| Messkolben: | 10, 50, 100 ml |
| Messzylinder: | 10, 50, 100 ml |
| Wheatongläschen: | 1,5 ml 32×11,5 (Chromatographie Handel Müller, Fridolfing) |
| Mikroeinsatz: | 0,5 ml 5 mm, 27,5×4 mm (Chromatographie Handel Müller) |

Pipetten:

| | |
|-------------------|--|
| Direktverdränger: | microman 10 µl, 25 µl, 100 µl, 250 µl, 1000 µl (Gilson, Bad Camberg) |
| Laborpipetten: | pipetman 200 µl, 2000 µl, 5000 µl |
| Pasteurpipetten: | Glas, 150 mm (VWR International) |

Sonstiges:

| | |
|---------------------|--|
| Spiralfedern: | 5×36 mm (Chromatographie Handel Müller) |
| Septen: | Silikon-PTFE 8 mm (Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt a. Main) |
| Schraubkappen: | 5,5 mm ohne Septum, (Chromatographie Handel Müller) |
| PP-Röhrchen: | 15 ml mit Schraubdeckel (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Eppendorfcups: | 1,5 ml und 2 ml |
| pH-Indikatorpapier: | pH 5,5-9,0 (Merck, Darmstadt) |
| DNA-Kit: | Invisorb [®] Spin Tissue Midi Kit (Invitex, Berlin) |

2.1.3 Chemikalien

Interne Standards:

| | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| d ₉ - <i>o</i> -Toluidin: | (CDN Isotopes, Canada) |
| d ₅ -4-ABP: | (TRC North York, Canada) |

Standards:

| | |
|---------------------|----------------------------|
| 4-ABP: | (Sigma Aldrich, Steinheim) |
| <i>o</i> -Toluidin: | (Sigma Aldrich) |

Sonstige:

| | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| Na ₂ HPO ₄ : | 99% ig (Sigma Aldrich) |
| HFBA: | 1 ml (Sigma Aldrich) |
| Kalbsthymus-DNA: | (Sigma Aldrich, Steinheim) |
| Ribonuclease A: | SIGMA (Saint Louis, Missouri) |
| HCl p.a.: | 37% ig (Merck, Darmstadt) |

| | |
|----------------------|---|
| NaOH rotuli: | (Baker BV, Holland) |
| Chloroform, s.s.: | Merck (Darmstadt) |
| n-Hexan, s.s. : | Merck (Darmstadt) |
| Dichlormethan, s.s.: | Merck (Darmstadt) |
| Methanol, s.s.: | Merck (Darmstadt) |
| Toluol, s.s.: | Merck (Darmstadt) |
| dd H ₂ O: | hergestellt mit Heraeus-Destamat (Kleinostheim) |

2.1.4 Lösungen und Reagenzien

2.1.4.1 Stammlösungen der internen Standards

| | |
|----------------------------------|--|
| d₅-4-ABP: | Stammlösung A: (0,2 µg/µl) 2 mg d ₅ -4-ABP werden auf der Analysenwaage abgewogen, in 10,0 ml Hexan gelöst. Stammlösung B: (200 pg/µl) 10 µl der Stammlösung A werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. Stammlösung C: (2 pg/µl) 100 µl der Stammlösung B werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. Stammlösung D: (200 fg/µl) 10 µl der Stammlösung B werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. |
| d₉-o-Toluidin: | Stammlösung A: (5 µg/µl) 50 µl d ₉ -o-Toluidin werden in etwas Hexan gelöst und ad 10 ml Hexan. Stammlösung B: (50 ng/µl) 100 µl der Stammlösung A werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. Stammlösung C: (50 pg/µl) 10 µl der Stammlösung B werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. Stammlösung D: (200 fg/µl) 40 µl der Stammlösung B werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. |

2.1.4.2 Stammlösungen der Standards

| | |
|---------------|---|
| 4-ABP: | Stammlösung A: (50 ng/µl) 5,0 mg 4-ABP werden auf der Analysenwaage abgewogen, in 100 ml Hexan gelöst. Stammlösung B: (50 pg/µl) 10 µl der Stammlösung B werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. Stammlösung C: (500 fg/µl) 100 µl der Stammlösung B werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. Stammlösung D: (50 fg/µl) 10 µl der Stammlösung B werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. |
|---------------|---|

| | |
|---------------------------|---|
| <i>o</i>-Toluidin: | Stammlösung A: (100 ng/μl) 10 μl <i>d</i> ₀ - <i>o</i> -Toluidin werden in etwas Hexan gelöst und ad 100,0 ml Hexan aufgefüllt. Stammlösung B: (100 pg/μl) 10 μl der Stammlösung A werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. Stammlösung C: (0,1 pg/μl) 10 μl der Stammlösung B werden in 10,0 ml Hexan (s.s.) gelöst. |
|---------------------------|---|

Da *o*-Toluidin eine Flüssigkeit ist, wurden für die ersten Stammlösungen keine Einwaagen gemacht, sondern ein definiertes Volumen entnommen. Dabei müsste man eigentlich die relative Dichte in die Berechnungen der einzelnen Konzentrationen mit einbeziehen. Die Dichte für *o*-Toluidin ist aber mit 0,99 g/cm³ nur 1% von der des Wassers entfernt (1 g/cm³) und ist somit vernachlässigbar.

Sowohl die Internen Standardlösungen als auch die Standardlösungen sind bei -20 °C mindestens 3 Monate stabil.

2.1.4.3 Sonstige Lösungen

| | |
|--|--|
| 1 N NaOH: | 0,4 g NaOH werden in etwas dd H ₂ O gelöst und anschließend ad 10,0 ml dd H ₂ O aufgefüllt. |
| 0,5 M Na ₂ HPO ₄ : | 0,89 g Na ₂ HPO ₄ werden in etwas dd H ₂ O gelöst und anschließend ad 10,0 ml dd H ₂ O aufgefüllt. |
| 4 N HCl: | 3,33 ml HCl (konz.) werden in etwas dd H ₂ O gelöst und anschließend ad 10,0 ml dd H ₂ O aufgefüllt. |
| Ribonuclease A (10 mg/ml): | 100 mg RNase werden in etwas H ₂ O dd H ₂ O gelöst und anschließend ad 10,0 ml dd H ₂ O aufgefüllt. |

2.1.5 Proben

2.1.5.1 Proben der Rechtsmedizin

Von 46 akut Verstorbenen ohne sichtbare Zeichen einer Autolyse wurde Harnblasengewebe im Rahmen der Rechtsmedizinischen Untersuchung in München entnommen, kodiert und bei -18 °C gelagert. Nach Freigabe durch die Staatsanwaltschaft konnten die anonymisierten Proben für die Untersuchung verwendet werden. Dieses Vorgehen wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät genehmigt. Die weitere Aufarbeitung der Proben konnte innerhalb von 4 Wochen nach Einlagerung erfolgen.

Zeitgleich wurde neben dem Blasengewebe von 35 Verstorbenen Resturin aus der Harnblase und von 33 Verstorbenen Abschnitte von Zehennägeln gesammelt und bei -18 °C eingefroren.

Anonymisierte Daten liegen zu Alter, Geschlecht, Todesursache, Sterbe- und Sektionszeitpunkt von allen Verstorbenen vor. Angaben zum Raucherstatus wurden von 14 Verstorbenen durch die Polizei zur Verfügung gestellt (Tab. 3-4).

2.1.5.2 Proben der Universitätsklinik Regensburg

Im Rahmen von Operationen im Caritas-Krankenhaus St. Josef, Landshuter Str. 65, 93059 Regensburg, wurden von zwölf Patienten mit Harnblasenkrebs Proben von Tumorgewebe nach Entnahme von zentralem Gewebe für die Histologie auf Objektträger montiert und bei -18 °C gelagert. Zusätzlich wurde von elf Patienten ein Aliquot von Spontanurin (ca. 1,5 ml in Eppendorfcups) erhalten und eingefroren. Die Proben wurden in einer Styroporbox mit Trockeneis nach München transportiert.

Anonymisierte Daten liegen zur histologischen Diagnose, zu Alter, Geschlecht, Beruf und dem Rauchstatus vor (Tab. 3-6).

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von DNA-Addukten aus humanem Blasengewebe

2.2.1.1 Vorbereiten der Gewebe

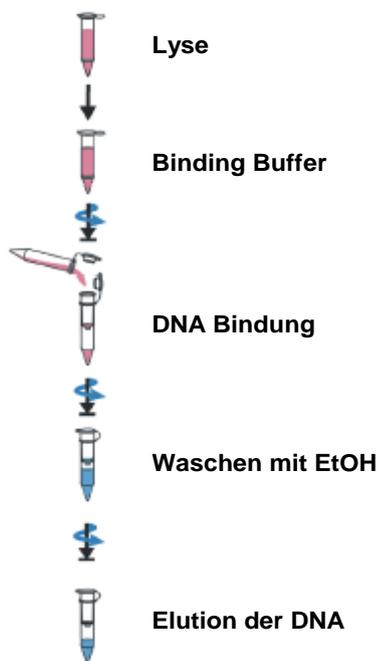
Die Gewebeproben der Rechtsmedizin wurden nach dem Auftauen in einer Petrischale ausgebreitet. Dann wurde das oberflächliche Epithel mit OP-Besteck soweit möglich vom restlichen Gewebe separiert und zweimal ca. 100-150 mg in 15 ml PP Röhrchen überführt. Zudem wurde tiefer gelegenes subepitheliales Bindegewebe in gleicher Menge für zusätzliche Doppelbestimmungen gesammelt.

Bei den Proben der Patienten aus Regensburg handelte es sich aufgrund der histologischen Kontrolle ausschließlich um Tumorgewebe. Es wurden je zwei Proben von ca. 100-150 mg Feuchtgewicht für die DNA-Isolierung herangezogen.

2.2.1.2 Isolierung der DNA

Die DNA wurde mit dem Invisorb[®] Spin Tissue Midi Kit isoliert (Abb. 2-1). Die Gewebeproben wurden mit einer spitzen Schere zerkleinert und mit 2 ml „Lysis Buffer G“ und 80 µl „Proteinase K Solution“ bei 52 °C über Nacht im Thermomixer inkubiert, um das Gewebe zu lysieren und die Proteine zu zerstören. Anschließend wurde die Lösung mit 50 µl RNase versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 ml „Binding Buffer T“ zugesetzt, 10 sec am Vortex gemischt und die entstandene Suspension in einen „Spin Filter“ überführt, der vorher auf ein neues Tubenröhrchen aufgesetzt wurde. Durch 1 min Inkubation bei 52 °C

im Thermomixer wurde die DNA an den Filter gebunden. Nach 10 min Abzentrifugieren bei



4000 rpm wird dreimal mit 3 ml ethanolischem „Wash Buffer“ nachgewaschen und jeweils 5 min trocken zentrifugiert. Der Filter wurde zusätzlich bei 52 °C im Trockenschrank 15 min getrocknet. Bei zu kurzer Trockenzeit hätte verbliebenes restliches Ethanol die nachfolgende Elution der DNA vom Filter verhindern können. Der getrocknete Filter wurde auf ein neues Probenröhrchen aufgesetzt und nach Zugabe von 500 µl des 52 °C warmen „Elution Buffer D“ 6 min bei 52 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA bei 4000 rpm über 5 min aus dem Filter abzentrifugiert und die Lösung in ein 2 ml Eppendorfcup überführt.

Abb. 2-1: Gewinnung der DNA mit dem Invisorb® Spin Tissue Midi Kit

2.2.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mittels UV-spektroskopischer Analytik bestimmt. Es wurden jeweils 4 µl des DNA-Extrakts in die Messzelle der LabelGuard®-Küvette gegeben und dann die Absorption bei 230, 260 und 280 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum bei 260 nm lieferte den DNA-Gehalt. Die anderen Wellenlängen wurden mit vermessen, um mögliche Verunreinigungen durch Proteine oder Kohlenhydrate zu kontrollieren. Die Berechnung erfolgte nach Formel 1:

$$C_{DNA} [\mu g / \mu l] = \frac{A_{260} \cdot F \cdot 1000}{20} \quad (\text{Formel 1})$$

A_{260} : Absorption bei 260 nm

F: Verdünnungsfaktor

Dabei geht man davon aus, dass eine Lösung mit 1 mg/ml eine Absorption von 20 aufweist. Das Verhältnis A_{260}/A_{230} und A_{260}/A_{280} sollte ≥ 2 sein, damit die Verunreinigungen die weitere Analyse nicht stören.

2.2.1.4 Saure Hydrolyse und Isolierung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Freisetzung der Addukte der aromatischen Amine aus der DNA erfolgte, in Anlehnung an die im Arbeitskreis etablierte Methodik für DNA-Addukte von tabakspezifischen Nitrosaminen [100], durch saure Hydrolyse. Die Hydrolyse, Extraktion und die nachfolgende Derivatisierung erfolgten in der Sterilbank, um Kontaminationen mit den aromatischen Aminen zu minimieren. Die Erfahrung von früheren Untersuchungen im eigenen und anderen Laborato-

rien [99,101] hat gezeigt, dass bei der Bestimmung der aromatischen Amine im Spurenbereich mit Blindwerten zu rechnen ist. Deshalb wurde mit jeder arbeitstäglich untersuchten Serie von 4-6 Gewebeproben zusätzlich jeweils eine Probe von 0,5 ml Lysispuffer analysiert.

Die DNA-Lösungen der Gewebeproben und der Lysispuffer für die Blindwertbestimmungen wurden in den 2 ml Eppendorfcups mit 100 μ l 4 N HCl und je 5 μ l der ISTD-Standardlösungen D von d_5 -4-ABP und d_9 -*o*-Toluidin (je 1 pg) versetzt und 3 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden die Verunreinigungen durch zweimaliges Extrahieren mit jeweils 500 μ l Dichlormethan entfernt. Nach Zugabe von Dichlormethan wurde dabei 1 min gevortext und zur besseren Phasentrennung 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und verworfen. Um die Addukte zur weiteren Aufarbeitung in die organische Phase zu überführen, wurden 400 μ l 1 N NaOH zugesetzt. Eine Einstellung des pH auf 7,5 war für die quantitative Gewinnung der Addukte notwendig. Die Stabilisierung des pH-Werts wurde durch Zugabe von 100 μ l 0,5 M Na_2HPO_4 -Puffer erreicht. Die DNA-Addukte wurden schließlich durch dreimaliges Ausschütteln mit jeweils 0,3 ml Chloroform isoliert. Nach kräftigem Schütteln wurde 1 min auf dem Vortex gemischt und die Phasen dann bei 5000 rpm für 3 min getrennt. Die Chloroformphase wurde jeweils abgenommen, in 1,5 ml Wheatongläschen gesammelt und direkt im Anschluss derivatisiert.

2.2.1.5 Derivatisierung der aromatischen Amine

Um die aromatischen Amine mit hoher Nachweisempfindlichkeit mit GC/MS analysieren zu können, müssen diese durch Derivatisierung zunächst in eine leicht flüchtige und gut ionisierbare Form überführt werden (Abb. 2-2) [101]. Zur Probenlösung wurden 10 μ l HFBA gegeben, gründlich gevortext und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l Methanol gestoppt. Danach wurden 250 μ l Toluol als Keeper zugesetzt und danach die organische Phase im Vakuumkonzentrator auf ca. 100 μ l eingengt. Anschließend wurde die übergebliebene Toluolmenge in Microvials überführt und im Vakuumkonzentrator bis zur Trocknung eingedampft. Zum Vermessen wurden die Proben unmittelbar vor der Injektion in die GC/MS in 10 μ l Toluol resuspendiert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die beiden Deuteriumatome vom Stickstoff des d_9 -*o*-Toluidin bei der Derivatisierung abgespalten werden.

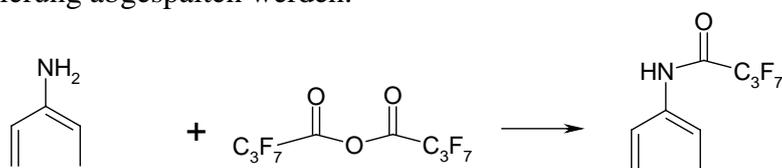


Abb. 2-2: Derivatisierung der aromatischen Amine mit HFBA

2.2.1.6 Chromatographische Bedingungen

Zur Bestimmung von *o*-Toluidin- und 4-ABP wurde 1 µl der in 10 µl resuspendierten Lösung der derivatisierten aromatischen Amine in den Gaschromatographen eingespritzt.

Das hier verwendete System bestand aus einem Gaschromatograph der Fisons Serie 8060 gekoppelt mit einem Quadrupolmassenspektrometer QMD 1000.

Die Trennung erfolgte auf einer factor four 5 Kapillare mit Helium als Trägergas mit einem Säulenkopfdruck von 80 kPa. Das ergibt bei 50 °C einen Gasfluss von ca. 1,3 ml/min. Die Injektortemperatur betrug 250 °C. Der Säulenofen wurde mit dem folgenden Programm aufgeheizt:

80 °C 1 min isotherm,
12 °C/min Heizrate bis 210 °C
15 °C/min Heizrate bis 300 °C
300 °C 10 min isotherm

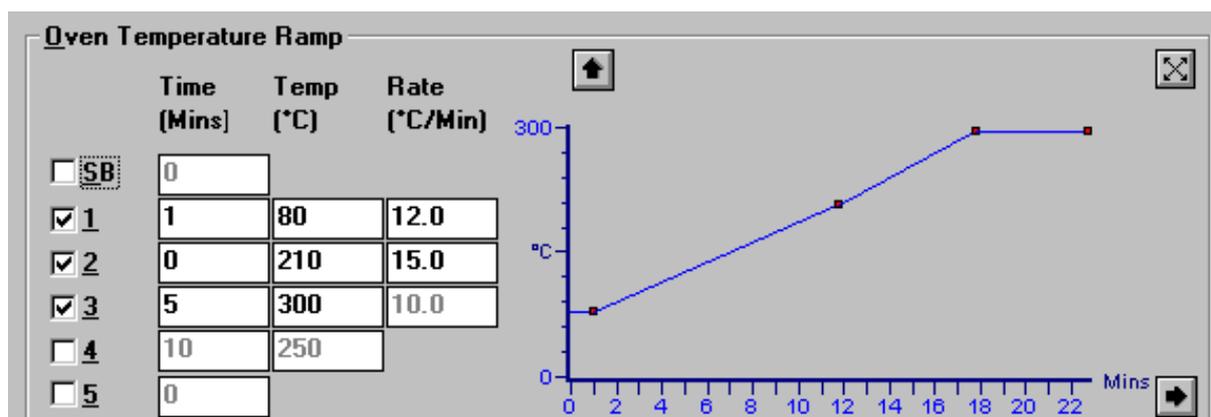


Abb. 2-3: Verlauf des GC Temperaturprogramms

Die Temperatur der Kopplung von Gaschromatograph und Massenspektrometer (Transferline) wurde auf 270 °C gestellt.

