

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

---

**Untersuchungen zur Ätiologie des ösophagealen Adenokarzinoms  
in Abhängigkeit zur Myosminbelastung durch die Ernährung**

---

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

von  
Christopher Heppel  
aus  
Würzburg

München 2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Elmar Richter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann  
Prof. Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos

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

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2009

"Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört."

- Justus von Liebig -



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Krebserkrankungen</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Entstehung von Krebserkrankungen .....	3
<b>1.2 Krebserkrankungen der Speiseröhre</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Plattenepithelkarzinom.....	8
1.2.2 Adenokarzinom .....	9
1.2.2.1 Epidemiologie des Adenokarzinoms .....	10
1.2.2.2 Gastroösophageale Refluxkrankheit und Barrett-Ösophagus.....	12
1.2.2.3 Molekulargenetische Veränderungen beim Adenokarzinom .....	14
1.2.2.4 Einfluss Reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies.....	16
<b>1.3 Nitrosamine</b> .....	<b>17</b>
1.3.1 Exogene und endogene Bildung.....	17
1.3.2 Tabakspezifische Nitrosamine .....	18
<b>1.4 Myosmin</b> .....	<b>20</b>
1.4.1 Myosmin im Tabakrauch .....	20
1.4.2 Myosmin in Nahrungsmitteln.....	21
1.4.3 Toxikologische Eigenschaften von Myosmin .....	22
<b>1.5 Biomonitoring</b> .....	<b>23</b>
1.5.1 Messmethoden.....	24
1.5.1.1 <sup>32</sup> P-Postlabeling .....	24
1.5.1.2 Comet-Assay .....	24
1.5.1.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS).....	25
1.5.2 Belastung mit TSNA und Bildung von DNA-Addukten.....	26
1.5.3 Erfassung der Myosminbelastung des Menschen .....	29
<b>1.6 Zielsetzung</b> .....	<b>29</b>

---

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>29</b>
2.1.1	GC/MS-Geräte und Zubehör .....	29
2.1.2	Sonstige Geräte.....	29
<b>2.2</b>	<b>Material</b> .....	<b>29</b>
2.2.1	Festphasenextraktion .....	29
2.2.2	DNA-Extraktion .....	29
2.2.3	Einweggefäße und Zubehör .....	29
2.2.4	Pipetten und Zubehör .....	29
<b>2.3</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>29</b>
2.3.1	Herstellung der Reagenzien.....	29
2.3.1.1	Bestimmung HPB-freisetzungender DNA-Addukte.....	29
2.3.1.2	Bestimmung der Cotinin- und Myosminkonzentration im Plasma.....	29
<b>2.4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.4.1	Bestimmung HPB-freisetzungender DNA-Addukte .....	29
2.4.1.1	Entnahme der Biopsien im Rahmen der Ösophagus-Studie .....	29
2.4.1.2	Isolierung der DNA aus Gewebeproben .....	29
2.4.1.3	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	29
2.4.1.4	Hydrolyse und Aufreinigung .....	29
2.4.1.5	Derivatisierung.....	29
2.4.1.6	GC/MS-Analyse.....	29
2.4.1.7	Berechnung der HPB-Konzentration .....	29
2.4.2	Bestimmung der Plasmakonzentration von Myosmin und Cotinin .....	29
2.4.2.1	Methodenentwicklung mit tritiummarkiertem Myosmin.....	29
2.4.2.2	Entnahme der Plasmaproben im Rahmen der Ösophagus-Studie.....	29
2.4.2.3	Festphasenextraktion und weitere Aufarbeitung.....	29
2.4.2.4	GC/MS-Analyse.....	29
2.4.2.5	Berechnung der Konzentration von Myosmin und Cotinin .....	29
2.4.3	Validierung der Methoden.....	29
2.4.3.1	Berechnung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze .....	29
2.4.3.2	Berechnung der Präzision .....	29
2.4.3.3	Berechnung von Linearität und Wiederfindungsrate .....	29

---

2.4.3.4	Methodenvalidierung für DNA-Addukte aus Gewebeproben .....	29
2.4.3.5	Validierung der Methode zur Bestimmung der Plasmakonzentration.....	29
2.4.4	Statistische Auswertung der Daten .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Analytik .....</b>	<b>29</b>
3.1.1	Bestimmung HPB-freisetzender DNA-Addukte .....	29
3.1.1.1	Anpassung des Methodenprotokolls.....	29
3.1.1.2	GC/MS-Analyse und Parameter .....	29
3.1.1.3	Bestimmung der Linearität .....	29
3.1.1.4	Bestimmung der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze.....	29
3.1.1.5	Präzision und Wiederfindung .....	29
3.1.2	Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Myosmin und Cotinin.....	29
3.1.2.1	Entwicklung und Anpassung der Extraktionsmethode.....	29
3.1.2.2	Identifizierung der Tabakalkaloide Myosmin und Cotinin.....	29
3.1.2.3	Überprüfung der Präzision der GC/MS Anlage und der Methode .....	29
3.1.2.4	Bestimmung von Linearität und Bestimmtheitsmaß .....	29
3.1.2.5	Identifizierung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze.....	29
3.1.2.6	Wiederfindung der Analyten .....	29
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der Ösophagus-Studie.....</b>	<b>29</b>
3.2.1	Einteilung der Probanden .....	29
3.2.2	Bestimmung der Plasmakonzentration von Myosmin und Cotinin .....	29
3.2.3	Beurteilung und Einordnung des Rauchstatus .....	29
3.2.4	Übergewicht und Krankheitsstatus .....	29
3.2.5	Ernährungsgewohnheiten und Krankheitsstatus.....	29
3.2.6	Begleiterkrankungen und Symptome.....	29
3.2.7	Bestimmung der HPB-freisetzenden DNA-Addukte.....	29
3.2.7.1	DNA-Bestimmung.....	29
3.2.7.2	Bestimmung der DNA-Addukte.....	29
3.2.8	Auswertung der DNA-Addukte .....	29
3.2.9	Auswertung der Plasmakonzentrationen von Myosmin und Cotinin .....	29

---

3.2.10	Vergleich zwischen den Plasmakonzentrationen und den DNA-Addukten...	29
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodenentwicklung .....</b>	<b>29</b>
4.1.1	Bestimmung der HPB-Addukte.....	29
4.1.2	Bestimmung der Plasmakonzentrationen .....	29
<b>4.2</b>	<b>HPB-freisetzende DNA-Addukte.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3</b>	<b>Plasmakonzentration von Nicotinoiden .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4</b>	<b>Einflussfaktoren für DNA-Addukte in der Speiseröhre.....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	