Aufgrund der geringen Substanzmengen wurden die Analysen im splittless Verfahren durchgeführt, dabei blieben nach dem Starten die Injektorventile für eine Minute geschlossen.

Zur Quantifizierung dienten die vier Hauptfragmente der Analyten und ihrer deuterierten internen Standards. Für das Messprogramm des Massenspektrometers wurden zwei zeitlich getrennte Bereiche mit unterschiedlichen Massen definiert. Zwischen 6 und 7,5 min wurden die Fragmente *m/z* 283 bzw. *m/z* 290 für *o*-Toluidin und *d*₉-*o*-Toluidin aufgenommen, anschließend zwischen 12,5 und 13,5 min die Fragmente *m/z* 345 bzw. *m/z* 350 für 4-ABP und *d*₅-4-ABP. Dabei diente ein Rhenium 5 Windelfilament mit 70 eV zur Ionisation. Die Quel-

lentemperatur betrug 250 °C. Gemessen wurde mit negativ chemischer Ionisierung (NCI). Als Reaktandgas diente Methan mit 2 bar Vordruck.

Durch die Elektronenstoß-Ionisation von Methan, das als Reaktandgas dient, entstehen protonierte Methankationen, welche die aromatischen Amine anschließend durch Abgabe von Protonen schonend in Ionen überführen und beschleunigen. Danach fragmentieren die Quasimolekülonen. Die Teilchen werden mit elektromagnetischen Linsen fokussiert und im Quadrupol nach ihrem entsprechenden Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt.

Am Detektor treffen die Teilchen auf eine Phosphorplatte, die verbunden mit einem Photomultiplier mit 450 V zu einem elektrischen Signal führt, das mit Hilfe entsprechender Software aufgenommen wurde. Die Dwell-Time für alle Ionen betrug 0,08 sec, der inter channel delay 0,05 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 dienten die $[M-HF]^-$ Ionen von *o*-Toluidin, 4-ABP und d_5 -4-ABP und für d_9 -*o*-Toluidin das $[M-dF]^-$ Ion.

2.2.1.7 Berechnung des Gehaltes an aromatischen Aminen

Um die Konzentration von *o*-Toluidin und 4-ABP zu bestimmen, wurden die Flächen der entsprechenden Ionen nach Abzug der Flächen der Tagesblindwerte, wie in Formel 1 beschrieben, durch die Fläche der internen Standards (ISTD), ebenfalls korrigiert um die Tagesblindwerte, geteilt und mit den Verhältnissen der Molekulargewichte ($M_{\text{Substanz}}/M_{\text{ISTD}}$) und der absoluten Menge des zugesetzten internen Standards multipliziert. Dadurch erhielt man den Wert für die Menge an *o*-Toluidin und 4-ABP in pg. Setzte man nun diesen Wert ins Verhältnis zum Gehalt der DNA unter Einrechnung der molekularen Masse von *o*-Toluidin bzw. 4-ABP, konnte das Ergebnis in fmol/ μ g DNA angegeben werden. Formel 2 zeigt den Rechenweg am Beispiel von *o*-Toluidin.

$$o-Tol [pg] = \frac{(A_{o-Tol} - BW_{o-Tol}) \cdot M_{o-Tol} \cdot m_{d_9-o-Tol}}{(A_{d_9-o-Tol} - BW_{d_9-o-Tol}) \cdot M_{d_9-o-Tol}} \quad (\text{Formel 2})$$

| | |
|------------------|--|
| A_{o-Tol} | Peakfläche des Analyten im Chromatogramm |
| BW_{o-Tol} | Peakfläche auf der Analytenspur in einem Leerlauf |
| M_{o-Tol} | molekulare Masse des Analyten (107,15 g/mol) |
| $m_{d_9-o-Tol}$ | absolute zugesetzte Menge an internem Standard in Picogramm |
| $A_{d_9-o-Tol}$ | Peakfläche des internen Standards im Chromatogramm |
| $BW_{d_9-o-Tol}$ | Peakfläche auf der Spur des internen Standards in einem Leerlauf |
| $M_{d_9-o-Tol}$ | molekulare Masse des internen Standards (116,15 g/mol) |

2.2.2 Validierung der Methoden

Die Validierung dient der Überprüfung und Bewertung der Analysenmethode auf Qualität bzw. der Ermittlung von Fehlern. Damit soll nachgewiesen werden, dass die Methode richtige und präzise Informationen liefert. Hierfür stehen verschiedene Leistungsmerkmale wie Richtigkeit, Präzision, Linearität, Nachweis-, Bestimmungsgrenze und Wiederfindungsrate.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen können für die hier untersuchten aromatischen Amine aus zwei Gründen nicht nach den in der Analytik gängigen Methoden ermittelt werden. Wegen ihres ubiquitären Vorkommens liegen die Hintergrundbelastungen deutlich über den Nachweisgrenzen des Massenspektrometers [101]. Die Empfindlichkeit des Massenspektrometers selbst unterliegt aber auch Schwankungen, die von der Sauberkeit der Quelle, dem Alter des Filaments und den Einstellungsparametern des Quadrupols abhängen. Deshalb macht es keinen Sinn, über Kalibriermethoden die Nachweisgrenzen (engl. limit of detection, LOD) und die Bestimmungsgrenze (engl. limit of quantification, LOQ) zu ermitteln [102]

2.2.2.1 Identifizierung der aromatischen Amine in der GC/MS

Zur Identifizierung der aromatischen Amine und der internen Standards wurden je 1 ng/ μ l von d_0 - und d_9 -*o*-Toluidin sowie von d_0 - d_5 -4-ABP derivatisiert, in 10 μ l Toluol resuspendiert und 1 μ l jeder Lösung im Scan-Modus vermessen.

2.2.2.2 Präzision der GC/MS-Anlage

Es wurden Lösungen von derivatisierten aromatischen Amine und deren jeweiligen internen Standards mit jeweils 1 pg/ μ l hergestellt. Von dieser Lösung wurde 6 mal 1 μ l eingespritzt und auf den entsprechenden Massenspuren der jeweiligen aromatischen Amine vermessen.

2.2.2.3 Bestimmung von Linearität in der GC/MS

Die Kalibrierung der aromatischen Amine und ihrer internen Standards erfolgte im Konzentrationsbereich von 0,02-1 pg für d_0 -*o*-Toluidin und von 0,01-1 pg für d_0 -4-ABP. Gemäß nachfolgender Aufstellung wurden d_0 -*o*-Toluidin und d_0 -4-ABP aufsteigende Mengen mit je 10 pg der internen Standards versetzt, derivatisiert (siehe Kap. 2.2.1.5) und in 10 μ l Toluol resuspendiert. Davon wurde 1 μ l mit GC/MS analysiert.

| | | | | | | | |
|--|------|------|-----|------|-----|------|---|
| d_0 - <i>o</i> -Toluidin [pg/ μ l] | 0,02 | 0,05 | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 |
| + IST d_9 - <i>o</i> -Tol. [pg/ μ l] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| d_0 -4-ABP [pg/ μ l] | 0,01 | 0,05 | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 |
| + IST d_5 -4-ABP [pg/ μ l] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

2.2.2.4 Präzision und Wiederfindung in der Bestimmung der DNA-Addukte

Die Präzision der Methode ist ein Maß für den Grad der Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse bei wiederholter Durchführung unter gleichen Bedingungen. Sie wird entweder durch Vermessen einer Reihe von gespikten Leerproben oder wie hier durch Aufarbeiten von Aliquoten einer größeren Probe bestimmt.

Für die Gewinnung einer größeren Menge an DNA wurde jeweils etwa 1,5 g schwere Gewebeproben vom Epithel und von subepithelialelem Gewebe im Rahmen zweier Sektionen von der Rechtsmedizin erhalten und an zwei verschiedenen Tagen in jeweils 6 Aliquote auf DNA-Addukte von *o*-Toluidin und 4-ABP untersucht (Serien 1 und 2). Die Proben wurden zerkleinert und in drei Teilen über Nacht mit Lysispuffer inkubiert (siehe Kap. 2.2.1.2). Aus jeweils einem Drittel dieser Lösungen wurde die DNA isoliert und der Gehalt und die Reinheit photometrisch bestimmt. Danach wurden alle 9 Proben vereinigt, mit Elutionspuffer auf 3 ml aufgefüllt und je 0,5 ml für insgesamt 6 Messungen herangezogen. Nach Zusatz von je 1 pg der internen Standards wurden die Proben an einem Tag analysiert. Zusätzlich wurde ein Blindwert gemessen. Hierfür wurden 0,5 ml Lysispuffer nach Zusatz von je 1 pg der internen Standards dem gleichen Analysengang unterworfen wie die DNA-Lösungen.

Aus den Ergebnissen für die internen Standards konnte die Wiederfindung unter Einbeziehung des Ergebnisses der zeitnah bestimmten Präzision der GC/MS-Anlage (siehe Kap. 2.2.2.2), die den 100%-Wert ergibt, berechnet werden.

2.3 Bestimmung der Tabakalkaloide in Urin und Zehennägeln

Für die Bestimmung des Rauchstatus standen Urinproben von 35 der 46 akut Verstorbenen aus der Rechtsmedizin und von elf der zwölf Tumorpatienten zur Verfügung. In den Urinproben aus der Rechtsmedizin wurde die Cotininkonzentration von einem zertifizierten Analysenlabor (Labor Becker, Olgemöller & Kollegen, München) mit einer ELISA-Methode bestimmt. Die Patientenproben aus Regensburg wurden unter Aufsicht einer Mitarbeiterin der Abteilung, Frau Katharina Schütte-Borkovec, von einer TA mittels einer etablierten GC/MS-Analyse [48,103] auf Cotinin untersucht. Eine Cotininkonzentration von 100 ng/ml Urin wurde als Grenzwert (cut-off) für die Unterscheidung von aktiven Rauchern und Nichtrauchern herangezogen [44]. Für eine zusätzliche Überprüfung des Rauchstatus wurden Zehennagelproben von 33 der 46 akut Verstorbenen aus der Rechtsmedizin auf den Gehalt an Cotinin, Nicotin und Myosmin ebenfalls durch eine TA der Abteilung mittels einer etablierten GC/MS-Analyse [48] untersucht.

2.4 *Statistische Auswertung der Daten*

Die in den Versuchen gewonnenen Ergebnisse wurden in die Datenblätter des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2003 für Windows (Microsoft, Seattle, USA) eingegeben. Anhand aller Basisdaten wurden die Absolutwerte, Mittelwerte (MW), Standardabweichungen vom Mittelwert (SD = standard deviation), der Standardfehler (SE = standard error) und die Medianwerte berechnet. Ergebnisse, die unterhalb des Zweifachen des Tagesblindwerts lagen, wurden als nicht nachgewiesen eingestuft und mit Null in die Berechnungen einbezogen.

Statistische Analysen auf signifikante Unterschiede erfolgten mit GraphPad Prism V.4.01 (GraphPad Inc., San Diego, USA). Nachdem sich in den meisten Gruppen und Untergruppen die Werte nach dem Shapiro-Wilk-Test als nicht normal verteilt erwiesen, wurden Unterschiede zwischen verschiedenen Wertegruppen entweder mit dem 2-seitigen Mann-Whitney-Test oder mit dem Kruskal-Wallis-Test und nachfolgendem Dunn's Multiple Comparison Test berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 GC/MS-Analyse und Parameter

3.1.1 Identifizierung der aromatischen Amine

Um eine hohe Elektronenaffinität zu gewährleisten, wurden die aromatischen Amine und die zugehörigen internen Standards *o*-Toluidin und d_9 -*o*-Toluidin, 4-ABP und d_5 -4-ABP mit dem hochgradig halogenierten Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) derivatisiert [99,101]. Im NICI-Modus entstehen nach Literaturangaben zwei Molekülbruchstücke, das $[M-F]^-$ Ion und das $[M-HF]^-$ Ion, wobei letzteres den Basispeak darstellt. Der Basispeak wird in großem Ausmaß gebildet, ist für das Molekül aufgrund seiner Masse spezifisch und für die Vermessung im SIM-Modus am besten geeignet (Abb. 3-1 und 3-2). Dies wurde durch Aufnahme eines Spektrums von je 1 ng der Analyten im Scan-Modus bestätigt. Tabelle 3-1 enthält die Substanzen mit den dazugehörigen Bruchstücken und Retentionszeiten.

Tab. 3-1: Fragmente und Retentionszeiten der aromatischen Amine und ihrer ISTD

| Substanz | Massenspur m/z | Retentionszeit [min] ¹ |
|----------------------------|----------------|-----------------------------------|
| <i>o</i> -Toluidin | 283,0432 | 7,176 |
| d_9 - <i>o</i> -Toluidin | 290,0864 | 7,150 |
| 4-ABP | 345,0588 | 13,546 |
| d_5 -4-ABP | 350,0897 | 13,521 |

¹ Die Retentionszeiten können je nach Alter und Länge der Säule variieren

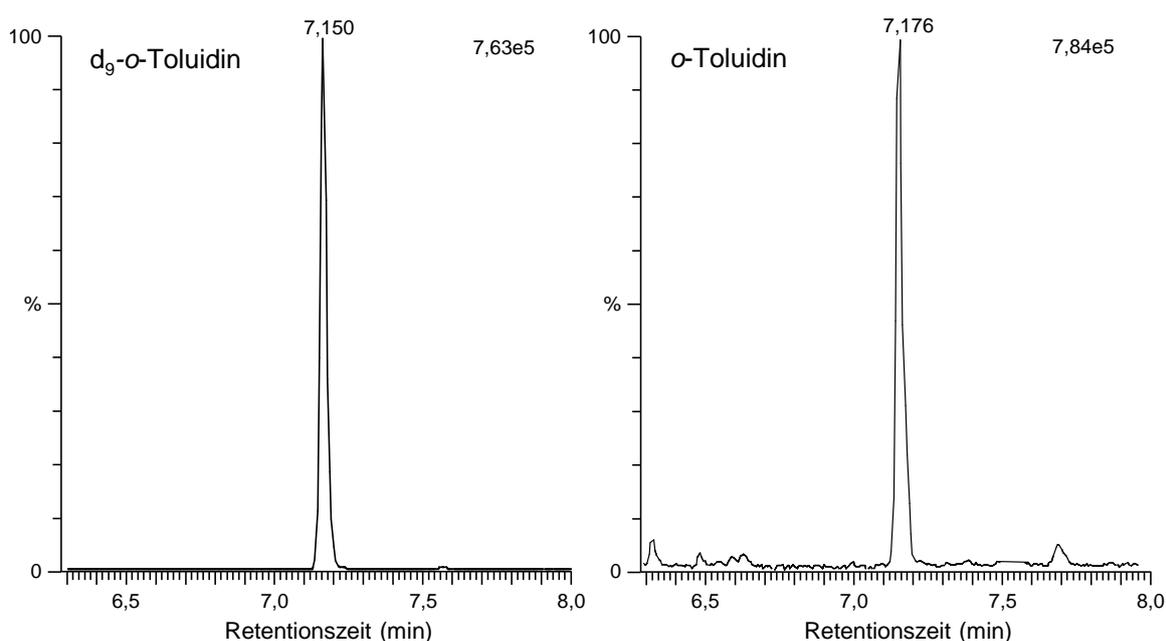


Abb. 3-1: Chromatogramme von d_9 -*o*-Toluidin und *o*-Toluidin im SIM-Modus bei m/z 290 und 283

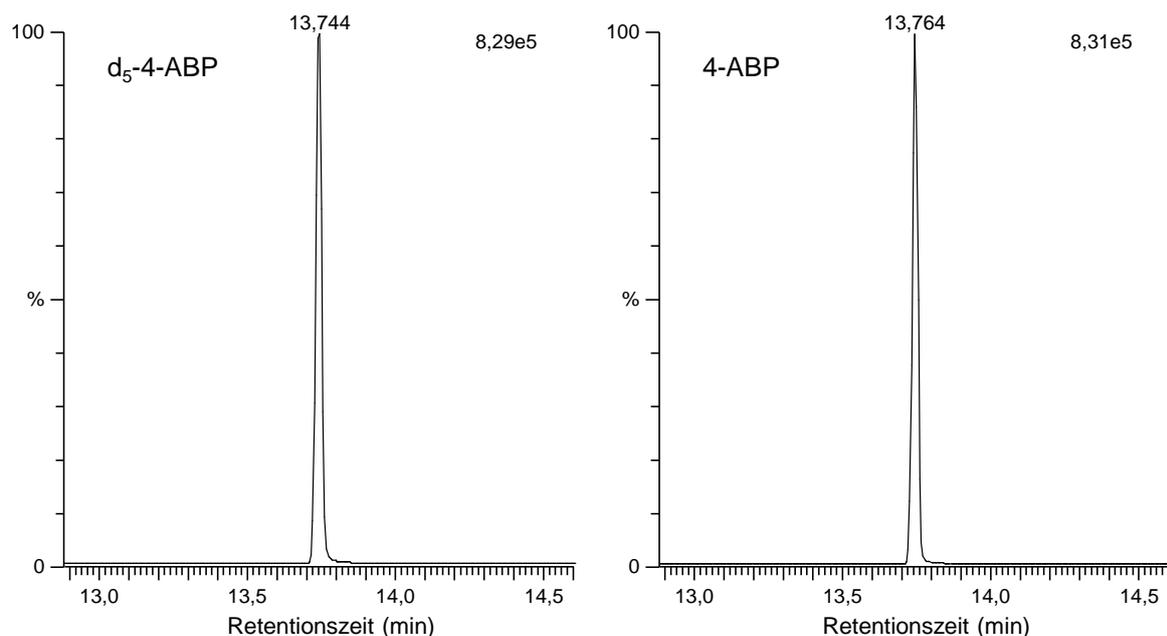


Abb. 3-2: Chromatogramme von d_5 -4-ABP und 4-ABP im SIM-Modus bei m/z 350 und 345

3.1.2 Überprüfung der Präzision der GC/MS Anlage

Aus einer Lösung der aromatischen Amine und deren jeweiligen IST wurde 6 mal 1 μ l vermessen (Tab. 3-2). Es zeigt sich eine hohe Präzision mit deutlich weniger als 2% Abweichung der SD vom Mittelwert.