## Abkürzungen

<i>ATP</i>	<i>Adenosintriphosphat</i>
<i>AUC</i>	<i>Area under the curve</i>
<i>BMI</i>	<i>Body mass index</i>
<i>CA</i>	<i>Karzinom</i>
<i>CI</i>	<i>Chemische Ionisation</i>
<i>COX-2</i>	<i>Cyclooxygenase 2</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>EAC</i>	<i>Esophageal Adenocarcinoma (Ösophagus-Adenokarzinom)</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
<i>EGF</i>	<i>Epidermal growth factor</i>
<i>EI</i>	<i>Elektronen-Stoß-Ionisation</i>
<i>ESCC</i>	<i>Esophageal Squamous Cell Carcinoma (Ösophagus-Plattenepithelkarzinom)</i>
<i>ETS</i>	<i>Enviromental tobacco smoke</i>
<i>FPG</i>	<i>Formamidopyrimidinglykosylase</i>
<i>GC/MS</i>	<i>Gaschromatographie/Massenspektrometrie</i>
<i>GERD</i>	<i>Gastroesophageal reflux disease (Gastroösophageale Refluxkrankheit)</i>
<i>HPB</i>	<i>4-Hydroxy-(3-pyridyl)-1-butanon</i>
<i>HPLC</i>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<i>IARC</i>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<i>ID</i>	<i>Innendurchmesser</i>
<i>iNOS</i>	<i>induzierbare NO-Synthase</i>
<i>ISTD</i>	<i>Interner Standard</i>
<i>LC-MS/MS</i>	<i>Flüssigchromatographie mit MS×MS-Kopplung</i>
<i>LOD</i>	<i>Limit of detection</i>
<i>LOQ</i>	<i>Limit of quantification</i>
<i>m/z</i>	<i>Masse-Ladungs-Verhältnis</i>
<i>MW</i>	<i>Mittelwert</i>
<i>n.d.</i>	<i>nicht detektierbar</i>
<i>NAB</i>	<i>N'-Nitrosoanabasin</i>
<i>NAT</i>	<i>N'-Nitrosoanatabin</i>
<i>NNA</i>	<i>4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanal</i>
<i>NNAC</i>	<i>4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butansäure</i>
<i>NNAL</i>	<i>4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol</i>

---

<i>NNK</i>	<i>4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanon</i>
<i>NNN</i>	<i>N'-Nitrosonornicotin</i>
<i>OTM</i>	<i>Olive tail moment</i>
<i>PAH</i>	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbon</i>
<i>PEITC</i>	<i>Phenylethylisothiocyanat</i>
<i>PFBC</i>	<i>Pentafluorbenzoylchlorid</i>
<i>PHB</i>	<i>Pyridylhydroxybutyl</i>
<i>POB</i>	<i>Pyridyloxobutyl</i>
<i>PP</i>	<i>Polypropylen</i>
$r^2$	<i>Bestimmtheitsmaß der linearen Regression</i>
<i>RNS</i>	<i>Reaktive Stickstoffspezies</i>
<i>ROS</i>	<i>Reaktive Sauerstoffspezies</i>
<i>rpm</i>	<i>Revolutions per minute</i>
<i>RT</i>	<i>Raumtemperatur</i>
<i>S/N</i>	<i>Signal to noise ratio</i>
<i>SD</i>	<i>Standard deviation</i>
<i>SE</i>	<i>Standard error</i>
<i>SEER</i>	<i>Surveillance epidemiology and end results</i>
<i>SIM</i>	<i>Single ion monitoring</i>
<i>SIR</i>	<i>Single ion recording</i>
$t_{1/2}$	<i>Halbwertszeit</i>
<i>TGF<math>\alpha</math></i>	<i>Transforming growth factor <math>\alpha</math></i>
<i>TMA</i>	<i>Trimethylamin</i>
<i>TSNA</i>	<i>Tabakspezifische Nitrosamine</i>
<i>UV/VIS</i>	<i>Spektralphotometrie mit ultraviolettem und sichtbarem Licht</i>

## Zusammenfassung

Die beiden tabakspezifischen Nitrosamine (TSNA) 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und *N'*-Nitrosornicotin (NNN) sind kanzerogene Inhaltstoffe des Tabakrauchs, die während der Fermentierung und der Pyrolyse aus Nicotin und Nornicotin entstehen. NNK erzeugt im Tierversuch vor allem Tumoren in Lunge, Leber, Bauchspeicheldrüse und der Nasenhöhle. NNN führt dagegen zu Ösophagustumoren, aber auch zu Tumoren der Nasenhöhle. Unter metabolischer Aktivierung bilden beide TSNA eine reaktive Zwischenstufe, die mit Biomolekülen reagiert und nach Hydrolyse 4-Hydroxy-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) abspaltet. Die Bildung von DNA-Addukten ist ein wichtiger Schritt in der Initiation der Kanzerogenese. Daher ist es von besonderem Interesse diese HPB-abspaltenden Addukte an der DNA des Zielgewebes zu bestimmen. Nach Extraktion und Derivatisierung kann das HPB mit hoher Nachweisempfindlichkeit mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) bestimmt werden. Vorangegangene Untersuchungen zeigten allerdings nicht die erwartete hohe Spezifität dieser Addukte für den Genuss von Tabakwaren. Nichtraucher haben bereits eine relativ hohe Adduktbelastung, die bei Rauchern nur geringfügig höher ausfällt.

Eine andere Quelle für diese Addukte stellt das Myosmin dar. Zwar ist es auch ein Nebenbestandteil der Alkaloidfraktion des Tabaks, aber unabhängig davon kommt es in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln vor und kann in Plasma und Speichel des Menschen nachgewiesen werden. Auch hier sind die Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern gering. Myosmin bildet im sauren Milieu durch Nitrosierung bzw. Peroxidierung ebenfalls HPB-Addukte.

Ähnliche Bedingungen liegen in der unteren Speiseröhre bei einer Refluxerkrankung vor. Bei einem Teil der Patienten kommt es zu einer Metaplasie der Speiseröhrenschleimhaut, dem Barrett-Ösophagus, der ein Präkanzerose darstellt, und aus dem sich pro Jahr bei 1-2% der Patienten ein ösophageales Adenokarzinom (EAC) entwickelt. Das EAC zeigt vor allem in westlichen Industriestaaten eine stark steigende Inzidenzrate. Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines EAC sind neben dem Barrett-Ösophagus das männliche Geschlecht, Übergewicht und eine gemüse-/obstarme Ernährung bzw. der übermäßige Verzehr von tierischen Fetten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle von HPB-abspaltenden DNA-Addukten in Biopsien der unteren Speiseröhre für das Krankheitsbild, insbesondere der Sequenz Reflux – gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) – Barrett – EAC und der mögliche Beitrag des Rauchens und der Myosminbelastung durch die Ernährung. Im Rahmen einer endoskopischen Untersuchung erhielten wir von nüchternen Patienten zwei Biopsien der Ösophagus-schleimhaut oral and aboral der magennahen Läsion für die Bestimmung der DNA-Addukte und eine Blutprobe zur Bestimmung der Myosmin- und Cotininkonzentration. Zusätzlich wurden die Teilnehmer gebeten einen Fragebogen zu Lebens- und Ernährungsgewohnheiten auszufüllen.

Vorrangiges Ziel war zunächst die Verbesserung der bestehenden analytischen Methoden. Für die selektive und sensitive Bestimmung der HPB-Addukte in den geringen DNA-Mengen, die aus den Biopsien zur Verfügung standen, mussten die Messungen an einem hochauflösenden Sektorfeldmassenspektrometer erfolgen. Nach Modifikation der DNA-Extraktion und der Aufreinigung und Derivatisierung des abgespaltenden HPB konnte die Hintergrundbelastung minimiert und eine Methodvalidierung durchgeführt werden, die eine Nachweisgrenze von 0,76 pg (4,60 fmol) und eine Bestimmungsgrenze von 2,29 pg (13,86 fmol) freigesetztem HPB ergab. Dabei betrug die Tagespräzision 2,7% und die Wochenpräzision 3,1%.

Bei der Bestimmung der Plasmakonzentration der Nicotinoide konnte durch Verwendung einer Mischpolymer-Festphase der Zeit- und Materialaufwand deutlich reduziert werden. Es ergaben sich für Myosmin und Cotinin Nachweisgrenzen von 1,2 pg/ml und 0,05 ng/ml, Bestimmungsgrenzen von 3,6 pg/ml und 0,15 ng/ml, eine Tagespräzision von 14,8% und 7,5% und eine Wochenpräzision von 17,9% und 3,7%.

Insgesamt nahmen 92 Patienten an der Studie teil, wobei von 84 Teilnehmern auch die HPB-Addukte und Plasmakonzentrationen bestimmt werden konnten.

Die Konzentration der HPB-Addukte in Schleimhautbiopsien der unteren Speiseröhre war mit  $4,75 \pm 9,78$  pmol/mg deutlich höher als zuvor berichtete Adduktlevel von Gewebeproben, die im Rahmen von Autopsien gewonnen worden waren und auch untere Schichten der Ösophaguswand einschlossen. Insgesamt ergab sich keine Abhängigkeit der Adduktkonzentration vom Geschlecht oder Rauchstatus. In der Sequenz Reflux– GERD – Barrett – EAC zeigten Patienten mit Reflux eine deutliche Tendenz zu höheren Werten. Bei Patienten, die häufig unter Sodbrennen leiden, war die Konzentration der HPB-Addukte gegenüber symptomfreien Patienten signifikant erhöht. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese der Bildung von HPB-Addukten aus Myosmin in der unteren Speiseröhre.

Hinsichtlich der Ernährungsgewohnheiten zeigten sich wenige Auffälligkeiten. Lediglich bei häufigem Verzehr von scharfen Speisen und nusshaltigen Lebensmitteln und bei regelmäßigem Alkoholkonsum zeigte sich eine Tendenz zu höheren Adduktwerten. Beim Milchkonsum verhielt es sich umgekehrt, der häufigere Verzehr führte zu einer Erniedrigung der HPB-Konzentration an der DNA.

Die Myosminkonzentration im Plasma der nüchternen Patienten hatte aufgrund der anzunehmenden kurzen Halbwertszeit von Myosmin nur eine geringe Aussagekraft. Es bestand keine Korrelation mit den HPB-Addukten und auch keine Abhängigkeit vom Rauchstatus, während regelmäßiger Alkoholkonsum die Konzentration von Myosmin signifikant erhöhte.

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebserkrankungen

### 1.1.1 Epidemiologie

Krebs stellt heutzutage in Deutschland neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar (Abbildung 1-1). Mit der zunehmend älter werdenden Gesellschaft steigt das Auftreten von Krebserkrankungen. 2006 wurde für jeden vierten (25,7 %) von insgesamt 821.627 Todesfällen eine bösartige Krebserkrankung verantwortlich gemacht [1].

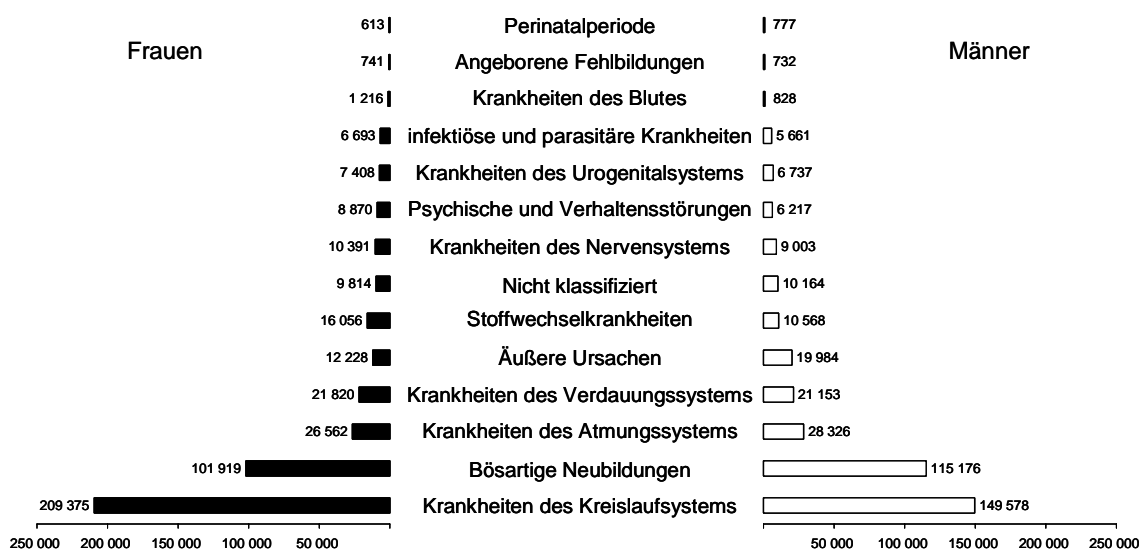


Abbildung 1-1: Häufigste Todesursachen in Deutschland 2006 [1]