Tab. 3-2: Wiederholte Messungen von 1 pg der Substanzen in der GC/MS Anlage (MW \pm SD; n=6)

| Substanz | Flächeneinheiten $\times 10^3$ | Abweichung vom Mittelwert (%) |
|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>o</i> -Toluidin | 1427,4 \pm 17,7 | 1,24% |
| d_9 - <i>o</i> -Toluidin | 1461,1 \pm 28,2 | 1,93% |
| 4-ABP | 1391,0 \pm 18,5 | 1,33% |
| d_5 -4-ABP | 1409,4 \pm 17,9 | 1,27% |

3.1.3 Bestimmung der Linearität und Wiederfindungsrate

Aus den Standardlösungen von *o*-Toluidin und 4-ABP wurden Verdünnungsreihen von 0,02-1,0 pg bzw. 0,01-1,0 pg hergestellt und mit je 1 pg der internen Standards versetzt, derivatisiert und mit GC/MS auf den Massenspuren m/z 283 und 290 für *o*-Toluidin und m/z 345 und 350 für 4-ABP vermessen. Bei beiden Substanzen konnten 50 fg mit einem S/N von 4 zu 1 quantifiziert werden. Die Abbildung 3-3 zeigt den linearen Anstieg der Massenverhältnisse von *o*-Toluidin (m/z 283) zu d_9 -*o*-Toluidin (m/z 290) und von 4-ABP (m/z 345) zu d_5 -4-ABP (m/z 350), der sich in der Regressionsanalyse als hoch signifikant ($p < 0,0001$) erwies.

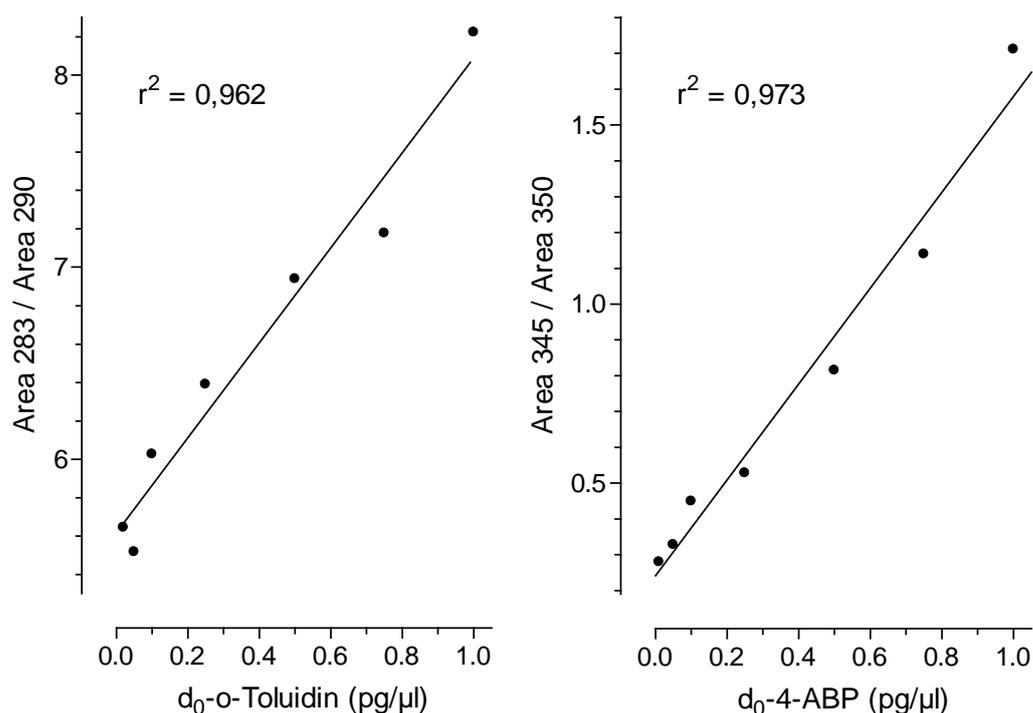


Abb. 3-3: Eichkurven der Flächen von steigenden Mengen von o-Toluidin (m/z 283) und 4-ABP (m/z 345) in Relation zu den Flächen von je 1 pg/µl der internen Standards d₉-o-Toluidin (m/z 290) und d₅-4-ABP (m/z 350).

3.1.4 Methodvalidierung für DNA-Addukte aus Gewebeproben

An zwei verschiedenen Tagen wurden jeweils 6 Aliquote mit gleicher DNA-Menge von größeren Gewebeproben zweier Sektionen analysiert. Tabelle 3.3 zeigt, dass die Standardabweichungen für die Messung der Analyten wie auch der zugesetzten internen Standards 15-30% der Mittelwerte ausmachten. Nur bei 4-ABP und d₅-4-ABP war in der ersten Serie die prozentuale Abweichung höher, blieb aber noch unter 50%.

Tab. 3-3: Wiederholte Messung von DNA aus zwei Proben von Harnblasengewebe an je einem Tag (Serie 1: 46 µg DNA pro Aliquot; Serie 2: 36 µg DNA pro Aliquot) (MW ± SD; n=6)

| Substanz | Serie 1 | | Serie 2 | |
|----------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| | Flächeneinheiten x 10 ³ | Abweichung vom MW (%) | Flächeneinheiten x 10 ³ | Abweichung vom MW (%) |
| o-Toluidin | 2181,9 ± 548,5 | 25,1 | 2918,1 ± 434,3 | 14,9 |
| d ₉ -o-Toluidin | 1029,7 ± 338,4 | 32,9 | 1452,0 ± 263,2 | 18,3 |
| 4-ABP | 58,9 ± 24,1 | 40,9 | 102,9 ± 22,8 | 22,2 |
| d ₅ -4-ABP | 1034,5 ± 493,7 | 47,7 | 1538,0 ± 357,2 | 23,2 |

In beiden Proben waren die Tagesblindwerte für *o*-Toluidin (Serie 1: $1211,4 \times 10^3$; Serie 2: $2287,6 \times 10^3$) und 4-ABP (Serie 1: $77,7 \times 10^3$; Serie 2: $58,5 \times 10^3$) größer als 50% der mittleren Messwerte, sodass in diesen Proben kein gesicherter Nachweis der Addukte geführt werden konnte.

In Bezug auf den zeitnah bestimmten Flächenwert von je 1 pg der derivatisierten internen Standards (Tab. 3.2) ergaben sich in der Zusammenfassung der 12 Werte der Serien 1 und 2 Wiederfindungsraten von $88,3 \pm 25,2\%$ für d_9 -*o*-Toluidin und $91,3 \pm 34,6\%$ für d_5 -4-ABP.

3.2 Demographische Daten und Raucherstatus

3.2.1 Proben von Sektionen aus der Rechtsmedizin

Proben von Harnblasengewebe wurden im Rahmen von 46 Sektionen im Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität im Zeitraum von Juni 2008 bis Februar 2009 erhalten. Die demographischen Daten sind in der Tabelle 3-4 zusammengefasst. Es handelte sich um 30 Männer und 16 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 50,1 Jahren, darunter ein 9 Wochen alter Säugling und eine 93 Jahre alte Greisin. Als häufigste Todesursache wurde bei 16 akut Verstorbenen ein nicht näher spezifiziertes Herz-Kreislaufversagen angegeben. Drogenmissbrauch war für 7 Todesfälle verantwortlich, Unfälle inklusive Verkehrsunfälle für 6, Suizid für 5 und Mord für 3 weitere Todesfälle. Je ein Mann und eine Frau starben durch Vergiftungen, ein Mann durch Erfrieren, eine Frau an Lungenkrebs und ein Mann an einer Grippe. In vier Fällen war die Todesursache zum Zeitpunkt der Probennahme ungeklärt. Die Verstorbenen wurden nach Einlieferung in Kühlboxen aufbewahrt und durchschnittlich 32 Stunden nach Eintritt des Todes seziert, 20 innerhalb von 24 Stunden und die restlichen 26 innerhalb von maximal 72 Stunden. Das entnommene Gewebe der Harnblasen zeigte keinerlei Anzeichen einer beginnenden Autolyse.

Für die Bestimmung des Rauchstatus konnten bei 35 Sektionen Urinproben und bei 33 Sektionen ausreichende Mengen von Zehennagelproben gewonnen werden. Die Einteilung der Verstorbenen in 19 akute Raucher bzw. Genießer anderer Formen von Tabak oder Verwendern von Nicotinersatzpräparaten (7 Frauen und 12 Männer) basiert auf den Ergebnissen der Urinalysen ($n = 12$) oder Angaben der Kriminalpolizei ($n = 7$). Die verbliebenen 27 Verstorbenen (9 Frauen und 18 Männer) wurden als Nichtraucher eingestuft. In 23 Fällen beruht diese Bewertung auf den Ergebnissen der Cotininmessungen im Urin. In zwei weiteren Fällen lagen zuverlässige Aussagen der Kriminalpolizei vor. Zwei Verstorbene wurden aufgrund der Nicotin- und Cotininanalysen in den Zehennägeln als Nichtraucher gewertet.

Tab. 3-4: Demographische Daten und Rauchstatus der akut Verstorbenen aus der Rechtsmedizin

| Nr. | Autopsie ^a | Alter (Jahre) | m/w | Raucher | Todesursache | Urin | Nägel |
|-----|-----------------------|---------------|-----|---------|------------------------|------|-------|
| 3 | 42 | 74 | w | nein | Herz-Kreislaufversagen | - | - |
| 4 | 31 | 56 | m | ja | Herz-Kreislaufversagen | - | - |
| 5 | 16 | 63 | m | nein | Herz-Kreislaufversagen | x | x |
| 6 | 24 | 60 | w | ja | Herz-Kreislaufversagen | - | x |
| 7 | 46 | 32 | m | nein | Unbekannt | x | x |
| 8 | 72 | 78 | w | nein | Herz-Kreislaufversagen | - | - |
| 9 | 37 | 48 | m | ja | Herz-Kreislaufversagen | - | - |
| 11 | 26 | 41 | m | ja | Unbekannt | x | x |
| 12 | 19 | 50 | w | nein | Herz-Kreislaufversagen | x | x |
| 13 | 72 | 93 | w | nein | Mord | - | x |
| 14 | 12 | 72 | m | nein | Erfrieren | x | x |
| 15 | 19 | 35 | m | ja | Verkehrsunfall/Unfall | x | x |
| 16 | 19 | 17 | m | nein | Verkehrsunfall/Unfall | x | x |
| 17 | 21 | 62 | w | nein | Drogenmissbrauch | - | x |
| 21 | 55 | 36 | m | nein | Herz-Kreislaufversagen | x | x |
| 22 | 48 | 35 | w | ja | Drogenmissbrauch | x | x |
| 23 | 7 | 46 | m | nein | Suizid | x | x |
| 24 | 48 | 72 | m | nein | Herz-Kreislaufversagen | x | x |
| 25 | 50 | 55 | w | ja | Herz-Kreislaufversagen | x | x |
| 26 | 43 | 54 | m | ja | Herz-Kreislaufversagen | x | - |
| 27 | 19 | 57 | m | nein | Vergiftung | x | x |
| 28 | 16 | 61 | m | nein | Herz-Kreislaufversagen | x | - |
| 29 | 29 | 33 | w | nein | Verkehrsunfall/Unfall | x | x |
| 30 | 5 | 30 | m | nein | Suizid | x | x |
| 31 | 44 | 33 | w | ja | Unbekannt | - | x |
| 32 | 31 | 79 | m | nein | Verkehrsunfall/Unfall | x | - |
| 33 | 48 | 49 | w | ja | Herz-Kreislaufversagen | - | - |
| 34 | 34 | 86 | w | ja | Herz-Kreislaufversagen | x | - |
| 35 | 31 | 58 | w | nein | Vergiftung | x | x |
| 36 | 49 | 17 | m | ja | Verkehrsunfall/Unfall | x | x |
| 37 | 24 | 26 | m | nein | Influenza | x | x |
| 38 | 23 | 32 | m | ja | Suizid | x | x |
| 39 | 27 | 20 | m | nein | Drogenmissbrauch | x | x |
| 40 | 47 | 57 | m | nein | Herz-Kreislaufversagen | x | x |
| 41 | 38 | 25 | m | ja | Drogenmissbrauch | x | x |
| 42 | 51 | 51 | w | nein | Lungenkrebs | x | - |
| 43 | 42 | 88 | w | nein | Mord | - | x |
| 44 | 36 | 0,2 | m | nein | Unbekannt | - | - |
| 45 | 32 | 67 | m | nein | Suizid | x | x |
| 46 | 20 | 78 | m | nein | Verkehrsunfall/Unfall | x | - |
| 47 | 22 | 40 | m | ja | Drogenmissbrauch | x | - |
| 48 | 19 | 54 | m | nein | Mord | x | x |
| 49 | 8 | 43 | m | ja | Suizid | x | x |
| 50 | 12 | 57 | m | ja | Drogenmissbrauch | x | x |
| 51 | 12 | 28 | m | ja | Drogenmissbrauch | x | x |
| 52 | 23 | 57 | w | ja | Herz-Kreislaufversagen | x | x |

^a Stunden nach dem Todeszeitpunkt; m/w = männlich/weiblich; x = Proben für die Alkaloidanalysen

In der Tabelle 3-5 ist die statistische Auswertung der demographischen Daten zusammengefasst. Es zeigt sich, dass Männer durchschnittlich 15 Jahre jünger waren und die Zeit zwischen Eintritt des Todes und der Sektion deutlich kürzer war.

Tab. 3-5: Aufschlüsselung der demographischen Daten der akut Verstorbenen aus der Rechtsmedizin nach Geschlecht und Rauchstatus

| | Autopsie (Stunden nach dem Tod) | | | | | Alter (Jahre) | | | |
|--------------|---------------------------------|-----------------|----|-----|-----|-------------------|------|------|------|
| | n | MW | SD | Min | Max | MW | SD | Min | Max |
| Alle | 46 | 32 | 16 | 5 | 72 | 50,1 | 20,8 | 0,2 | 93,0 |
| Männer | 30 | 27 ^a | 14 | 5 | 55 | 44,8 ^b | 19,9 | 0,2 | 79,0 |
| Frauen | 16 | 41 | 16 | 19 | 72 | 60,1 | 19,1 | 33,0 | 93,0 |
| Raucher | 19 | 31 | 14 | 8 | 50 | 44,8 | 15,9 | 17,0 | 86,0 |
| Nichtraucher | 27 | 32 | 18 | 5 | 72 | 53,9 | 23,2 | 0,2 | 93,0 |

^{a,b} Signifikant verschieden von den Werten für Frauen, $p < 0,01$ (a) und $p < 0,05$

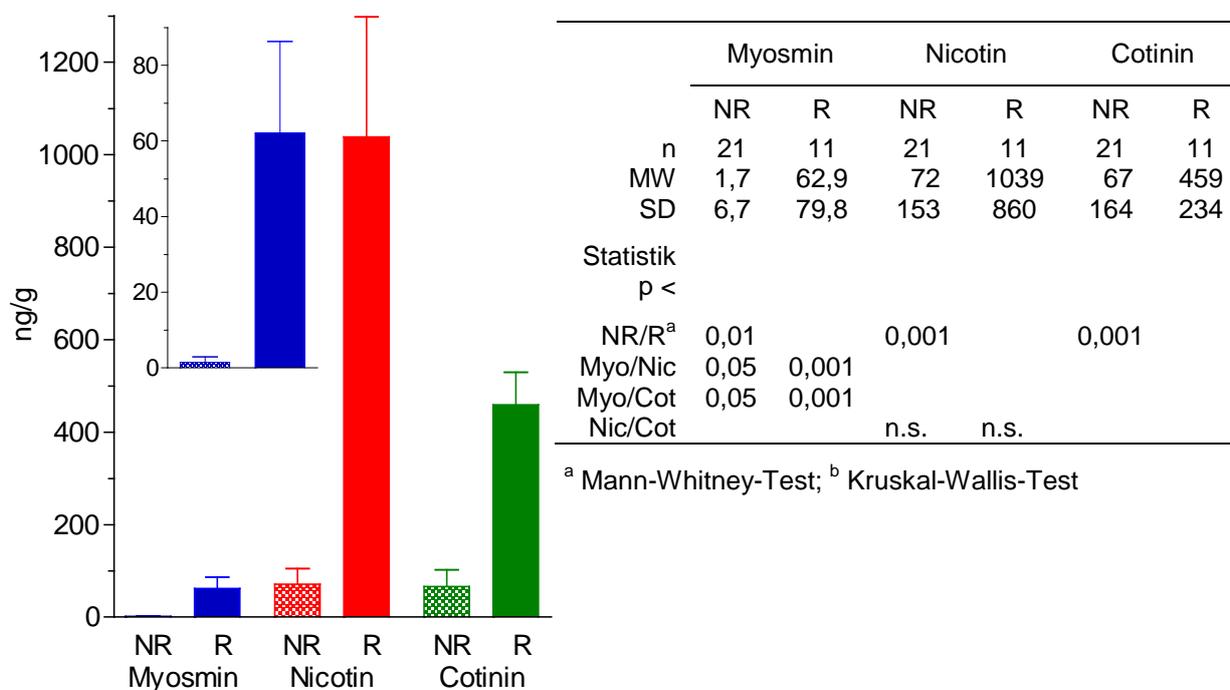


Abb. 3-4: Tabakalkaloide in Zehennägeln von akut Verstorbenen in Abhängigkeit vom Rauchstatus; MW ± SE von 21 Nichtrauchern (NR) und 11 Rauchern (R).

Die Bestimmung der Tabakalkaloide in Proben von Zehennägeln ergab hoch signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Abb. 3-4). Allerdings war Myosmin nur bei einem von 20 Nichtrauchern mit 31,0 ng/g oberhalb der Nachweisgrenze von 10 ng/g, alle übrigen Werte gingen als Nullwerte in die statistische Berechnung ein. Dagegen lag Nicotin bei zehn und Cotinin bei 9 von 21 Nichtrauchern oberhalb der jeweiligen Nachweisgrenzen von 20 und 35 ng/g. Auch bei den Rauchern war Myosmin in 4 von 11 Proben nicht nachweisbar, während Nicotin und Cotinin in allen Fällen deutlich über der Nachweisgrenze lagen.

3.2.2 Proben von Tumorpatienten aus Regensburg

Im Rahmen von Operationen wurden Proben von Tumorgewebe aus der Harnblase von 12 Patienten des Caritas-Krankenhaus St. Josef der Universitätsklinik Regensburg zur Verfügung gestellt. Die histopathologische Untersuchung ergab bei allen Patienten ein Urothelkarzinom. Die demographischen Daten sind in der Tabelle 3-6 zusammengefasst. Bei den Patienten handelte es sich um 11 Männer mit einem Durchschnittsalter von 63 Jahren (44-79 Jahre) und einer 75 Jahre alten Frau, die aktive Raucherin war. Von den 11 Männern waren je 4 aktuelle Raucher bzw. Exraucher, drei Männer haben nach eigener Aussage niemals geraucht. Für die Überprüfung des Rauchstatus standen uns Urinproben von der Frau und von 10 Männern zur Verfügung. Die Bestimmung von Cotinin mit GC/MS bestätigte die Einstufung des Rauchstatus (Abb. 3-5). Wegen seines relativ kurzfristigen Rauchstopps wurde der Patient Nr. 10503 für die Bewertung der DNA-Addukte noch als aktueller Raucher eingestuft, obwohl sein Cotininwert mit 2,8 ng/ml Urin weit unter dem cut-off-Wert von 100 ng/ml lag.