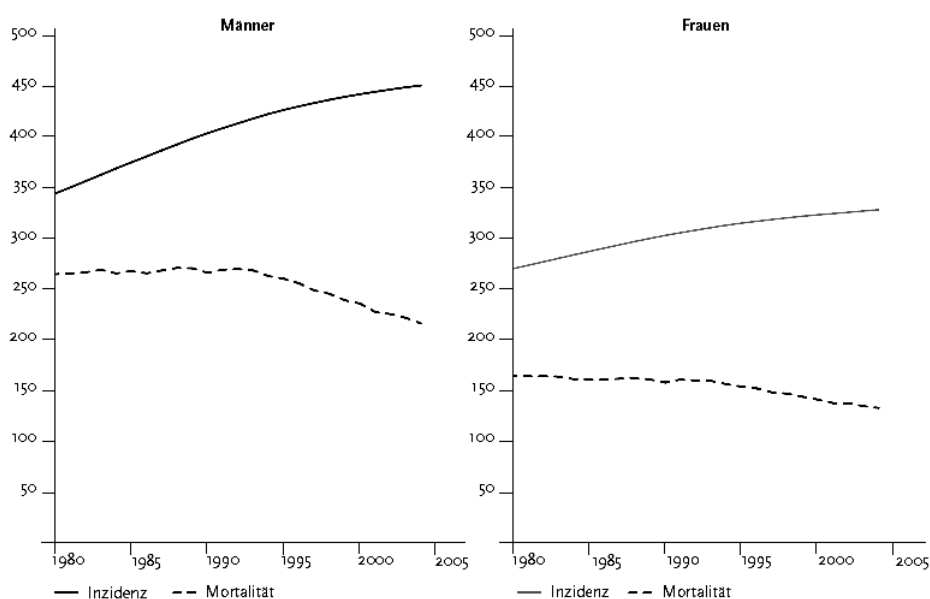


Abbildung 1-2: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität in Deutschland 1980 – 2004, Fälle pro 100.000 (Europastandard) [1]

Trotz steigender Inzidenz konnte in den letzten Jahren vor allem durch intensivere Forschung und stets verbesserter Therapiemöglichkeiten die Mortalität gesenkt werden (Abbildung 1-2). Dennoch verstarben 2004 deutschlandweit 110 745 Männer und 98 079 Frauen an Krebs [1].

Betrachtet man die einzelnen Krebsarten, so liegt bei den Neuerkrankungen im Jahr 2004 bei den Männern das Prostatakarzinom an erster Stelle, bei den Frauen das Mammakarzinom. Doch ergibt sich bei der Sterblichkeitsrate der einzelnen Krebserkrankungen ein anderes Bild, Lungenkrebs zeigt bei Männern mit 26% die höchste Sterblichkeitsrate (Abbildung 1-3).

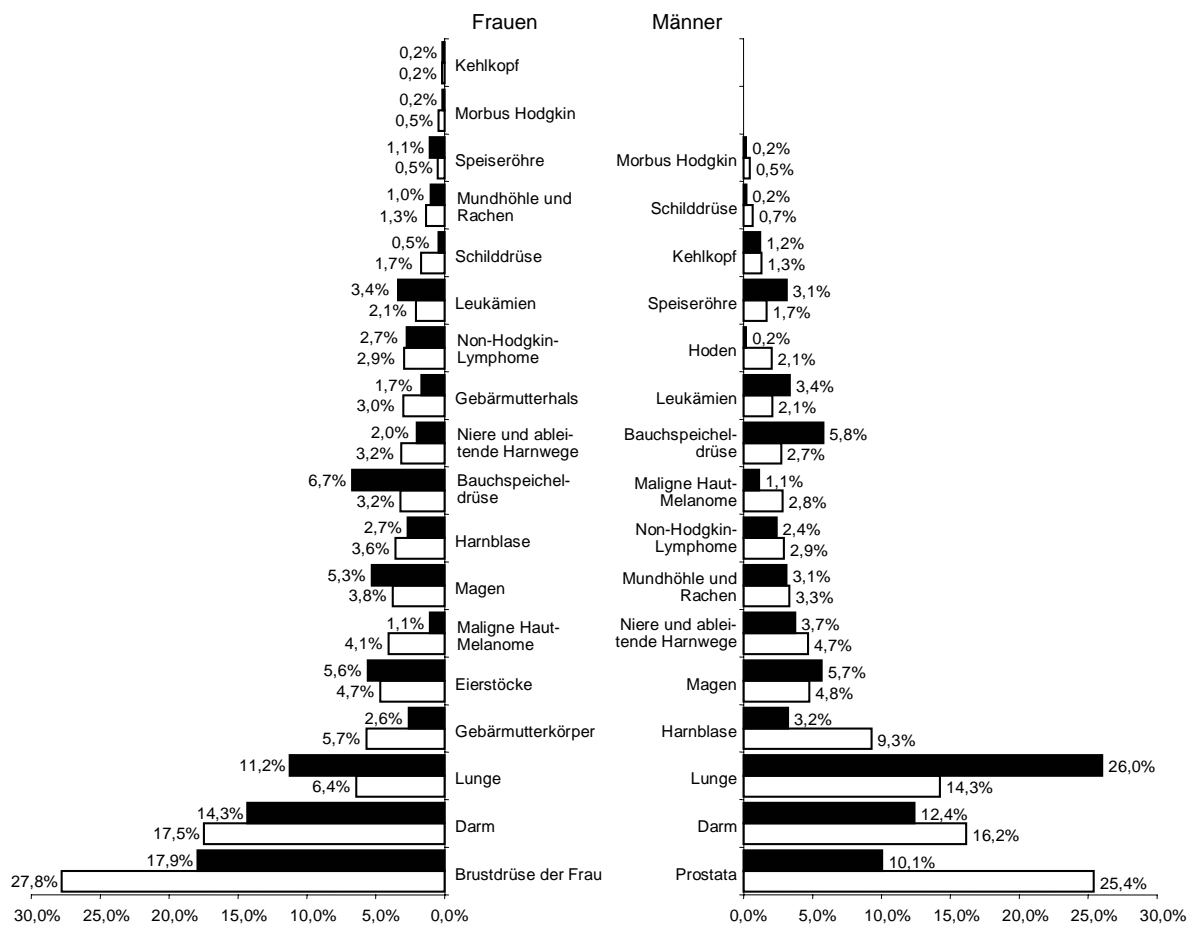


Abbildung 1-3: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen (□) und Krebssterbefällen (■) in Deutschland 2004 [1]

Ursache für das Auftreten von Krebskrankheiten ist meist eine Verkettung mehrerer Einzelrisikofaktoren. Die in Abbildung 1-4 aufgezeigten Prozentangaben der einzelnen Risiken an den Krebstodesfällen sind auf die Gesamtpopulation bezogen, sie unterscheiden sich je nach Krebsart und Geschlecht. Der bei weitem bedeutendste Einzelrisikofaktor stellt das Rauchen dar: hierbei sind vor allem Lunge, Kehlkopf, Mundhöhle und Rachen, Speiseröhre, Bauchspeicheldrüse, Harnblase und Niere betroffen.

Einen ähnlich hohen Anteil wie der Zigarettenkonsum zeigen Ernährungsgewohnheiten. Als wesentliche Risikofaktoren gelten dabei ein hoher Fett- bzw. Fleischkonsum und dadurch bedingt das Auftreten von Übergewicht.

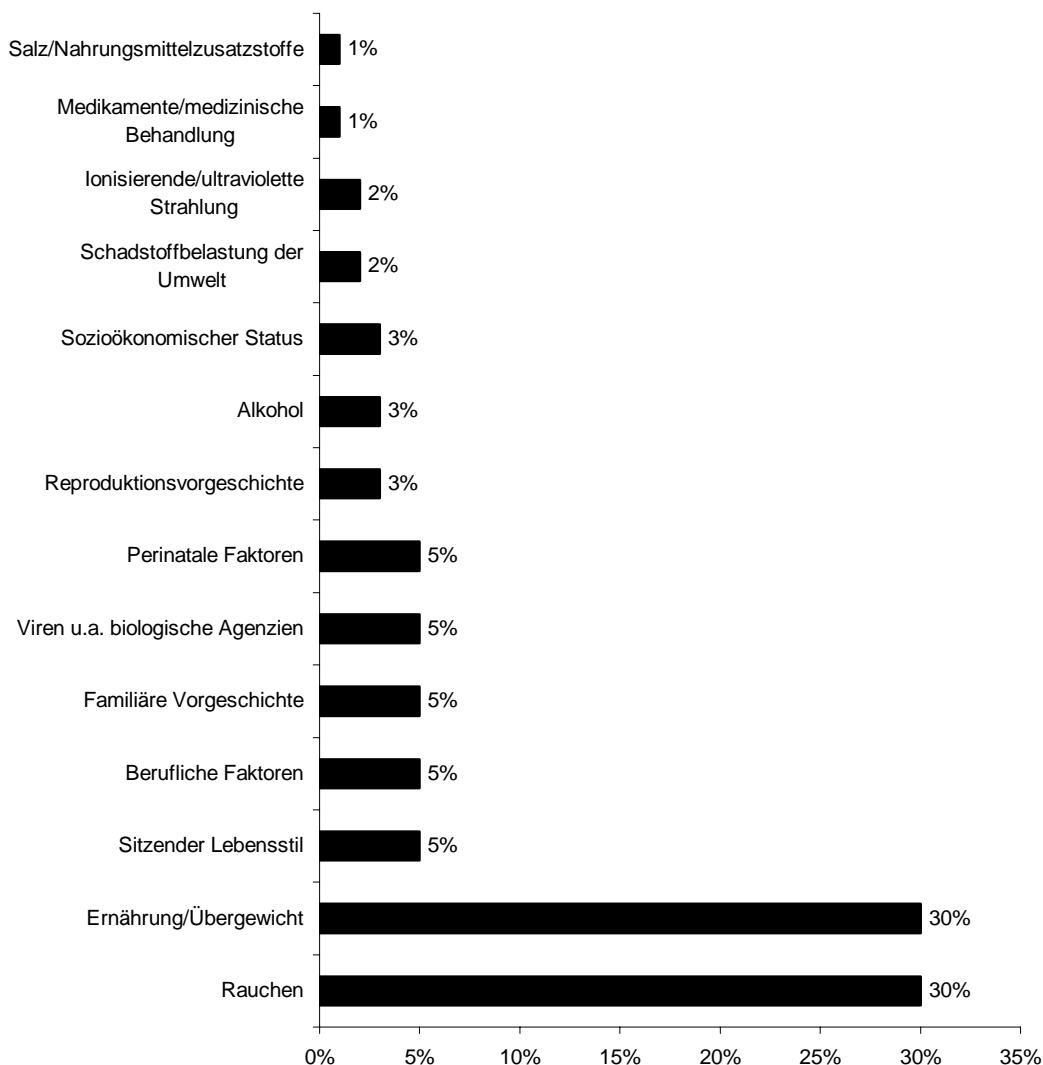


Abbildung 1-4: Geschätzte anteilige Zuordnung der Krebstodesfälle zu den verschiedenen Risikofaktoren bzw. Risikofaktorbereichen [2]

### 1.1.2 Entstehung von Krebserkrankungen

Unter Krebs versteht man einen bösartigen (malignen) Tumor, der gewisse pathologische Charakteristika, wie Zelltypen, invasives Wachstum und häufige Metastasierung aufweist.

Obwohl ionisierende Strahlung, infektiöses biologisches Material und genetische Disposition ebenfalls eine Rolle in der Krebsentstehung spielen, verursachen chemische Substanzen in der Umwelt die Mehrzahl menschlicher Tumoren.

Dieser Einfluss von Chemikalien auf die Entstehung maligner Tumoren wird als chemische Kanzerogenese bezeichnet. Dabei wird die Identifizierung der auslösenden Substanzen vor

allem durch die hohe Latenzzeit erschwert. Bis zur Entstehung der Krebserkrankung können Jahre bis Jahrzehnte vergehen. Auch die chronische Einwirkung schon geringer Dosen des Kanzerogens kann die Tumorrage erhöhen.