Tab. 3-6: Demographische Daten und Rauchstatus der Tumorpatienten aus Regensburg

| Patient Nr. | Alter (Jahre) | m/w | Raucherstatus aktuell | Raucherstatus Anmerkungen | Beruf |
|-------------|---------------|-----|-----------------------|--|----------------------|
| 1580 | 79 | m | ja | 60 Jahre aktiver Pfeifenraucher, gelegentlich Zigaretten | Landwirt |
| 3006 | 71 | m | nein | Exraucher, 45 PY | Schreiner |
| 9875 | 60 | m | nein | Niemalsraucher | Galvaniseur |
| 10503 | 59 | m | ja | Exraucher, seit 6 Wochen, 30 PY | Landwirt |
| 10937 | 56 | m | ja | aktiver Raucher, 30 PY | Krankenpfleger |
| 11946 | 75 | w | ja | aktiver Raucher, 27 PY | Hausfrau |
| 14565 | 69 | m | nein | Niemalsraucher | Maurer |
| 20536 | 71 | m | nein | Exraucher, 45 PY | Bauingenieur |
| 20977 | 69 | m | nein | Exraucher seit 1988, 60 PY | Metallhärter |
| 22813 | 49 | m | ja | aktiver Raucher, 45 PY | Metallarbeiter |
| 23333 | 44 | m | nein | Exraucher, seit 6 Monaten | Heizungsinstallateur |
| 26462 | 71 | m | nein | Niemalsraucher | Tankwart |

m/w = männlich/weiblich; PY = Pack Years (Zahl der täglich konsumierten Zigarettenpackungen (Inhalt ca. 20 Stück) multipliziert mit der Zahl der Raucherjahre)

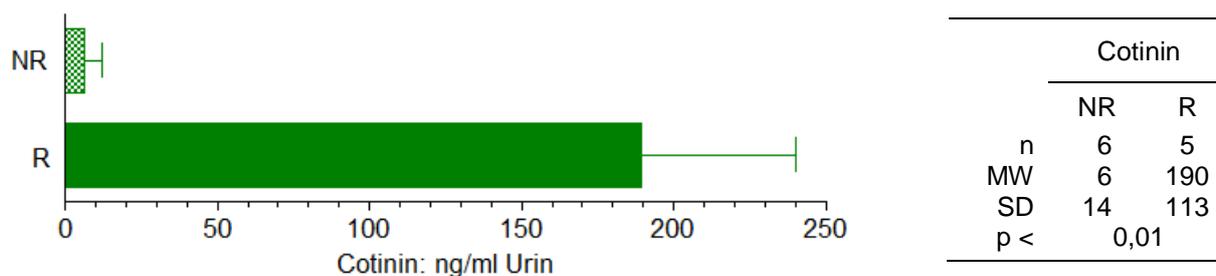


Abb. 3-5: Cotinin im Urin von Tumorpatienten aus Regensburg; MW \pm SE von 6 Nichtrauchern (NR) und 5 Rauchern (R).

3.3 Bestimmung der DNA-Addukte

In den arbeitstäglich mit 4-6 Proben gleichzeitig vermessenen Blindproben, die nur Wasser anstelle von DNA enthielten, waren stets Spuren von *o*-Toluidin und 4-ABP enthalten. Diese unvermeidlichen Blindwerte erschweren die Quantifizierung der Addukte, die nach saurer Hydrolyse von DNA aus Harnblasengewebe gemessen werden. Ergebnisse wurden nur als gesichert betrachtet, wenn die bei der GC/MS-Analyse erhaltenen Flächen mehr als das Doppelte der entsprechenden Tagesblindwerte berschreiten. Alle anderen Proben gingen als Nullwerte in die weiteren Berechnungen ein. Aus der Darstellung der Einzelwerte in Tabelle 3-7 lässt sich ablesen, dass *o*-Toluidin bei 11 der 12 Tumorpatienten nachweisbar war, während 4-ABP nur bei 4 Patienten auswertbar war. Dagegen war im Sektionsmaterial von akut Verstorbenen aus der Rechtsmedizin *o*-Toluidin in den epithelialen und subepithelialen Geweben nur in 13 und 10 Proben nachweisbar, während die Flächen für 4-ABP in diesen Geweben bei

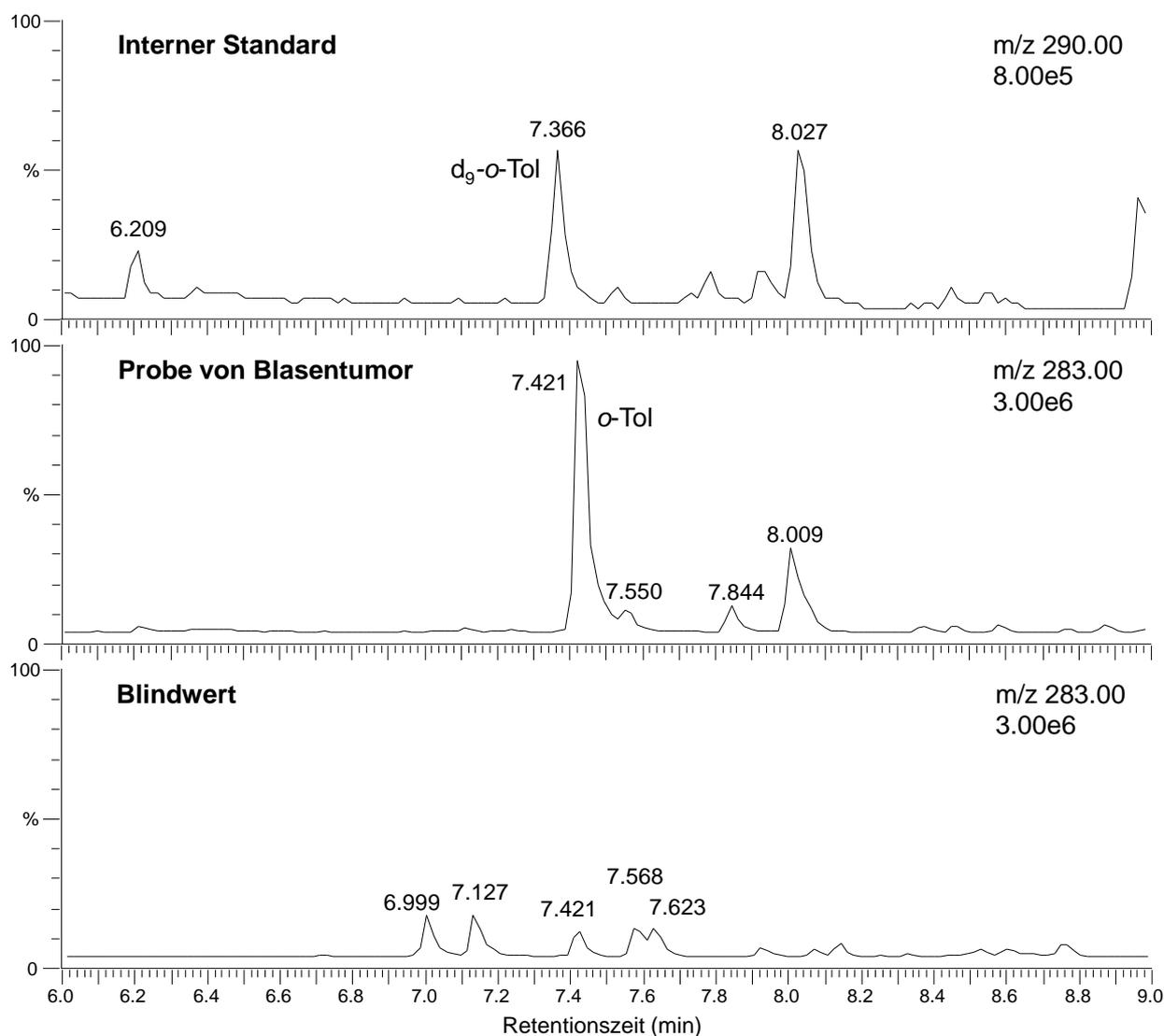


Abb. 3-6: GC/MS-Chromatogramme der HFBA-Derivate von d₉-*o*-Toluidin (interner Standard), *o*-Toluidin im Tumorgewebe von Patient-Nr. 9875 und eines Blindwerts.

32 bzw. 28 Proben mehr als doppelt so hoch waren wie die jeweiligen Tagesblindwerte. Die Abbildungen 3-6 und 3-7 zeigen beispielhaft Chromatogramme von Tumorproben von Patienten mit Harnblasenkrebs aus Regensburg, in denen *o*-Toluidin und 4-ABP eindeutig nachgewiesen werden konnten.

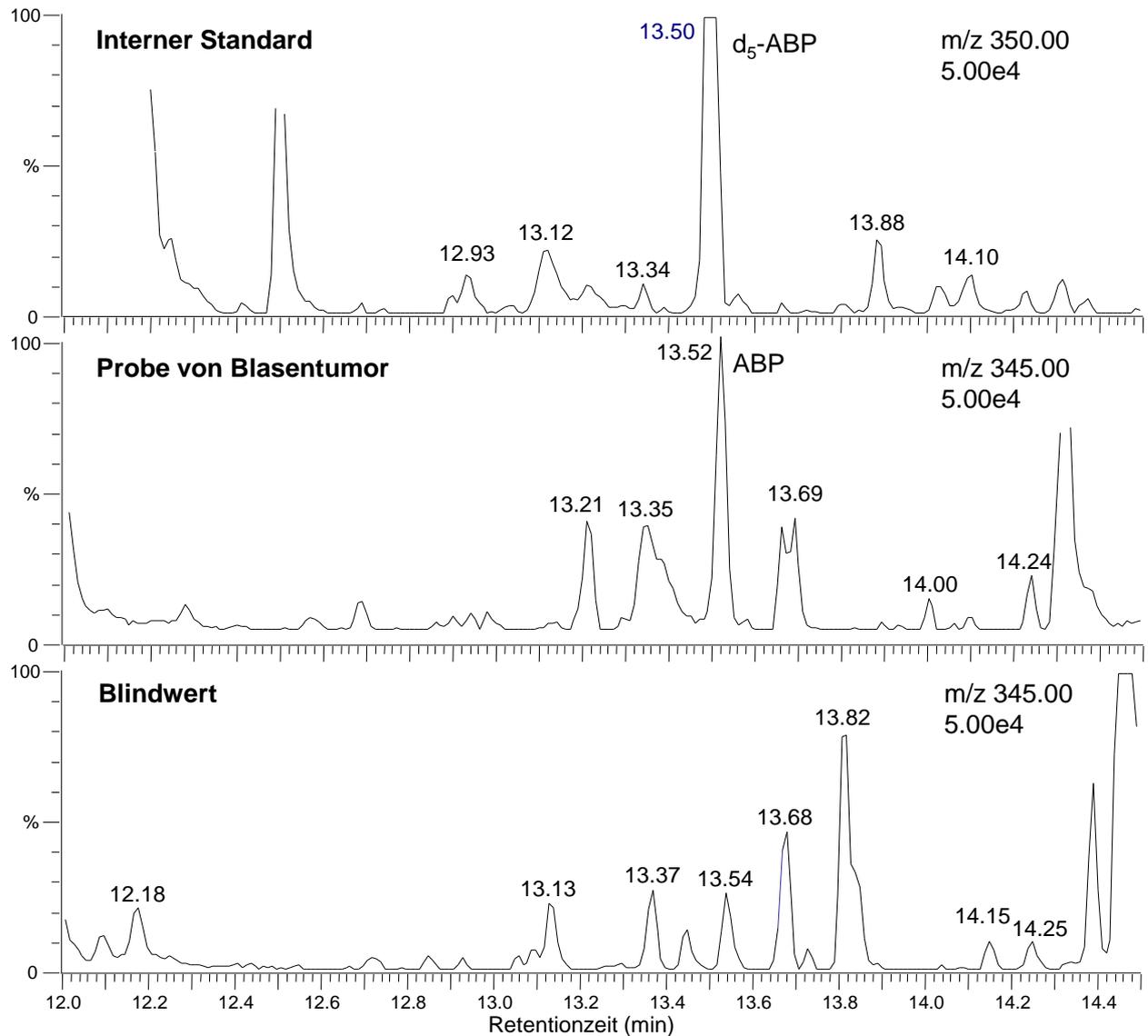
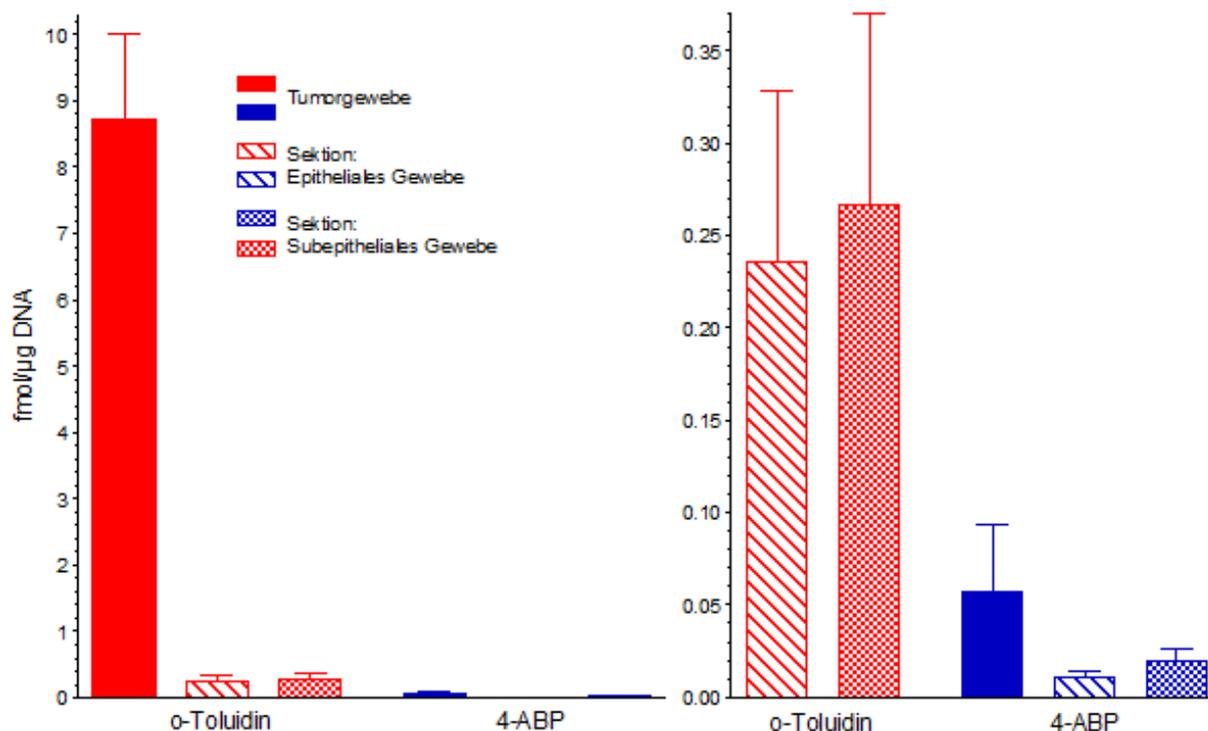


Abb. 3-7: GC/MS-Chromatogramme der HFBA-Derivate von d_5 -4-ABP (interner Standard), 4-ABP im Tumorgewebe von Patient-Nr. 3006 und eines Blindwerts.

Tab. 3-7: o-Toluidin und 4-ABP abspaltende DNA-Addukte (fmol/ μ g DNA) in Tumorgewebe von Patienten mit Harnblasenkrebs aus Regensburg und in epithelialem und subepithelialem Harnblasengewebe von Sektionen aus der Rechtsmedizin; alle Werte mit weniger als der Hälfte des jeweiligen Tagesblindwerts wurden auf Null gesetzt.

| Tumorpatienten | | | Sektion akut Verstorbener | | | | |
|----------------|------------|-------|---------------------------|--------------------|-----------------------|---------------|------------------|
| Patient Nr. | o-Toluidin | 4-ABP | Probe Nr. | o-Toluidin Epithel | o-Toluidin Subepithel | 4-ABP Epithel | 4-ABP Subepithel |
| 1580 | 0,000 | 0,080 | 3 | 0,640 | 1,836 | 0,005 | 0,198 |
| 3006 | 12,007 | 0,000 | 4 | 0,499 | 2,322 | 0,006 | 0,015 |
| 9875 | 8,656 | 0,437 | 5 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 10503 | 13,243 | 0,000 | 6 | 0,000 | 0,000 | 0,007 | 0,006 |
| 10937 | 4,008 | 0,000 | 7 | 0,000 | 0,000 | 0,008 | 0,014 |
| 11946 | 9,379 | 0,098 | 8 | 1,105 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 14565 | 12,565 | 0,000 | 9 | 3,611 | 1,053 | 0,067 | 0,000 |
| 20536 | 14,544 | 0,000 | 11 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,028 |
| 20977 | 10,052 | 0,000 | 12 | 0,000 | 3,545 | 0,029 | 0,103 |
| 22813 | 3,974 | 0,066 | 13 | 0,000 | 0,000 | 0,015 | 0,007 |
| 23333 | 11,138 | 0,000 | 14 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,015 |
| 26462 | 5,100 | 0,000 | 15 | 0,000 | 0,000 | 0,012 | 0,015 |
| | | | 16 | 0,000 | 0,000 | 0,025 | 0,000 |
| | | | 17 | 0,000 | 0,000 | 0,011 | 0,000 |
| | | | 21 | 0,500 | 0,000 | 0,007 | 0,000 |
| | | | 22 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | | | 23 | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,000 |
| | | | 24 | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,000 |
| | | | 25 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,004 |
| | | | 26 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | | | 27 | 0,000 | 0,000 | 0,126 | 0,008 |
| | | | 28 | 0,000 | 0,716 | 0,008 | 0,014 |
| | | | 29 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,007 |
| | | | 30 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,000 |
| | | | 31 | 0,449 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | | | 32 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,004 |
| | | | 33 | 0,000 | 0,356 | 0,000 | 0,004 |
| | | | 34 | 0,176 | 0,000 | 0,003 | 0,007 |
| | | | 35 | 0,273 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | | | 36 | 1,967 | 0,000 | 0,043 | 0,045 |
| | | | 37 | 0,000 | 0,000 | 0,045 | 0,005 |
| | | | 38 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,243 |
| | | | 39 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,000 |
| | | | 40 | 0,172 | 0,000 | 0,002 | 0,009 |
| | | | 41 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | | | 42 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | | | 43 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | | | 44 | 0,691 | 0,549 | 0,000 | 0,007 |
| | | | 45 | 0,281 | 1,237 | 0,003 | 0,016 |
| | | | 46 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | 0,000 |
| | | | 47 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,005 |
| | | | 48 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | 0,004 |
| | | | 49 | 0,000 | 0,451 | 0,003 | 0,003 |
| | | | 50 | 0,478 | 0,000 | 0,016 | 0,060 |
| | | | 51 | 0,000 | 0,219 | 0,024 | 0,020 |
| | | | 52 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,010 |



| | Tumorpatienten | | Sektion akut Verstorbener | | | |
|---------------------------|--------------------|-------|----------------------------|-------------------------------|---------------|------------------|
| | <i>o</i> -Toluidin | 4-ABP | <i>o</i> -Toluidin Epithel | <i>o</i> -Toluidin Subepithel | 4-ABP Epithel | 4-ABP Subepithel |
| n | 12 | 12 | 46 | 46 | 46 | 46 |
| MW | 8,722 | 0,057 | 0,236 | 0,267 | 0,011 | 0,019 |
| SD | 4,491 | 0,125 | 0,625 | 0,697 | 0,022 | 0,047 |
| Statistik ^a p< | | | | | | |
| Tum/Sekt | | | 0,001 | 0,001 | n.s. | n.s. |
| Tol/4-ABP | 0,001 | | n.s. | 0,05 | | |

^a Mann-Whitney-Test auf Unterschiede zwischen gleichen Geweben

Abb. 3-8: *o*-Toluidin und 4-ABP abspaltende DNA-Addukte in Tumorgewebe von 12 Patienten mit Harnblasenkrebs aus Regensburg und in epithelalem und subepithelalem Harnblasengewebe von 46 Sektionen aus der Rechtsmedizin (links) und in vergrößertem Maßstab ohne *o*-Toluidin im Tumorgewebe (rechts); fmol/µg DNA, MW ± SE

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Geweben (Abb. 3-8) zeigt, dass im Tumorgewebe erheblich höhere Konzentrationen vorhanden sind, als in den Geweben von akut Verstorbenen. Dies gilt vor allem für *o*-Toluidin, das im Tumorgewebe mehr als 30-fach höhere Werte erreicht als im epithelialen und subepithelialen Gewebe der Sektionen ($p < 0,001$). Bei 4-ABP ist dieser Unterschied nur 3- bis 5-fach und erreicht keine Signifikanz. Zwischen epithelialen und subepithelialen Geweben sind bei beiden aromatischen Aminen keine signifikanten Unterschiede zu sehen. Im Tumorgewebe ist die Konzentration der *o*-Toluidin abspaltenden DNA-Addukte 153-fach höher als jene von 4-ABP ($p < 0,001$). Auch in den Geweben der

Sektionen ist 15 bis 20 mal mehr *o*-Toluidin als 4-ABP vorhanden. Wegen der hohen Streuungen erreichen die Unterschiede aber nur im subepithelialen Gewebe Signifikanz ($p < 0,05$).