Man unterscheidet genotoxische und epigenetische Kanzerogene. Die genotoxische Kanzerogenese beruht auf der Reaktion von Substanzen mit Biomolekülen, vor allem der DNA, wodurch es zu Mutationen kommen kann. Diese Reaktionen können entweder mit der Substanz direkt oder nach vorhergehender Metabolisierung ablaufen. Zu den genotoxischen Kanzerogenen gehören unter anderem aromatische Amine, polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine.

Epigenetische Kanzerogene reagieren dagegen nicht mit der DNA. Sie wirken krebsauslösend indem sie beispielsweise über Entzündungsvorgänge oder cytotoxische Effekte zu einer gesteigerten Proliferation führen. Andere Substanzen haben hormonähnliche Wirkung oder wirken tumorpromovierend.

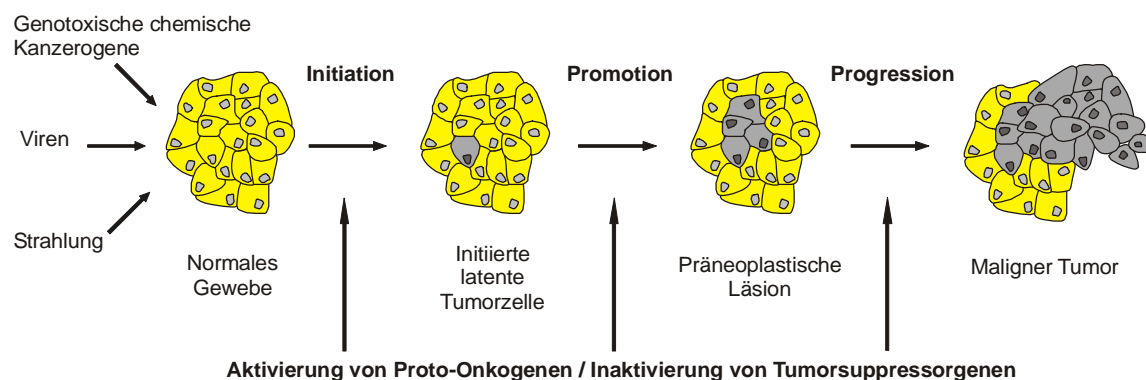


Abbildung 1-5: Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese [3]

Über einen mehrstufigen Prozess entsteht aus der Normalzelle ein Tumor. Bei der Initiation wird die Stammzelle irreversibel geschädigt. Stammzellen sind noch undifferenziert und zur Teilung befähigt.

Während der Promotion wird die initiierte Zelle durch Wachstumsfaktoren angeregt. Durch weitere genetische und epigenetische Faktoren (z.B. Proto-Onkogen-Aktivierung) entsteht in der Progressions-Phase eine maligne Zelle mit der Fähigkeit zu invasivem Wachstum und Metastasierung (Abbildung 1-5).

Die Vorstufe des malignen Tumors wird als Neoplasie bezeichnet. Erste Verluste der Zelldifferenzierung im Epithelgewebe stellen eine Dysplasie dar. Dabei unterscheidet man zwischen geringgradiger Dysplasie, die meist nur eine gesteigerte Regenerationsrate aufweist und daher noch reversibel ist und der hochgradigen Dysplasie, die einen nicht mehr reversiblen Zustand darstellt, da die Zellen schon zu starken Veränderungen unterworfen sind. Kommt es dann zur



weiteren Proliferation dieser atypischen Zellen, aber noch im ursprünglichen Gewebeverband, so spricht man vom *Carcinoma in situ*. Erst durch die Invasion und Metastasierung kommt es zur Bildung des eigentlichen Karzinoms.

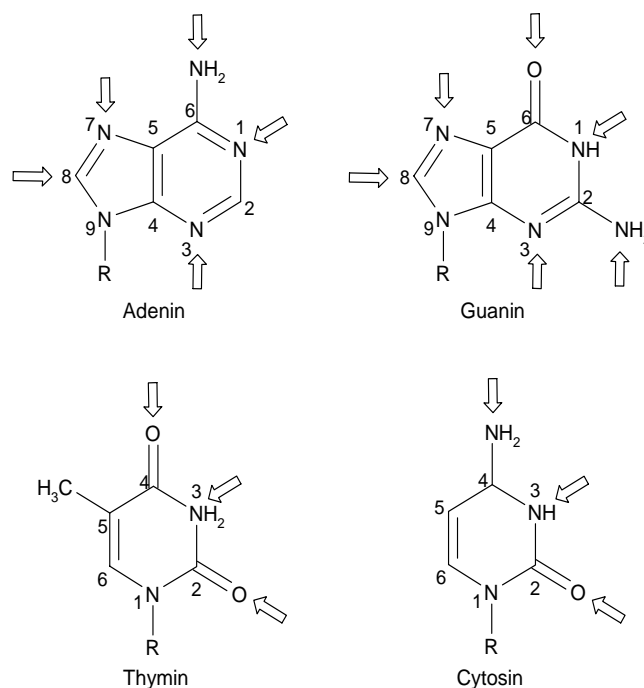


Abbildung 1-6: DNA-Basen mit potentiellen Stellen für Additionsreaktionen

Durch kovalente Bindung des chemischen Kanzerogens an die Basen der DNA (DNA-Addukt, Abbildung 1-6) kommt es zu strukturellen Veränderungen. Generell stellen die Stickstoff- und Sauerstoffgruppen aktive Stellen der Adduktbildung dar, aber es sind auch Reaktionen mit Phosphat- und Desoxyribosegruppen bekannt. Am häufigsten sind Addukte am Guanin in N<sup>2</sup>-, O<sup>6</sup>- und C<sup>8</sup>-Position [4].

Während des Replikationsprozesses führen Addukte zu einem Basenaustausch und damit zu einer Veränderung der genetischen Information (Abbildung 1-7). Es kann aber auch zu Strangbrüchen, der Bildung von DNA-Dimeren oder einer Veränderung des Methylierungsmusters kommen.

Diese Veränderungen führen während der Translation zu einer Änderung der normalen Proteinbiosynthese. Möglich ist auch der Austausch einer einzelnen Aminosäure, wodurch im Weiteren die Funktion des Proteins beeinflusst wird. Das DNA-Addukt kann auch die Über- bzw. Unterexpression gewisser Proteine bewirken, oder zur Produktion von verkürzten Proteinketten führen [5].