Der aktuelle Rauchstatus hat keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen der DNA-Addukte im Harnblasengewebe (Abb. 3-9). Bei Tumorpatienten ist sogar eine gegenteilige Tendenz zu höheren Werten bei Nichtrauchern zu sehen (+40% für *o*-Toluidin). Im epithelialen Gewebe von akut Verstorbenen ist mit einer 2,8-fachen Erhöhung bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern der größte Effekt gegeben, der aber auch keine Signifikanz erreicht.

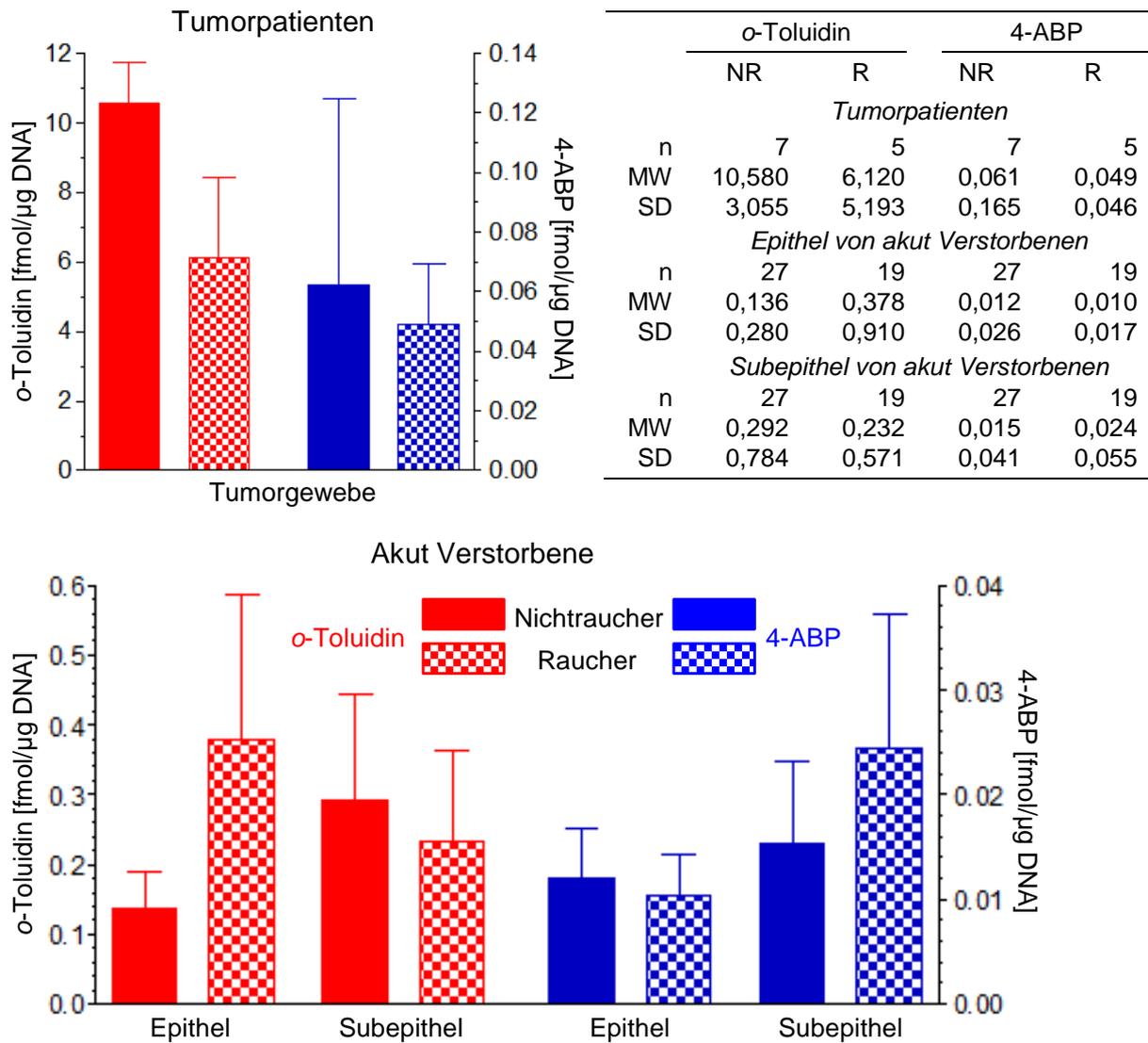
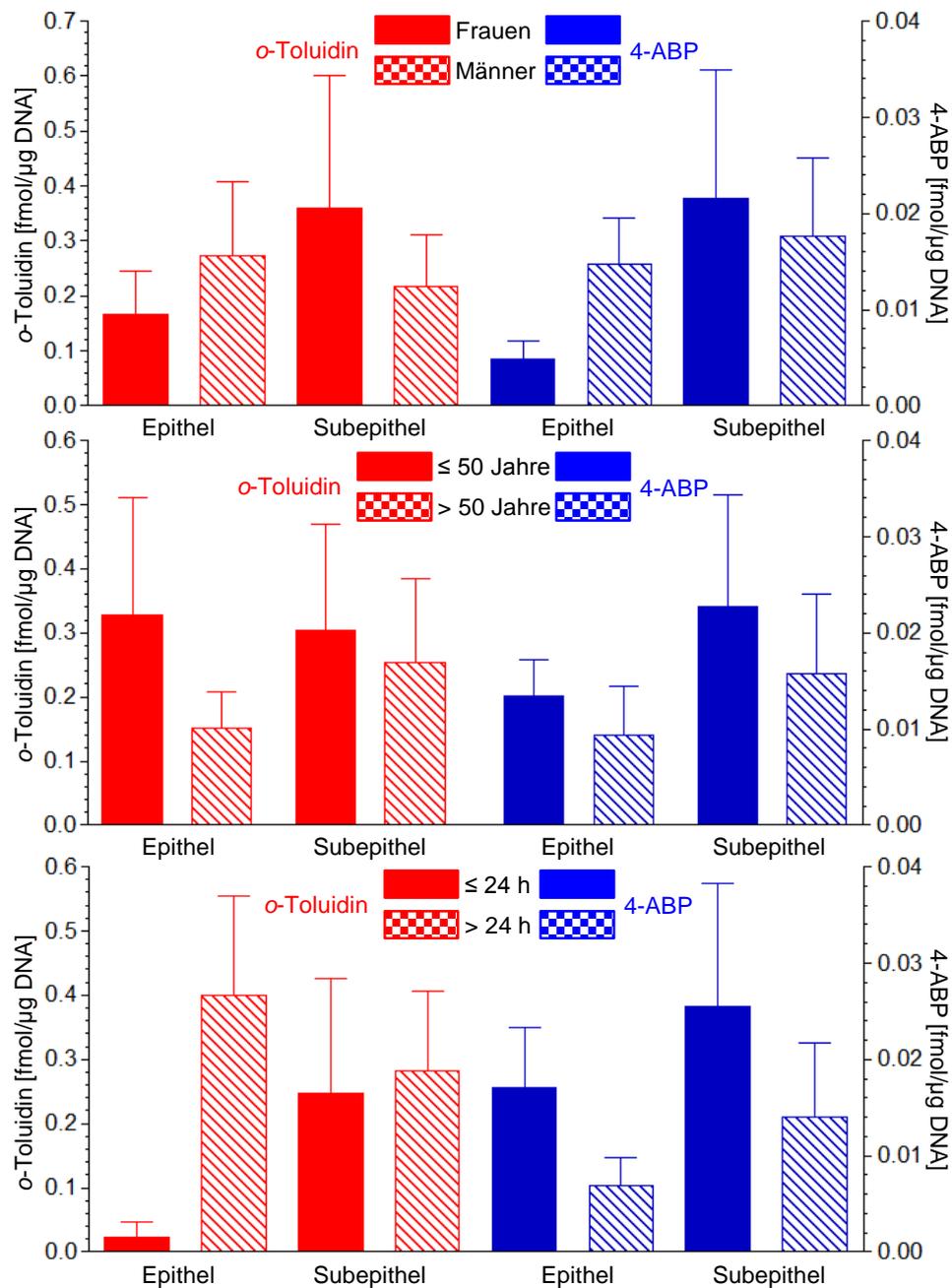


Abb. 3-9: Einfluss des Rauchens auf *o*-Toluidin und 4-ABP abspaltende DNA-Addukte in Tumorgewebe von 12 Patienten mit Harnblasenkrebs aus Regensburg und in epithelialem und subepithelalem Harnblasengewebe von 46 Sektionen; fmol/ μ g DNA, MW \pm SE.



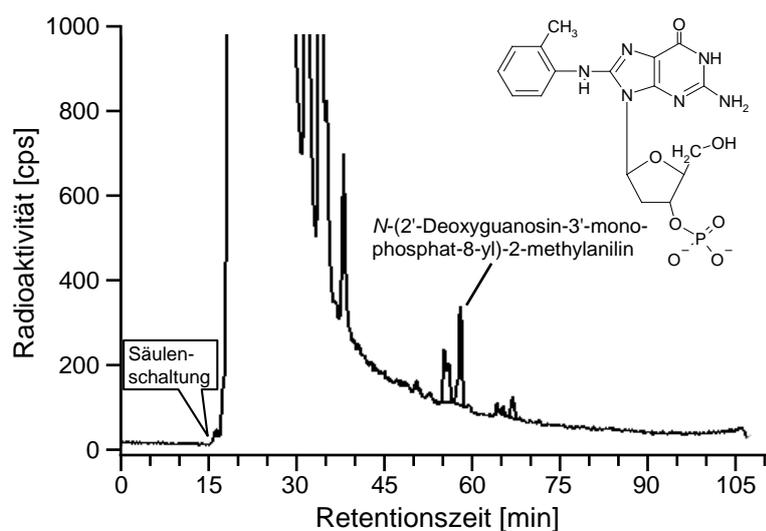
| | n | o-Toluidin | | 4-ABP | |
|------------------|----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Epithel | Subepithel | Epithel | Subepithel |
| Frauen | 16 | 0,165±0,316 | 0,359±0,966 | 0,005±0,008 | 0,022±0,053 |
| Männer | 30 | 0,273±0,742 | 0,218±0,514 | 0,015±0,026 | 0,018±0,045 |
| Alter ≤ 50 Jahre | 22 | 0,328±0,858 | 0,281±0,775 | 0,013±0,023 | 0,023±0,054 |
| Alter > 50 Jahre | 24 | 0,151±0,278 | 0,255±0,634 | 0,009±0,025 | 0,016±0,041 |
| Autopsie ≤24 h | 20 | 0,024±0,107 | 0,247±0,799 | 0,017±0,028 | 0,026±0,057 |
| Autopsie >24 h | 26 | 0,399±0,795 | 0,302±0,623 | 0,007±0,015 | 0,014±0,039 |

Abb. 3-10: Einfluss des Geschlechts (oben), Alters (Mitte) und des Zeitraums vom Todeszeitpunkt bis zur Autopsie (unten) auf o-Toluidin und 4-ABP abspaltende DNA-Addukte in epitheliale und subepitheliale Harnblasengewebe von 46 Sektionen; fmol/μg DNA, MW ± SE.

Eine weitere Aufschlüsselung der Ergebnisse zu den DNA-Addukten war nur bei den Gewebeproben von den Sektionen möglich. Die Konzentrationen der *o*-Toluidin und 4-ABP abspaltenden DNA-Addukte zeigen dabei keinen signifikanten Einfluss des Geschlechts, des Alters und der Zeit, die zwischen Todeseintritt und Sektion verstrichen war (Abb. 3-10). Männer haben im epithelialen Gewebe tendenziell höhere Adduktraten von *o*-Toluidin (1,7-fach) und 4-ABP (3-fach), im subepithelialen Gewebe dagegen etwas niedrigere Werte (1,6- und 1,2-fach). Akut Verstorbene unter 50 Jahren haben in allen Geweben tendenziell höhere Adduktbelastungen von beiden aromatischen Aminen als über 50-Jährige. Mit etwas mehr als einer Verdoppelung ist der Unterschied für *o*-Toluidin im epithelialen Gewebe am größten. Die Abhängigkeit von der Dauer zwischen Todeseintritt und Sektion zeigt keine einheitliche Tendenz. Auch hier war der Unterschied mit mehr als dem 15-fachen für *o*-Toluidin im epithelialen Gewebe am größten.

4 Diskussion

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis von DNA-Addukten in der Harnblase des Menschen, die nach Hydrolyse das als Humankarzinogen eingestufte monocyclische aromatische Amin *o*-Toluidin abspalten. Damit bestätigt sich die Vermutung, dass für dieses Amin ebenso wie für das bisher fast ausschließlich untersuchte Humankarzinogen 4-ABP [58,73,75-98] ein genotoxischer Mechanismus als Auslöser der Kanzerogenese angenommen werden kann [35]. Generell war lange Zeit umstritten, ob *o*-Toluidin DNA-Addukte bildet. Jones und Sabbioni [104] konnten in Ratten nach oraler Gabe von 54 mg *o*-Toluidin/kg Körpergewicht mit HPLC/MS keine DNA-Addukte in der Leber nachweisen. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde dagegen das C8-Guaninaddukt von *o*-Toluidin mit ^{32}P -Postlabeling unter Anwendung einer HPLC-Anreicherungsmethode durch Co-Chromatographie mit dem synthetischen Standard in der Rattenleber selbst nach intraperitonealer Gabe von nur 1 mg *o*-Toluidin/kg Körpergewicht nachgewiesen [105-107]. Nach DNA-Isolierung und Verdau zu den Mononukleotiden wurden die Addukte durch Butanolextraktion angereichert und mit $^{32}\text{PO}_4$



gelabelt. Die Abbildung 4-1 zeigt das Chromatogramm, das nach 15 min Anreicherung mit Puffer auf einer C18-Vorsäule und anschließender Elution mit einem Gradienten aus Puffer und Methanol auf einer analytischen C18-Säule erhalten wurde.

Abb. 4-1: HPLC-Chromatogramm von Rattenleber-DNA 24 h nach 1 mg *o*-Toluidin/kg KG i.p. (modifiziert nach Hock [106]).

Nach Mehrfachgabe von *o*-Toluidin und Prilocain an männliche Ratten fanden Duan et al. [108] ebenfalls mit ^{32}P -Postlabeling nicht näher charakterisierte DNA-Addukte in Leber und Nasenschleimhaut, aber nicht in der Harnblase. Den ersten Hinweis auf DNA-Addukte von *o*-Toluidin in der Harnblase des Menschen erhielt Gaber in unserer Arbeitsgruppe bei Probanden, die mit Prilocain behandelt worden waren [79,99].

Im Folgenden sollen Aspekte der hier verwendeten Analytik, die Herkunft der unvermeidlichen Blindwerte und schließlich die signifikant höhere Adduktbelastung bei den Tumorpatienten im Vergleich zu den akut Verstorbenen aus der Rechtsmedizin diskutiert werden.

4.1 Analyse von DNA-Addukten aromatischer Amine

Die hier verwendete Analysenmethode basiert auf der Kombination von zwei in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methoden, die einerseits für die Bestimmung von Hämoglobinaddukten aromatischer Amine entwickelt wurden [36,52,99,109] und andererseits von uns zum Nachweis von DNA-Addukten tabakspezifischer Nitrosamine verwendet werden [100,110]. Nach Isolierung aus dem Harnblasengewebe wird die DNA einer sauren Hydrolyse unterworfen. Die Bestimmung der freigesetzten aromatischen Amine erlaubt keine Rückschlüsse auf die Natur der Addukte. So kann *o*-Toluidin nicht nur am C8-Atom des Guanins binden, sondern auch an den N- und O-Funktionen von Guanin und Adenosin [104,111,112]. Mit neuerdings entwickelten HPLC/MS-Methoden kann das C8-Addukt von 4-ABP am Guanin direkt ohne Hydrolyse in humanen Geweben bestimmt werden [58,74,113,114]. Die Methoden sind spezifisch für dieses Addukt und vermeiden zusätzlich die Verfälschung durch Blindwerte, die von der Umweltkontamination mit 4-ABP herrühren können. Sie erfassen aber naturgemäß nicht alle Addukte von 4-ABP und sind oft noch nicht ausreichend empfindlich für kleine DNA-Mengen. Entsprechende Methoden wurden für das C8-Addukt von *o*-Toluidin noch nicht entwickelt.

Die Messung aromatischer Amine wie *o*-Toluidin und 4-ABP nach Derivatisierung mit HFBA durch NCI-GC/MS im SIM-Modus ist eine von der DFG validierte Analysenmethode [101], die verbreitet Anwendung findet. Sie zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus. Die Verwendung der deuterierten internen Standards d_9 -*o*-Toluidin und d_5 -4-ABP gewährleistet eine sichere Zuordnung der Analyten *o*-Toluidin und 4-ABP in den Chromatogrammen und erlaubt die Kontrolle von etwaigen Verlusten während des Analysengangs. Bei der Validierung erwies sich die Methode als stabil und ergab eine hohe Wiederfindungsrate.

In der Literatur findet sich keine systematische vergleichende Analyse von saurer und alkalischer Hydrolyse für die Freisetzung von 4-ABP und *o*-Toluidin aus ihren DNA-Addukten. Für die Abspaltung von 4-ABP aus DNA-Addukten fand allerdings bisher routinemäßig eine alkalische Hydrolyse Verwendung. Lin et al. [75] begründen die Anwendung der alkalischen Hydrolyse für die Bestimmung von DNA-Addukten von 4-ABP mit Untersuchungen von Bakthavachalam et al. [115] mit Addukten von Acetylaminofluoren. Die von uns verwendete saure Hydrolyse erwies sich als äußerst effektiv für die Hydrolyse aller bisher bekannten DNA-Addukte der tabakspezifischen Nitrosamine [116-118]. Durch Zugabe der internen

Standards vor der Hydrolyse konnte ein signifikanter Verlust durch Zerstörung der aromatischen Amine ausgeschlossen werden.

4.2 Hintergrundbelastung mit aromatischen Aminen

Angesichts der bekannten Spezifität von 4-ABP für das Rauchen [12,43] denkt man bei Hintergrundbelastungen, die zu Blindwerten in der Analyse führen, zunächst an eine Kontamination aus dieser Quelle. In dem komplett renovierten Gebäude für die Rechtsmedizin und die Abteilung Toxikologie des Walther-Straub-Instituts in der Nußbaumstraße in München kann dies weitgehend ausgeschlossen werden. Das Rauchen war in dem gesamten Gebäude seit der 2004 abgeschlossenen Renovierung nicht mehr zugelassen. Eigene Erfahrung mit Blindwerten bei der Nicotinanalyse hatten uns im früheren Gebäude in der Goethestraße gezeigt, wie deutlich sich eine Rauchbelastung innerhalb des gleichen Stockwerks auf die Analysenergebnisse auswirkt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Tabakalkaloiden im Urin und in den Zehennägeln ergaben sich keine Hinweise auf eine Kontamination der neuen Laboratorien mit Zigarettenrauch. Die trotzdem unvermeidlich auftretenden Blindwerte bei Analyse der aromatischen Amine müssen deshalb andere Ursachen haben.

Für aromatische Amine gibt es vielfältige bis heute nicht ausreichend charakterisierte Umweltquellen. Für 4-ABP ist bekannt, dass es bei Erhitzungsprozessen von Nahrungsmitteln gebildet werden kann. Chiang et al. [119] fanden beim Erhitzen verschiedener Speiseöle signifikante Mengen an 4-ABP und 2-Naphthylamin im Bratendunst. Beim Pelletieren des Futters für Nagetiere entstehen ebenfalls aromatische Amine [120]. Obwohl *o*-Toluidin weltweit in hohen Mengen produziert wird, die Schätzung für 2001 beträgt 59.000 Tonnen [121], ist über die Quellen von *o*-Toluidin in der Umwelt noch sehr wenig bekannt [122-126]. Die Daten zum Biomonitoring beim Menschen zeigen jedoch, dass die Belastung mit *o*-Toluidin wesentlich höher ist, als die mit 4-ABP. Dabei unterscheiden sich die Hb-Addukte von *o*-Toluidin zwischen Rauchern und Nichtrauchern nur geringfügig [36,54,127]. Auf die *o*-Toluidin-Belastung von Patienten nach Prilocainbehandlung wurde bereits in der Einleitung eingegangen [36]. Die höchsten Adduktwerte fanden sich jedoch bei Arbeitern aus der Reifenindustrie [128], bei denen gleichzeitig ein stark erhöhtes Harnblasenkrebsrisiko festgestellt wurde [129-131]. Ursache hierfür ist die Verwendung von 1,3-Di-*o*-tolylguanidin als Vulkanisationsbeschleuniger (Abb. 4-2). Durch unvollständige Umsetzung bei der Synthese bleibt freies *o*-Toluidin als Kontamination im Gummi der Reifen vorhanden. Weitere Quellen für eine *o*-Toluidin-Belastung am Arbeitsplatz und in der Umwelt stellen Farben wie Magenta,

Fuchsin und Safranin dar (Abb. 4-2). Azofarben spielen wegen des gesetzlichen Anwendungsverbots von Farbstoffen, die u.a. *o*-Toluidin freisetzen, kaum noch eine Rolle [10]. Dafür erschließen sich neue Umweltquellen durch die vermehrte Anwendung von Polymeren aus *o*-Toluidin allein (Abb. 4-2) oder in Kombination mit anderen monocyclischen Aminen als „intrinsisch leitfähige Polymere“, die wegen ihrer metallischen Eigenschaften auch als „organische Metalle“ bezeichnet werden. Diese Polymere finden Anwendung in der Endbeschichtung von Leiterplatten und im Korrosionsschutz. In den zahlreichen Publikationen zur Synthese und Eigenschaften von *o*-Toluidin-enthaltenden Polymeren wird auf das kanzerogene Potenzial von *o*-Toluidin nicht eingegangen [132-134].

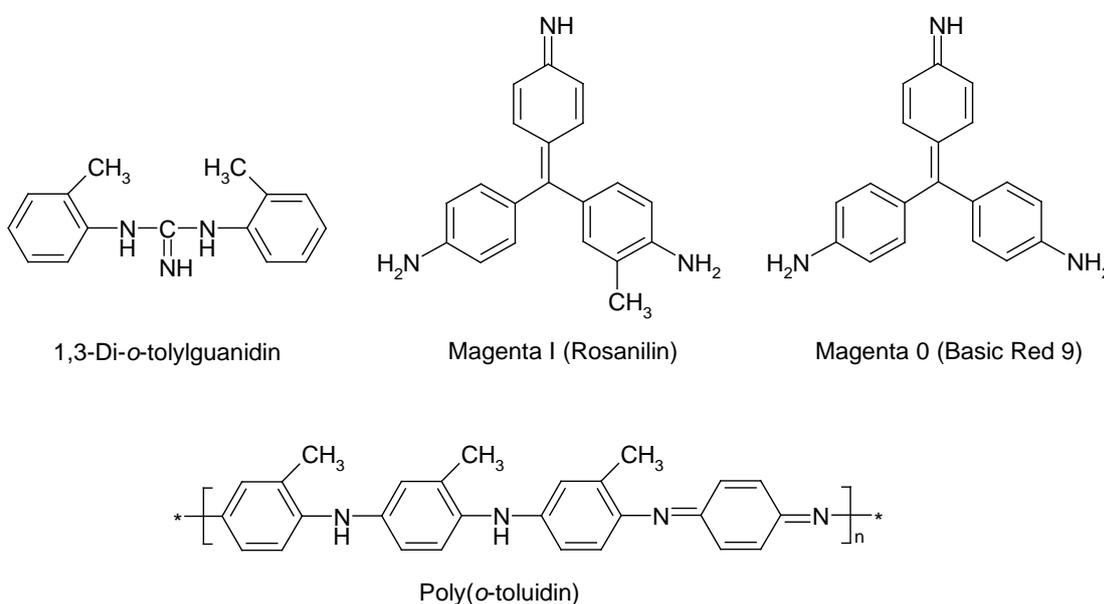


Abb. 4-2: Quellen für eine Umweltbelastung mit *o*-Toluidin

Die hohe Hintergrundbelastung führte bei der Analyse der DNA-Addukte zu unvermeidlichen Blindwerten. Die Festlegung, dass nur Messwerte, die doppelt so hoch waren wie die jeweiligen Tagesblindwerte als sicher nachgewiesen anzusehen sind, führte dazu, dass bei dem Sektionsmaterial nur in 13 bzw. 10 von 46 untersuchten epithelialen und subepithelialen Geweben *o*-Toluidin-freisetzende DNA-Addukte nachweisbar waren. Wegen der signifikant höheren Belastung mit diesen Addukten im Tumorgewebe war dagegen in 11 der 12 Proben ein positiver Nachweis möglich. Bei Anlegung einer höheren Anforderung, Überschreiten des Tagesblindwerts um das Dreifache, hätten nur noch 3 bzw. 5 der epithelialen und subepithelialen Gewebe nachweisbare *o*-Toluidin-freisetzende DNA-Addukte. In den 11 positiven Tumorgeweben, deren Werte den Tagesblindwert im Mittel 4,5-fach (minimal 3,2-fach, maximal 8,4-fach) überstiegen, wäre dagegen der Nachweis immer noch positiv.

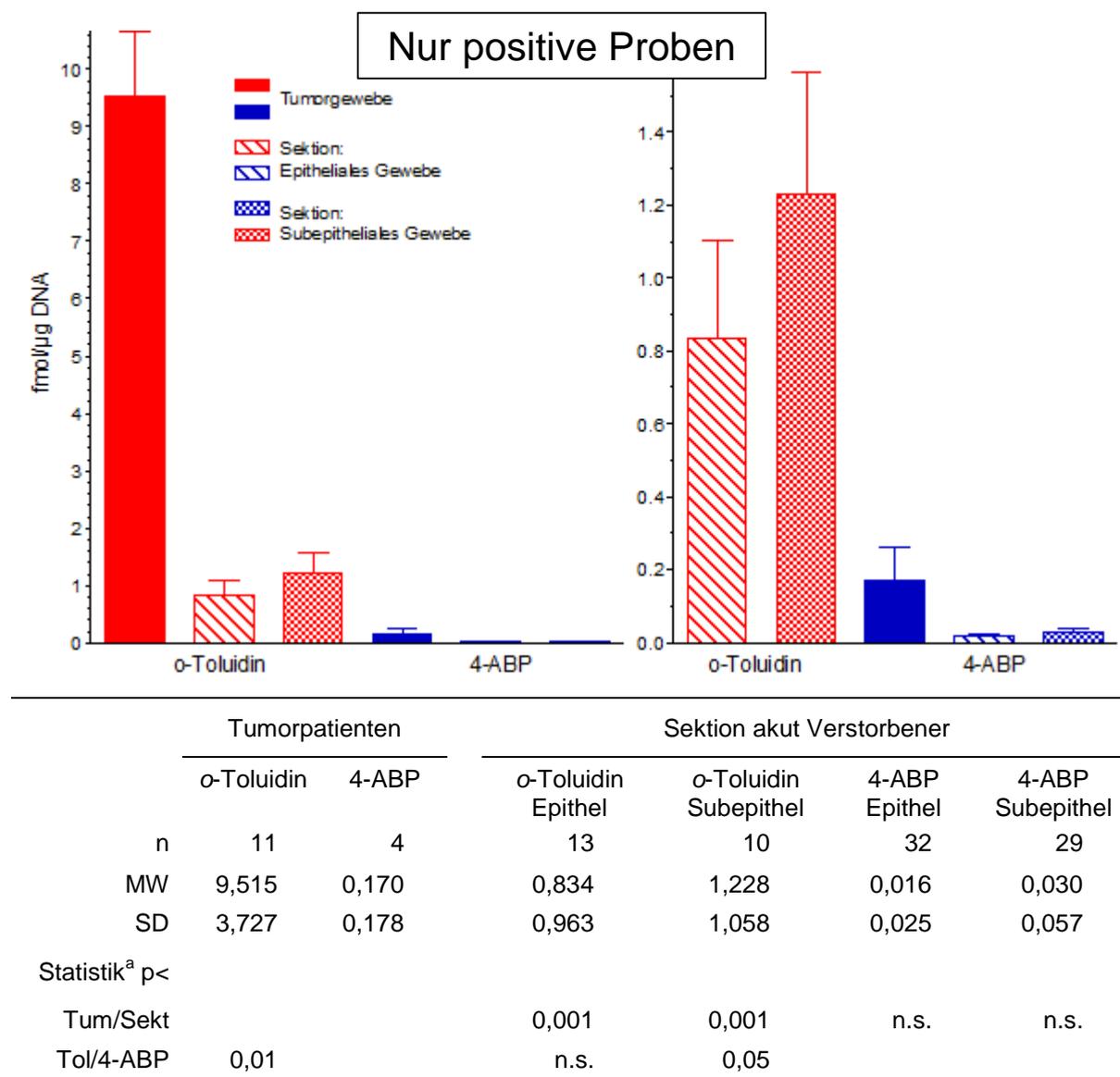
4.3 Einflussfaktoren auf *o*-Toluidin- und 4-ABP-freisetzende DNA-Addukte

Die mit Abstand höchsten Adduktkonzentrationen wurden für *o*-Toluidin im Tumorgewebe von Patienten mit Harnblasenkrebs gefunden. Der mehr als 30-fache Unterschied zu den Mittelwerten im epithelialen und subepithelialen Gewebe von akut Verstorbenen aus der Rechtsmedizin war hoch signifikant ($p < 0,001$). Allerdings lagen in vielen Geweben, die bei den Sektionen gewonnen wurden, die Messwerte unterhalb des Zweifachen des Tagesblindwerts und gingen deshalb als Nullwerte in die Berechnung ein. Berücksichtigt man nur die positiven Proben (Abb. 4-3), dann verringern sich die Unterschiede zwischen dem Tumorgewebe und den epithelialen bzw. subepithelialen Geweben der Sektionen von 37-fach bzw. 33-fach auf 11- bzw. 8-fach, bleiben aber hoch signifikant ($p < 0,001$). Bei 4-ABP waren im Tumorgewebe nur 4 von 12 Proben mehr als zweifach über dem Tagesblindwert. Berücksichtigt man auch bei 4-ABP nur die positiven Proben, dann akzentuieren sich die Unterschiede zwischen dem Tumorgewebe und epithelialem bzw. subepithelialen Gewebe, die nun ebenfalls Signifikanz erreichen ($p < 0,01$) und von 5- bzw. 3-fach auf 11- bzw. 6-fach ansteigen.

Obwohl der Anteil der Raucher bei Tumorpatienten wie akut Verstorbenen mit 41% gleich war, ist nicht auszuschließen, dass Faktoren, die nachweislich Einfluss auf die Höhe der 4-ABP-freisetzenden Hb-Addukte haben, wie die Intensität des Rauchens und Unterschiede in den Spezifikationen der benutzten Rauchwaren [5,33], auch die Konzentrationen von 4-ABP-freisetzenden Addukten beeinflusst haben. Die Unterschiede bei 4-ABP könnten deshalb nicht nur rein zufällig sein, sondern auch auf einem unterschiedlichen Einfluss des Rauchens beruhen. Anhand der Bestimmung von Hb-Addukten wurden auch verschiedene genetischen Polymorphismen des Fremdstoffwechsels als Modulatoren dingfest gemacht. Neben der NAT2 waren das auch CYP 1A2, CYP 1B1 und die Glutathion *S*-Transferase M1 [33,34,135-140].

Für Addukte von *o*-Toluidin liegen keine Daten zum Einfluss von genetischen Polymorphismen vor. Untersuchungen mit humanen Enzymen *in vitro* zeigten im Vergleich zu 4-ABP einen Dreifach geringeren Umsatz von *o*-Toluidin durch die NAT2 und praktisch keinen Umsatz von *o*-Toluidin durch die NAT1 [141]. In Ratten erhöhte die Vorbehandlung mit Phenobarbital, aber nicht β -Naphthoflavon die Bildung von Hb-Addukten nach Gabe von *o*-Toluidin [37]; ein Hinweis, dass zumindest bei diesem Versuchstier nicht Enzyme der CYP 1-Familie, sondern der CYP 2-Familie eine wichtige Rolle bei der metabolischen Aktivierung von *o*-Toluidin spielen. Für die großen Unterschiede zwischen Tumorgewebe und Geweben, die bei den Sektionen erhalten wurden, könnte aber auch eine Aktivierung von *o*-Toluidin durch

Peroxidasen und Cyclooxygenasen im Tumorgewebe verantwortlich sein. Für ein nahe verwandtes monocyclisches aromatisches Amin, das *o*-Anisidin, konnte die Arbeitsgruppe von Stiborova zeigen, dass diese Enzyme eine wichtige Rolle bei der metabolischen Aktivierung dieses Amins spielen [142,143]. Die Beobachtung von Bayraktar et al. [144], dass im Tumorgewebe von Harnblasenkrebpatienten mehr freie Radikale, gemessen anhand von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARs), gebildet werden, als im umgebenden tumorfreien Gewebe und in Gewebe von Kontrollen ohne Krebserkrankung, könnte bedeuten, dass im Tumorgewebe auch die Bildung von DNA-Addukten von *o*-Toluidin erhöht ist.



^a Mann-Whitney-Test auf Unterschiede zwischen gleichen Geweben

Abb. 4-3: *o*-Toluidin und 4-ABP abspaltende DNA-Addukte unter ausschließlicher Berücksichtigung positiver Proben in Tumorgewebe von Patienten mit Harnblasenkrebs aus Regensburg und in epithelialem und subepithelialem Harnblasengewebe von Sektionen aus der Rechtsmedizin (links) und in vergrößertem Maßstab ohne *o*-Toluidin im Tumorgewebe (rechts); fmol/µg DNA, MW ± SE

Eine Behandlung mit Prilocain-haltigen Therapeutika als Ursache für die erhöhten *o*-Toluidin-freisetzenden DNA-Addukte konnte bei den Tumorpatienten mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Angesichts des in der vorliegenden Arbeit gezeigten genotoxischen Potenzials von *o*-Toluidin für den Menschen, sollte auf die therapeutische Anwendung von Prilocain jedoch so weit als möglich verzichtet werden. Dies gilt ganz besonders für die hohen Dosierungen, die bei der Liposuktion zur Anwendung kommen [15,145,146], und für wiederholte Anwendungen wie bei der Behandlung der Ejaculatio praecox [147-150]. Schließlich sollte auch bei Kindern eine unkritische häufige Verwendung von EMLA[®]-Creme oder EMLA[®]-Pflastern, die auch als „Zauberpflaster“ beworben werden, überdacht werden, zumal es durchaus alternative Therapeutika ohne Prilocain gibt [151].