Die Zelle erfährt während des Prozesses der Kanzerogenese essentielle genetische Veränderungen, die vor allem Gene betreffen können, welche die Zelle und ihren Zellzyklus steuern und beeinflussen.

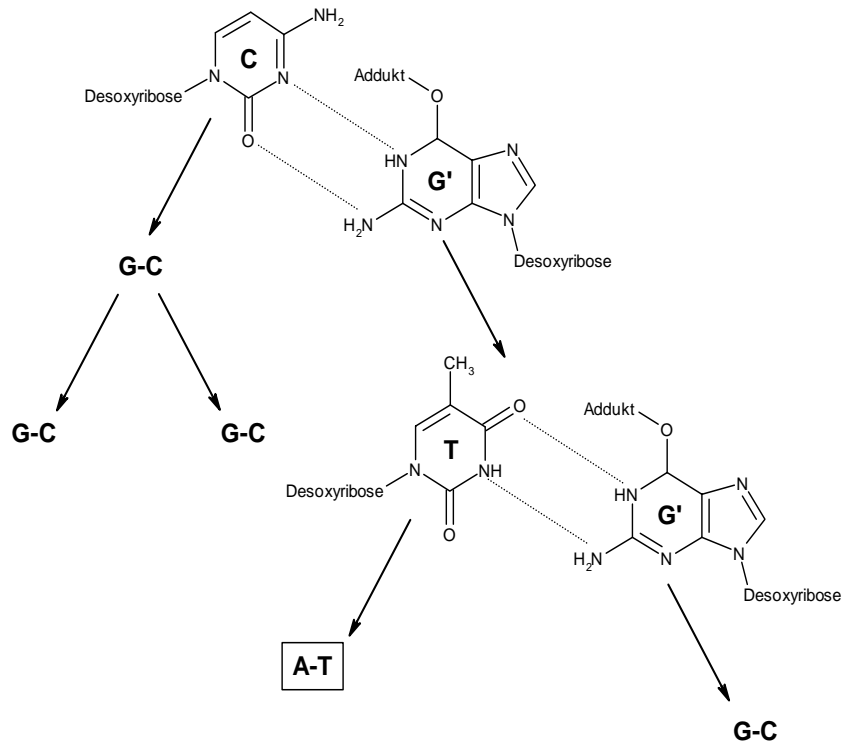


Abbildung 1-7: Basenaustausch durch DNA-Addukte während der Replikation am Beispiel eines  $O^6$ -Adduktes des Guanins (G: Guanin, C: Cytosin, T: Thymin, A: Adenin)

In der Regel umfassen diese Veränderungen die Ausschüttung von Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstumssignalen, das Umgehen des programmierten Zelltodes (Apoptose), ein unbegrenzt replikationspotenzial, die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) zur ausreichenden Nährstoffversorgung, die Befähigung zur Gewebeanvasion und die Bildung von Metastasen [6].

Für die Zelle sind Veränderungen an der DNA jedoch nichts Ungewöhnliches, da sie täglich einer Vielzahl von Schädigungen ausgesetzt ist. Sie kann daher aufgrund ihrer genetischen Ausstattung auf verschiedenste Weise auf eine Veränderung der DNA reagieren. Zunächst wird der Zellzyklus unterbrochen. Geeignete Enzyme können nun den DNA-Schaden erkennen. Die Zelle besitzt passende Mechanismen, die den Schaden entweder direkt reparieren, die Base oder das gesamte Nukleotid ausschneiden, den DNA-Strang homolog rekombinieren oder durch den so genannten „Mismatch Repair“, den Versatz von DNA-Basen erkennen und aufheben [7]. Kann die Zelle den Schaden so nicht reparieren, kann durch geeignete Signale der Zelltod eingeleitet werden. Da alle diese Reparaturwerkzeuge durch den genetischen Code vorgegeben sind, kann eine DNA-Schädigung diese Mechanismen außer Kraft setzen und der Tumorzelle zu einem Wachstumsvorteil verhelfen.

## 1.2 Krebserkrankungen der Speiseröhre

Hauptaufgabe der Speiseröhre (Ösophagus) ist der Transport des Nahrungsbreis aus dem Mund- und Rachenraum in den Magen. Dabei wird durch den oberen Ösophagussphinkter der Rücktritt des Nahrungsbreis und durch den unteren Ösophagussphinkter das Rückfließen von saurem Magensaft (Reflux) verhindert. Der Ösophagus stellt einen ca. 40 cm langen Muskelschlauch dar (Abbildung 1-8), der im oberen Drittel aus längsgestreifter, im unteren aus quergestreifter und dazwischen aus Übergangsmuskulatur besteht. Nach außen ist die Muskulatur von Bindegewebe umgeben, nach innen folgen eine submucosale und eine mucosale Schicht, die über mucin-ausscheidende Drüsen den Nahrungstransport erleichtert.

Insgesamt muss der Nahrungsbrei drei Engstellen im Ösophagus überwinden; die erste bereits im Kehlkopf am oberen Sphinkter, die zweite an der Luftröhrengabelung und die dritte am Zwerchfelldurchtritt am gastroösophagealen Übergang.

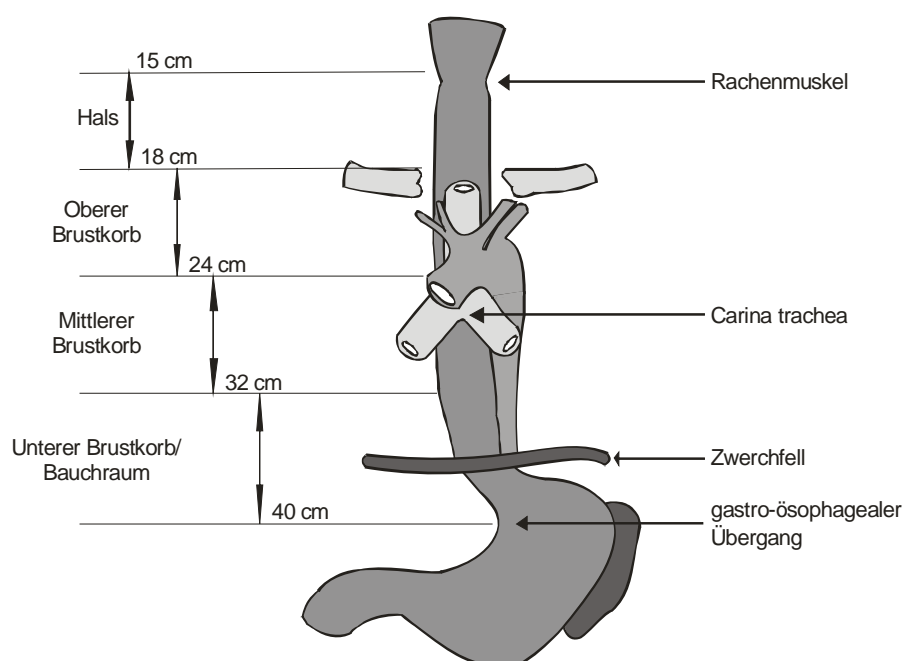


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung der Anatomie des Ösophagus [8]