5 Zusammenfassung

Bereits wenige Jahrzehnte nach Beginn der industriellen Produktion von Farben auf der Basis von Anilin wurden aromatische Amine mit der Entstehung von Harnblasenkrebs in Verbindung gebracht. Zunächst konzentrierte sich die Aufmerksamkeit auf bicyclische aromatische Amine wie das 4-Aminobiphenyl. Neuerdings werden auch monocyclische aromatische Amine und hier besonders das *o*-Toluidin für Harnblasenkrebs am Arbeitsplatz verantwortlich gemacht. Im Gegensatz zu 4-Aminobiphenyl lagen aber noch keine Daten zu DNA-Addukten von *o*-Toluidin im Zielgewebe vor.

Für den gleichzeitigen Nachweis der Addukte von *o*-Toluidin und 4-Aminobiphenyl wurde eine hochempfindliche Methode etabliert. Die Amine wurden durch saure Hydrolyse von der DNA abgespalten und derivatisiert, durch Kapillargaschromatographie getrennt, und durch Kopplung mit einem Quadrupolmassenspektrometer im negativ chemischen Ionisationsmodus verifiziert und quantifiziert. Zur Sicherung des Nachweises und Korrektur eventueller Verluste während des Analysengangs, wurden deuterierte interne Standards, d_9 -*o*-Toluidin und d_5 -4-Aminobiphenyl, mitgeführt. Die Methode erwies sich als stabil und reproduzierbar, jedoch konnten Blindwerte in den gleichzeitig analysierten Proben ohne DNA nicht vermieden werden. Der Nachweis von DNA-Addukten wurde nur als gesichert betrachtet, wenn in den arbeitstäglich aufgearbeiteten Proben mehr als die doppelte Menge enthalten war als in dem Blindwert. Alle Werte, die diese Anforderung nicht erfüllten, gingen als Nullwerte in die Berechnungen ein.

Für die Bestimmung von DNA-Addukten in Harnblasengewebe standen uns 46 Proben von Sektionen akut Verstorbener aus der Rechtsmedizin in München (30 Männer, 16 Frauen, Durchschnittsalter 50,1 Jahre, 19 Raucher und 27 Nichtraucher) und von 12 Patienten mit Urothelkarzinom aus der Universitätsklinik Regensburg (11 Männer, 1 Frau, Durchschnittsalter 63 Jahre, 5 Raucher und 7 Nichtraucher) zur Verfügung. Bei den Proben der Patienten handelte es sich um überschüssiges Tumorgewebe. Das Harnblasengewebe der Sektionen wurde in epitheliale und subepitheliale Schichten getrennt aufgearbeitet. Die DNA-Extraktion erfolgte mit einem kommerziellen Kit von Invitex. Zur Überprüfung des Rauchstatus standen uns neben Angaben durch die Patienten und die Kriminalpolizei Urinproben und bei den Sektionen auch Proben von den Zehennägeln zur Verfügung, die auf die Tabakalkaloide Nicotin, Cotinin und Myosmin untersucht wurden.

o-Toluidin-abspaltende DNA Addukte konnten in 11 der 12 Tumorproben der Patienten in einer Menge von $8,7 \pm 4,5$ fmol/ μ g DNA nachgewiesen werden, aber nur in 13 von 46 epithelia-

len Geweben ($0,24 \pm 0,63$ fmol/ μ g) und 10 von 46 subepithelialen Geweben ($0,27 \pm 0,70$ fmol/ μ g) der akut Verstorbenen. Der mehr als 30-fache Unterschied zwischen den Tumorgeweben und den Geweben von den Sektionen war hoch signifikant ($p < 0,001$).

4-Aminobiphenyl-ablesende DNA Addukte konnten dagegen nur in 4 der 12 Tumorproben ($0,057 \pm 0,125$ fmol/ μ g) nachgewiesen werden, der Unterschied zu den epithelialen (32 von 46 positiv; $0,011 \pm 0,022$ fmol/ μ g) und subepithelialen (28 von 46 positiv; $0,019 \pm 0,019$ fmol/ μ g) war deutlich geringer als bei *o*-Toluidin und erreichte keine Signifikanz. Die Belastung der Tumorgewebe mit *o*-Toluidin-ablesenden DNA Addukten war mehr als 150-fach höher als jene mit 4-Aminobiphenyl ($p < 0,001$). Auch in den Geweben der Sektionen ist 15- bis 20-mal mehr *o*-Toluidin als 4-Aminobiphenyl vorhanden, die Unterschiede erreichen aber nur im subepithelialen Gewebe Signifikanz ($p < 0,05$).

Der Rauchstatus hatte keinen Einfluss auf die Höhe der DNA-Addukte. Bei den akut Verstorbenen zeigt sich auch keine Abhängigkeit vom Alter oder vom Zeitraum zwischen Todeseintritt und Sektion, der im Mittel 32 Stunden und maximal 72 Stunden betrug.

Der erstmals geführte Nachweis von DNA-Addukten von *o*-Toluidin in humanem Harnblasengewebe bestätigt, dass dieses monocyclische aromatische Amin, ebenso wie 4-Aminobiphenyl und andere bicyclische aromatische Amine, über einen genotoxischen Mechanismus wirkt, und für Harnblasenkrebs beim Menschen verantwortlich sein kann. Es muss deshalb dringend darauf hingewirkt werden, dass die Belastung des Menschen mit *o*-Toluidin am Arbeitsplatz, in der Umwelt und nicht zuletzt durch Behandlung mit dem Lokalanästhetikum Prilocain so gering wie möglich gehalten wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Becker N Wahrendorf J (2010) Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990 (mit jährlichem Update in www.krebsatlas.de). Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag
2. Husmann G Kaatsch P Katalinic A Bertz J Kraywinkel K Wolf U (2010) Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. <http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2010.html>
3. Golka K Goebell PJ Rettenmeier AW (2007) Ätiologie und Prävention des Harnblasenkarzinoms. Teil 1 der Serie zum Harnblasenkarzinom. Dtsch.Arztebl. 104:A719-A723
4. IARC (2004) Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. in: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; ed.: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Vol. 83:1-1452; IARC, Lyon, France
5. 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
6. Rehn L (1895) Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern. Arch.Klin.Chir. 50:588-600
7. 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, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine. Br.J.Ind.Med. 11:75-104
8. IARC (2010) Agents Classified by the *IARC Monographs*, Volumes 1-100; last update: 30 Aug 2010 <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
9. Deutsche Forschungsgemeinschaft (2010) MAK- und BAT-Wert-Liste. Mitteilung 46 der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe vom 1. Juli 2010; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, D-69451 Weinheim, Germany
10. Schwegler U Roscher E Schramek N Wanninger G Fromme H Siegl T (2006) Literaturstudie zu möglichen Expositionspfaden, zum kanzerogenen Potential und zu Ergebnissen von Humanbiomonitoring-Untersuchungen bei Arcylamid und aromatischen Aminen im Rahmen einer bayerischen Studie. 91058 Erlangen. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. Band 14. Materialien zur Umweltmedizin. <http://www.lgl.bayern.de/publikationen/index.htm>
11. Nohynek GJ Kemper FH Corbett JF Sharma RK Dressler WE (2004) Kosmetische Produkte und Inhaltsstoffe. in: Lehrbuch der Toxikologie; Ch. 37 pp 959-980; eds: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH

12. Richter E Pfau W (2004) Aromatische Amine, Nitroaromaten und heterozyklische Amine. in: Lehrbuch der Toxikologie; Ch. 29 pp 731-745; eds: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
13. Luceri F Pieraccini G Moneti G Dolara P (1993) Primary aromatic amines from side-stream cigarette smoke are common contaminants of indoor air. *Toxicol.Ind.Health* 9:405-413
14. IFOP (2001) Azofarbstoffe, die in krebserzeugende Amine gemäß TRGS 614 (Ausgabe März 2001) spalten können
http://www.vci.de/template_downloads/tmp_VCIInternet/115196AzoTR614.pdf?DokNr=115196&p=101
15. Lindenblatt N Belusa L Tiefenbach B Schareck W Olbrisch RR (2004) Prilocaine plasma levels and methemoglobinemia in patients undergoing tumescent liposuction involving less than 2,000 ml. *Aesth.Plast.Surg.* 28:435-440
16. Anon (2005) Gebrauchsinformation EMLA[®] Pflaster
http://www2.multimedica.de/public/ext/astrazeneca/gebrauchsinfo/108_01.pdf
17. Anon (2005) Gebrauchsinformation Emla[®] (Creme)
http://www2.multimedica.de/public/ext/astrazeneca/gebrauchsinfo/108_02.pdf
18. Dinsmore WW Hackett G Goldmeier D Waldinger M Dean J Wright P Callander M Wylie K Novak C Keywood C Heath P Wyllie M (2007) Topical eutectic mixture for premature ejaculation (TEMPE): a novel aerosol-delivery form of lidocaine-prilocaine for treating premature ejaculation. *BJU Int.* 99:369-375
19. 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.(Copenh)* 24:389-403
20. Deichmann WB Kitzmiller KV Dierker M Witherup S (1947) Observations on the effects of diphenyl, ortho-aminodiphenyl and para-aminodiphenyl, ortho-nitrodiphenyl and para-nitrodiphenyl and dihydroxyoctachlorodiphenyl upon experimental animals. *J.Ind.Hyg.Toxicol.* 29:1-13
21. Anon (1986) o-Toluidin, -Hydrochlorid. in: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten; pp 1-12; ed.: Greim H, D-69451 Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH
22. 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
23. Vasters FG Eberhart LHJ Koch T Kranke P Wulf H Morin AM (2006) Risk factors for prilocaine-induced methaemoglobinaemia following peripheral regional anaesthesia. *Eur.J.Anaesthesiol.* 23:760-765
24. Weiss T Käfferlein HU Angerer J Brüning T (2004) Berufliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen - Nutzen des Biological Monitoring als Instrument zur Primärprävention von Arbeitnehmern. BGFA-Info03/2004.
<http://www.bgfa.ruhr-uni-bochum.de/publik/info0304/amine.php>

25. Anon (2005) *o*-Toluidine and *o*-toluidine hydrochloride. Report on carcinogens: carcinogen profiles / U.S.Dept.of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program 11
26. Fichtl B Eichelbaum M Schwab M (2005) Elimination von Pharmaka durch Metabolismus. in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Ch. 1 pp 47-56; eds: Aktories K Förstermann U Hofmann F Starke K; München, Jena, Urban & Fischer Verlag
27. Lang NP Kadlubar FF (1991) Aromatic and heterocyclic amine metabolism and phenotyping in humans. *New Horizons Biol.Dosimetry* 372:33-47
28. Eichelbaum M Schwab M (2009) Wirkungen des Organismus auf Pharmaka: Allgemeine Pharmakokinetik. in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Ch. 1 pp 36-64; eds: Aktories K Förstermann U Hofmann F Starke K; München, Urban & Fischer Verlag
29. Hein DW (2002) Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat.Res.* 506-507:65-77
30. Son OS Everett DW Fiala ES (1980) Metabolism of *o*-[methyl-¹⁴C]toluidine in the F344 rat. *Xenobiotica* 10:457-468
31. Kim D Guengerich FP (2005) Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 45:27-49
32. Faber MS Fuhr U (2004) Time response of cytochrome P450 1A2 activity on cessation of heavy smoking. *Clin.Pharmacol.Ther.* 76:178-184
33. 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
34. Probst-Hensch NM Bell DA Watson MA Skipper PL Tannenbaum SR Chan KK Ross RK Yu MC (2000) *N*-acetyltransferase 2 phenotype but not *NAT1*10* genotype affects aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 9:619-623
35. Skipper PL Kim MY Sun H-LP Wogan GN Tannenbaum SR (2010) Monocyclic aromatic amines as potential human carcinogens: old is new again. *Carcinogenesis* 31:50-58
36. Gaber K Harréus UA Matthias C Kleinsasser NH Richter E (2007) Hemoglobin adducts of the human bladder carcinogen *o*-toluidine after treatment with the local anesthetic prilocaine. *Toxicology* 229:157-164
37. 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

38. Marquardt H Pfau W (2004) Chemische Kanzerogenese. in: Lehrbuch der Toxikologie; Ch. 8 pp 157-193; eds: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
39. Somogyi A Appel KE Gundert-Remy U (2004) Regulatorische Toxikologie. in: Lehrbuch der Toxikologie; Ch. 47 pp 1169-1195; eds: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
40. Bader M Lichtnecker H (2004) Umweltmedizinische Leitlinie Human-Biomonitoring. Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. (DGAUM). http://www.dgaum.de/images/stories/pdf/LL_U_%20Humanbiomonitoring.pdf
41. Neumann H-G (2004) Biomonitoring. in: Lehrbuch der Toxikologie; Ch. 42 pp 1099-1113; eds: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
42. Anon (2010) Gesundheit und Umwelthygiene: HBM- und Referenzwerte (Definitionen und Tabellen). Dessau-Roßlau/Berlin, Germany. Umweltbundesamt. <http://www.umweltbundesamt.de/gesundheit/monitor/definitionen.htm#hbm>
43. Richter E Scherer G (2004) Aktives und passives Rauchen. in: Lehrbuch der Toxikologie; Ch. 35 pp 897-918; eds: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
44. Tricker AR (2006) Biomarkers derived from nicotine and its metabolites: a review. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 22:147-175
45. Hukkanen J Jacob P Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol.Rev.* 57:79-115
46. Al-Delaimy WK Stampfer MJ Manson JE Willett WC (2008) Toenail nicotine levels as predictors of coronary heart disease among women. *Am.J.Epidemiol.* 167:1342-1348
47. Klein J Koren G (1999) Hair analysis - a biological marker for passive smoking in pregnancy and childhood. *Hum.Exp.Toxicol.* 18:279-282
48. Schütte-Borkovec K Heppel CW Heling A-K Richter E (2009) Analysis of myosmine, cotinine and nicotine in human toenail, plasma and saliva. *Biomarkers* 14:278-284
49. Skipper PL Tannenbaum SR (1990) Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 11:507-518
50. Carmella SG Kagan SS Kagan M Foiles PG Palladino G Quart AM Quart E Hecht SS (1990) Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine hemoglobin adducts in snuff dippers, smokers, and nonsmokers. *Cancer Res.* 50:5438-5445
51. Falter B Kutzer C Richter E (1994) Biomonitoring of hemoglobin adducts: aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin.Investig.* 72:364-371
52. Branner B Kutzer C Zwicklenpflug W Scherer G Heller W-D Richter E (1998) Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and nonsmoking women. *Biomarkers* 3:35-47

53. Atawodi SE Lea S Nyberg F Mukeria A Constantinescu V Ahrens W Brueske-Hohlfeld I Fortes C Boffetta P Friesen MD (1998) 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-hemoglobin adducts as biomarkers of exposure to tobacco smoke: validation of a method to be used in multicenter studies. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 7:817-821
54. Richter E Branner B (2002) Biomonitoring of exposure to aromatic amines: haemoglobin adducts in humans. *J.Chromatogr.B* 778:49-62
55. Beach AC Gupta RC (1992) Human biomonitoring and the ^{32}P -postlabeling assay. *Carcinogenesis* 13:1053-1074
56. Kaderlik KR Kadlubar FF (1995) Metabolic polymorphisms and carcinogen-DNA adduct formation in human populations. *Pharmacogenetics* 5:S108-S117
57. Hemminki K Koskinen M Rajaniemi H Zhao C (2000) Dna adducts, mutations, and cancer 2000. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 32:264-275
58. Zayas B Stillwell SW Wishnok JS Trudel LJ Skipper P Yu MC Tannenbaum SR Wogan GN (2007) Detection and quantification of 4-ABP adducts in DNA from bladder cancer patients. *Carcinogenesis* 28:342-349
59. Pottenger LH Penman M Moore NP Priston RAJ Thomas M (2004) Biological significance of DNA adducts: summary of discussion of expert panel. *Regul.Toxicol. Pharmacol.* 39:403-408
60. Jankowiak R Ariese F Hewer A Luch A Zamzow D Hughes NC Phillips D Seidel A Platt K-L Oesch F Small GJ (1998) Structure, conformations, and repair of DNA adducts from dibenzo[*a,l*]pyrene: ^{32}P -postlabeling and fluorescence studies. *Chem.Res.Toxicol.* 11:674-685
61. Godschalk RWL Vermeer ITM Kriek E Floot B Schilderman PAEL Moonen EJC Kleinjans JCS van Schooten F-J (1997) Comparison of ^{32}P -postlabeling and HPLC-FD analysis of DNA adducts in rats acutely exposed to benzo(a)pyrene. *Chem.Biol.Interact.* 104:41-54
62. 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
63. 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
64. Poirier MC (2004) Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat.Rev.Cancer* 4:630-637
65. Garner RC (1998) The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. *Mutat.Res.* 402:67-75
66. Randerath K Reddy MV Gupta RC (1981) ^{32}P -Labeling test for DNA damage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 78:6126-6129

67. Gupta RC (1996) ^{32}P -Postlabeling for detection of DNA adducts. in: Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations; Ch. 4 pp 45-61; ed.: Pfeifer GP, New York, Plenum Press
68. Eriksson HL Zeisig M Ekström L-G Möller L (2004) ^{32}P -postlabeling of DNA adducts arising from complex mixtures: HPLC versus TLC separation applied to adducts from petroleum products. Arch.Toxicol. 78:174-181
69. Schmitz O Richter E (2000) Capillary zone electrophoresis with on-line blotting for separation and detection of ^{32}P -postlabeled DNA adducts. Biomarkers 5:314-321
70. Möller L Grzybowska E Zeisig M Cimander B Hemminki K Chorazy M (1996) Seasonal variation of DNA adduct pattern in human lymphocytes analyzed by ^{32}P -HPLC. Carcinogenesis 17:61-66
71. Heppel CW Heling A-K Richter E (2009) Ultrasensitive method for the determination of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts by gas chromatography-high resolution mass spectrometry in mucosal biopsies of the lower esophagus. Anal.Bioanal.Chem. 393:1525-1530
72. Koc H Swenberg JA (2002) Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. J.Chromatogr.B 778:323-343
73. 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
74. Randall KL Argoti D Paonessa JD Ding Y Oaks Z Zhang Y Vouros P (2010) An improved liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of 4-aminobiphenyl DNA adducts in urinary bladder cells and tissues. J.Chromatogr.A 1217:4135-4143
75. Lin D 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
76. 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
77. Culp SJ Roberts DW Talaska G Lang NP Fu PF Lay JO Teitel CH Snawder JE von Tungeln LS Kadlubar FF (1997) Immunochemical, ^{32}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
78. 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

79. Richter E Gaber K Harréus UA Matthias C Kleinsasser NH (2006) *o*-Toluidine adducts in human bladder DNA and hemoglobin by the local anesthetic prilocaine. *Toxicol.Lett.* 164:S255
80. Bessette EE Goodenough AK Langouët S Yasa I Kozekov ID Spivack SD Turesky RJ (2009) Screening for DNA adducts by data-dependent constant neutral loss-triple stage mass spectrometry with a linear quadrupole ion trap mass spectrometer. *Anal.Chem.* 81:809-819
81. Wilson VL Weston A Manchester DK Trivers GE Roberts DW Kadlubar FF Wild CP Montesano R Willey JC Mann DL Harris CC (1989) Alkyl and aryl carcinogen adducts detected in human peripheral lung. *Carcinogenesis* 10:2149-2153
82. Mooney LA Santella RM Covey L Jeffrey AM Bigbee W Randall MC Cooper TB Ottman R Tsai W-Y Wazneh L Glassman AH Young T-L Perera FP (1995) Decline of DNA damage and other biomarkers in peripheral blood following smoking cessation. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 4:627-634
83. Hsu T-M Zhang Y-J Santella RM (1997) Immunoperoxidase quantitation of 4-aminobiphenyl- and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in exfoliated oral and urothelial cells of smokers and nonsmokers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 6:193-199
84. Flamini G Romano G Curigliano G Chiominto A Capelli G Boninsegna A Signorelli C Ventura L Santella RM Sgambato A Cittadini A (1998) 4-Aminobiphenyl-DNA adducts in laryngeal tissue and smoking habits: an immunohistochemical study. *Carcinogenesis* 19:353-357
85. Wang L-Y Chen C-J Zhang Y-J Tsai W-Y Lee P-H Feitelson MA Lee C-S Santella RM (1998) 4-Aminobiphenyl DNA damage in liver tissue of hepatocellular carcinoma patients and controls. *Am.J.Epidemiol.* 147:315-323
86. Romano G Garagnani L Boninsegna A Ferrari P Flamini G De Gaetani C Sgambato A Giovanni F Curigliano G Ferretti G Cittadini A Trentini G (1999) Analysis of 4-ABP-DNA adducts and p53 alterations in urinary bladder carcinoma. *Anticancer Res.* 19:4571-4576
87. Nia AB van Straaten HWM Kleinjans JCS van Schooten FJ (2000) Immunoperoxidase detection of 4-aminobiphenyl- and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adducts in induced sputum of smokers and non-smokers. *Mutat.Res.* 468:125-135
88. Faraglia B Chen SY Gammon MD Zhang YJ Teitelbaum SL Neugut AI Ahsan H Garbowski GC Hibshoosh H Lin D Kadlubar FF Santella RM (2003) Evaluation of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in human breast cancer: the influence of tobacco smoke. *Carcinogenesis* 24:719-725
89. Talaska G Schamer M Casetta G Tizzani A Vineis P (1994) Carcinogen-DNA adducts in bladder biopsies and urothelial cells: a risk assessment exercise. *Cancer Lett.* 84:93-97
90. Stone JG Jones NJ McGregor AD Waters R (1995) Development of a human biomonitoring assay using buccal mucosa: comparison of smoking-related DNA adducts in mucosa *versus* biopsies. *Cancer Res.* 55:1267-1270

91. Rothman N Hayes RB Zenser TV DeMarini DM Bi W Hirvonen A Talaska G Bhatnagar VK Caporaso NE Brooks LR Lakshmi VM Feng P Kashyap SK You X Eischen BT Kashyap R Shelton ML Hsu FF Jaeger M Parikh DJ Davis BB Yin S Bell DA (1996) The glutathione *S*-transferase M1 (*GSTM1*) null genotype and benzidine-associated bladder cancer, urine mutagenicity, and exfoliated urothelial cell DNA adducts. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 5:979-983
92. Rothman N Bhatnagar VK Hayes RB Zenser TV Kashyap SK Butler MA Bell DA Lakshmi V Jaeger M Kashyap R Hirvonen A Schulte PA Dosemeci M Hsu F Parikh DJ Davis BB Talaska G (1996) The impact of interindividual variation in NAT2 activity on benzidine urinary metabolites and urothelial DNA adducts in exposed workers. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:5084-5089
93. Vineis P Talaska G Malaveille C Bartsch H Martone T Sithisarankul P Strickland P (1996) DNA adducts in urothelial cells: relationship with biomarkers of exposure to arylamines and polycyclic aromatic hydrocarbons from tobacco smoke. *Int.J.Cancer* 65:314-316
94. Zhou Q Talaska G Jaeger M Bhatnagar VK Hayes RB Zenser TV Kashyap SK Lakshmi VM Kashyap R Dosemeci M Hsu FF Parikh DJ Davis B Rothman N (1997) Benzidine-DNA adduct levels in human peripheral white blood cells significantly correlate with levels in exfoliated urothelial cells. *Mutat.Res.* 393:199-205
95. Thompson PA Seyedi F Lang NP MacLeod SL Wogan GN Anderson KE Tang Y-M Coles B Kadlubar FF (1999) Comparison of DNA adduct levels associated with exogenous and endogenous exposures in human pancreas in relation to metabolic genotype. *Mutat.Res.* 424:263-274
96. Thompson PA DeMarini D Kadlubar FF McClure GY Brooks LR Green BL Fares MY Stone A Joseph PD Ambrosone CB (2002) Evidence for the presence of mutagenic arylamines in human breast milk and DNA adducts in exfoliated breast ductal epithelial cells. *Environ.Mol.Mutagen.* 39:134-142
97. Vermeulen R Talaska G Schumann B Bos RP Rothman N Kromhout H (2002) Urothelial cell DNA adducts in rubber workers. *Environ.Mol.Mutagen.* 39:306-313
98. Talaska G Al-Zoughool M Malaveille C Fiorini L Schumann B Vietas J Peluso M Munnia A Bianchini M Allegro G Matullo G Sacerdote C Vineis P (2006) Randomized controlled trial: effects of diet on DNA damage in heavy smokers. *Mutagenesis* 21:179-183
99. Gaber K (2006) Hämoglobin- und DNA-Addukte des Humankanzerogens o-Toluidin nach Behandlung mit dem Lokalanästhetikum Prilocain. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU
100. Hölzle D Schlöbe D Tricker AR Richter E (2007) Mass spectrometric analysis of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in human lung. *Toxicology* 232:277-285
101. Lewalter J Gries W (2000) Hämoglobinaddukte aromatischer Amine: Anilin, *o*-, *m*- und *p*-Toluidin, *o*-Anisidin, *p*-Chloranilin, α - und β -Naphthylamin, 4-Aminodiphenyl, Benzidin, 4,4'-Diaminodiphenylmethan, 3,3'-Dichlorbenzidin. in: Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitlicher Arbeitsstoffe. Analysen im biologischen

- Material; pp 1-22; ed.: Greim H, D-69469 Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH
102. Anon (1994) DIN 32 645: Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin, Germany, Beuth Verlag
 103. Stepanov I Hecht SS (2005) Tobacco-specific nitrosamines and their pyridine-*N*-glucuronides in the urine of smokers and smokeless tobacco users. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14:885-891
 104. 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
 105. Hock A Schmitz O Nguyen P-T Richter E Dietzel G (1998) Improved detection of DNA adducts by ³²P-Postlabeling with on-line HPLC enrichment and blotting. *Toxicol.Lett.* 95 (Suppl. 1):44
 106. Hock A (1998) Humanbiomonitoring von DNA-Addukten durch ³²P-Postlabelling: Methodenentwicklung für DC und HPLC. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
 107. Nguyen P-T Specht A Schwaiger U Richter E (1996) Improved determination of aromatic amine DNA adducts by ³²P-postlabeling with HPLC enrichment and blotting. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 353 (Suppl.):R135
 108. Duan J-D Jeffrey AM Williams GM (2008) Assessment of the medicines lidocaine, prilocaine and their metabolites, 2,6-dimethylaniline and 2-methylaniline, for DNA adduct formation in rat tissues. *Drug Metab.Dispos.* 36:1470-1475
 109. Branner B (1995) Hämoglobin-Addukte aromatischer Amine beim Menschen: Abhängigkeit von Tabakrauch und anderen Umweltquellen. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
 110. Schlöbe D (2003) Entwicklung einer GC/MS-Analysenmethode zur Bestimmung von 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon-abspaltenden DNA-Addukten für die Untersuchung der endogenen Nitrosierung von Myosmin bei Ratten. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
 111. Marques MM Mourato LLG Santos MA Beland FA (1996) Synthesis, characterization, and conformational analysis of DNA adducts from methylated anilines present in tobacco smoke. *Chem.Res.Toxicol.* 9:99-108
 112. Branco PS Antunes AMM Marques MM Chiarelli MP Lobo AM Prabhakar S (1999) New syntheses of DNA adducts from methylated anilines present in tobacco smoke. *Chem.Res.Toxicol.* 12:1223-1233
 113. Bessette EE Spivack SD Goodenough AK Wang T Pinto S Kadlubar FF Turesky RJ (2010) Identification of carcinogen DNA adducts in human saliva by linear quadrupole ion trap/multistage tandem mass spectrometry. *Chem.Res.Toxicol.* 23:1234-1244

114. Nauwelaers G Bessette EE Gu D Tang Y Rageul J Fessard V Yuan J-M Yu MC Langouët S Turesky RJ (2011) DNA Adduct formation of 4-aminobiphenyl and heterocyclic aromatic amines in human hepatocytes. *Chem.Res.Toxicol.* 24:913-925
115. Bakthavachalam J Abdel-Baky S Giese RW (1991) Release of 2-aminofluorene from N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorene by hydrazinolysis. *J.Chromatogr.* 538:447-451
116. Haglund J Henderson AP Golding BT Törnqvist M (2002) Evidence for phosphate adducts in DNA from mice treated with 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Chem.Res.Toxicol.* 15:773-779
117. Lao Y Yu N Kassie F Villalta PW Hecht SS (2007) Formation and accumulation of pyridyloxobutyl DNA adducts in F344 rats chronically treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of its metabolite, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chem.Res.Toxicol.* 20:235-245
118. Lao Y Yu N Kassie F Villalta PW Hecht SS (2007) Analysis of pyridyloxobutyl DNA adducts in F344 rats chronically treated with (*R*)- and (*S*)-*N'*-nitrososornicotine. *Chem.Res.Toxicol.* 20:246-256
119. 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
120. Richter E Rösler S Becker A (2000) Effect of diet on haemoglobin adducts from 4-aminobiphenyl in rats. *Arch.Toxicol.* 74:203-206
121. OECD (2004) SIDS initial assessment report, o-toluidine
<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/oecdsids/95534.pdf>
122. Neurath GB Dünger M Pein FG Ambrosius D Schreiber O (1977) Primary and secondary amines in the human environment. *Food Cosmet.Toxicol.* 15:275-282
123. Tomkins BA Ho C-H (1982) Determination of polycyclic aromatic amines in natural and synthetic crudes. *Anal.Chem.* 54:91-96
124. 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
125. Sutthivaiyakit P Achatz S Lintelmann J Aungpradit T Chanwirat R Chumanee S Kettrup A (2005) LC-MS/MS method for the confirmatory determination of aromatic amines and its application in textile analysis. *Anal.Bioanal.Chem.* 381:268-276
126. Lichtenstein N Quellmalz K Bernards M (2009) Freisetzung aromatischer Amine aus Rohteerproben bei Temperaturen von 220 bis 240 °C [Release of aromatic amines from crude tar samples at temperatures of 220 to 240 °C]. *Gefahrstoffe - Reinhalt.Luft* 69:377-380
127. Kütting B Göen T Schwegler U Fromme H Uter W Angerer J Drexler H (2009) Monoarylamines in the general population - A cross-sectional population-based study including 1004 Bavarian subjects. *Int.J.Hyg. Environ.Health* 212:298-309

128. 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
129. Ward E Carpenter A Markowitz S Roberts D Halperin W (1991) Excess number of bladder cancers in workers exposed to ortho-toluidine and aniline. *J.Natl.Cancer Inst.* 83:501-506
130. 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
131. Carréon T Hein MJ Viet SM Hanley KW Ruder AM Ward EM (2010) Increased bladder cancer risk among workers exposed to o-toluidine and aniline: a reanalysis. *Occup.Environ.Med.* 67:348-350
132. Bavastrello V Carrara S Ram MK Nicolini C (2004) Optical and electrochemical properties of poly(*o*-toluidine) multiwalled carbon nanotubes composite Langmuir-Schaefer films. *Langmuir* 20:969-973
133. Elmansouri A Outzourhit A Lachkar A Hadik N Abouelaoualim A Achour ME Oueriagli A Ameziane EL (2009) Influence of the counter ion on the properties of poly(*o*-toluidine) thin films and their Schottky diodes. *Synth.Met.* 159:292-297
134. Yalçinkaya S Tüken T Yazici B Erbil M (2010) Electrochemical synthesis and corrosion behaviour of poly (pyrrole-*co*-*o*-anisidine-*co*-*o*-toluidine). *Curr.Appl.Phys.* 10:783-789
135. Ketelslegers HB Godschalk RWL Eskens BJM Dallinga JW Gottschalk RWH van Schooten FJ van Delft JHM Kleinjans JCS (2009) Potential role of cytochrome P450-1B1 in the metabolic activation of 4-aminobiphenyl in humans. *Mol.Carcinog.* 48:685-691
136. Ozawa S Katoh T Inatomi H Imai H Kuroda Y Ichiba M Ohno Y (2002) Association of genotypes of carcinogen-activating enzymes, phenol sulfotransferase *SULT1A1* (*ST1A3*) and arylamine *N*-acetyltransferase *NAT2*, with urothelial cancer in a Japanese population. *Int.J.Cancer* 102:418-421
137. Sarkar M Stabbert R Kinser RD Oey J Rustemeier K von Holt K Schepers G Walk RA Roethig HJ (2006) *CYP1A2* and *NAT2* phenotyping and 3-aminobiphenyl and 4-aminobiphenyl hemoglobin adduct levels in smokers and non-smokers. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 213:198-206
138. 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
139. Yu MC Ross RK Chan KK Henderson BE Skipper PL Tannenbaum SR Coetzee GA (1995) Glutathione *S*-transferase *M1* genotype affects aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels in white, black, and Asian smokers and nonsmokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4:861-864

140. Yuan J-M Chan KK Coetzee GA Castela JE Watson MA Bell DA Wang R Yu MC (2008) Genetic determinants in the metabolism of bladder carcinogens in relation to risk of bladder cancer. *Carcinogenesis* 29:1386-1393
141. Hein DW Doll MA Rustan TD Gray K Feng Y Ferguson RJ Grant DM (1993) Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* 14:1633-1638
142. Stiborova M Miksanova M Havlicek V Schmeiser HH Frei E (2002) Mechanism of peroxidase-mediated oxidation of carcinogenic *o*-anisidine and its binding to DNA. *Mutat.Res.* 500:49-66
143. Stiborova M Schmeiser HH Breuer A Frei E (2001) Evidence for activation of carcinogenic *o*-anisidine by prostaglandin H synthase: ³²P-postlabelling analysis of DNA adduct formation. *Gen.Physiol.Biophys.* 20:267-279
144. Bayraktar N Kilic S Bayraktar MR Aksoy N (2010) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in cancerous bladder tissue and their relation with bacterial infection: a controlled clinical study. *J.Clin.Lab Anal.* 24:25-30
145. Beck-Schimmer B Pasch T (2002) Tumescenz-Lokalanästhesie. *Anästhesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 37:84-88
146. Lehnhardt M Homann HH Druecke D Steinstraesser L Steinau HU (2003) Liposuktion - kein Problem? *Chirurg* 74:808-814
147. Dinsmore WW Wyllie MG (2009) PSD502 improves ejaculatory latency, control and sexual satisfaction when applied topically 5 min before intercourse in men with premature ejaculation: results of a phase III, multicentre, double-blind, placebo-controlled study. *BJU Int.* 103:940-949
148. Hellstrom WJG (2011) Update on treatments for premature ejaculation. *Int.J.Clin.Pract.* 65:16-26
149. Henry R Morales A Wyllie MG (2008) TEMPE: topical eutectic-like mixture for premature ejaculation. *Expert Opin.Drug Deliv.* 5:251-261
150. McMahon CG (2009) Anesthetic spray improves premature ejaculation. *Nat.Rev.Urol.* 6:472-473
151. Eidelman A Weiss JM Lau J Carr DB (2005) Topical anesthetics for dermal instrumentation: a systematic review of randomized, controlled trials. *Ann.Emerg.Med.* 46:343-35

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der LMU München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Richter angefertigt.

Ihm danke ich für die Überlassung des Themas, ganz besonders danke ich ihm aber für das große Vertrauen, das er in mich setzte, und den damit verbundenen Freiheiten, die er mir gewährte. Ihm danke ich auch für seine allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und seine grenzenlose Geduld bei der Korrektur meiner Arbeit, auch nachdem er sich bereits in Pension befand.

Herrn Prof. Dr. Gudermann danke ich als Vorstand des Walther-Straub-Instituts für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Den Herren Dr. Zwickenpflug, Dr. Stefan Tyroller und Dr. Christof Hoegg danke ich für die humorvollen Pauseneinlagen und Gespräche während meiner praktischen Tätigkeit.

Weiter bedanken möchte ich mich im Arbeitskreis bei Oehli, die mich zum Schluss bei einigen Laborarbeiten tatkräftig unterstützt hat und mich als Reporterin, ob ich wollte oder nicht, stets auf dem Laufenden in allen Institutsangelegenheiten gehalten hat. Der TA Brigitte, den Doktorandinnen Anne, Katharina und Heike sowie dem Doktoranden Christopher danke ich für die Einführung und Unterstützung bei den Tätigkeiten im Labor und dem Umgang mit den Computerprogrammen.

Frau Richter danke ich für die Gastfreundlichkeit bei meinen Besprechungen im Hause von Prof. Richter und den Spitzen-Cappuccino.

Bei Irene möchte ich mich für eine wirklich schöne und inhaltsreiche Zeit inklusive der wertvollen Gespräche bedanken. Die Pausen im Park mit einer Schnitzelsemmel vom Würstlkönig bleiben unvergessen.

Mein größter Dank gilt aber meiner Familie und Nachbarschaft: für Eure immer vorhandene Unterstützung, Euren Glauben in mich und Euren liebevollen Rückhalt, ohne den nicht nur diese Arbeit unmöglich gewesen wäre. Dir, Jens, danke ich außerdem für Deine mir immer gewährte Freiheit und Rücksicht, mich in allen Dingen entwickeln zu können, ohne das Gefühl zu haben, die Dinge alleine meistern zu müssen.

Lebenslauf

Name: Böhmer, geb. Rauscher
Vorname: Francine, Caroline
Geburtsdatum: 8. Januar 1977
Geburtsort: Freudenstadt
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulischer und beruflicher Werdegang:

1983–1987 Grundschule Freudenstadt
1987–1993 Realschule Pfalzgrafenweiler
1993–1996 Luise-Büchner-Schule, Freudenstadt
Abschluss mit dem Abitur

1996–1999 PTA-Ausbildung an der Gewerblichen Schule in Horb
1999–2000 Anstellung als PTA in der Apotheke am Bühl in Schopfloch
2000–2006 Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2007–2009 Doktorandin am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät München, Betreuer Prof. Dr. E. Richter
seit 2009 Filialleiterin der Elch-Apotheke in Baldham