Das Ösophaguskarzinom ist eine seltene Erkrankungsform, die in München 2005 mit einer altersstandardisierten Inzidenzrate von 13,9 und 2,7 je 100 000 Männern bzw. Frauen auftritt [9]. Bei den Krebserkrankungen der Speiseröhre gibt es zwei Hauptformen, das Plattenepithelkarzinom (Esophageal Squamous Cell Carcinoma, ESCC) und das Adenokarzinom (Esophageal Adenocarcinoma, EAC), die sich in ihrem pathologischen und histologischen Bild deutlich unterscheiden. Beide werden im Folgenden näher erläutert, wobei das Hauptaugenmerk auf das Adenokarzinom gelegt werden soll.

### 1.2.1 Plattenepithelkarzinom

Weltweit zählen 90% aller Ösophaguskarzinome zum Plattenepithelkarzinom. Dabei gibt es eine hohe geographische Varianz. Gebiete mit einer außergewöhnlich hohen Häufigkeit liegen in bestimmten Regionen Chinas, Irans, Südafrikas und Südamerikas [5,10]. Im Gegensatz dazu tritt in den USA das Adenokarzinom häufiger auf. Weltweit ist das ESCC der sechshäufigste Krebs mit einer der höchsten Sterberaten; die mittlere Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 5% [10].

Die große Uneinheitlichkeit im Auftreten des ESCC weltweit legt den Einfluss einer äußeren Belastung aus der Umwelt nahe. Die Regionen mit einer hohen Häufigkeit liegen meist in Entwicklungsländern. Allen gemeinsam scheint eine stärkehaltige Ernährung mit wenig frischem Obst und Gemüse, in Verbindung mit der hohen Temperatur der aufgenommenen Lebensmittel. In den Industrieländern tritt das ESCC hauptsächlich in unteren sozialen Schichten auf [11].

Tabelle 1-1 fasst die Hauptrisikofaktoren für das Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre zusammen. Größter Risikofaktor für das ESCC ist in den Industrieländern das Rauchen. Verglichen mit Nichtrauchern haben Raucher hier ein nahezu zehnfach höheres Risiko an diesem Speiseröhrenkrebs zu erkranken [12]. Zusätzlich kann der regelmäßige Konsum alkoholischer Getränke das relative Risiko bis über das hundertfache steigern [13,14]. Auch der Konsum von Alkohol alleine erhöht bei Nichtrauchern das Risiko für das Auftreten des ESCC. Erst nach zwanzig Jahren Abstinenz gleicht sich das Risiko wieder dem Niveau von Nichttrinkern an [15]. Die Leberzirrhose ist eine häufige Begleiterkrankung bei Plattenepithelkarzinom-Patienten [16].

So verwundert es nicht, dass weltweit Männer mehr betroffen sind als Frauen. In den USA zeigt sich ein ethnischer Hintergrund mit hohem Risiko vor allem bei afroamerikanischen Männern. Die geschlechtsbezogene Abhängigkeit tritt in den Hochrisikoregionen der dritten Welt nicht auf. Hier müssen andere, bis heute nicht aufgeklärte Besonderheiten in der Ernährung und der Umweltbelastung vorliegen.

Das Plattenepithelkarzinom tritt meistens im mittleren bis unteren Teil der Speiseröhre auf. Es entsteht durch eine Akkumulation atypischer Zellen im normalen Epithelgewebe der Speiseröhre. Das Gewebe durchläuft dabei die Reihe von geringgradiger zu höhergradiger Dysplasie, zum *Carcinoma in situ* bis zum invasiven und metastasierenden Karzinom [17-19].

Tabelle 1-1: Risikofaktoren für das Auftreten des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus [11]

Alkohol	
Tabakrauch	
Ernährungsfaktoren	Nitrosamine (eingelegtes Gemüse, Gegrilltes, Gepökeltes, usw.) Mykotoxine (Fusarium, Alternaria, Geotrichum, Aspergillus)
Mangelernährung	Vitamin A, C, E, Niacin, Riboflavin, Zink Wenig frisches Obst und Gemüse
Umweltfaktoren	geringer sozialer Status schlechter Boden (Molybdän, Mangan, Zink) Metallstaub (Beryllium, Chrom, Chromate)
Berufliche Faktoren	Gummifabriken Klempner
Mikroorganismen	Papillomavirus Pilzbefall Bakterien
chronische Reizung	thermisch und mechanisch (scharfe und heiße Nahrung, Mate-Tee, hastiges Essen)
Strahlentherapie	
Sklerotherapie	
genetische Faktoren	
Tumoren des oberen Verdauungstrakts	
Magenresektion	
weitere Krankheiten	Plummer-Vinson Syndrom Sprue Tylosis Sklerodermie

### 1.2.2 Adenokarzinom

Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom tritt das Adenokarzinom überwiegend im unteren Drittel der Speiseröhre nahe dem unteren Ösophagusphinkter am Übergang zum Magen hin auf [9].

### 1.2.2.1 Epidemiologie des Adenokarzinoms

In den letzten dreißig Jahren konnte eine starke Zunahme des Adenokarzinoms, vor allem in westlichen Industrienationen festgestellt werden (Abbildung 1-9). Dabei tritt dieser Effekt vor allem bei weißen Männern auf [20-23]. Diese Zunahme ist stärker als für jede andere Krebsform. Die erheblichen Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen Tumorformen bei unterschiedlichen ethnischen Gruppen wird in Tabelle 1-2 gezeigt.

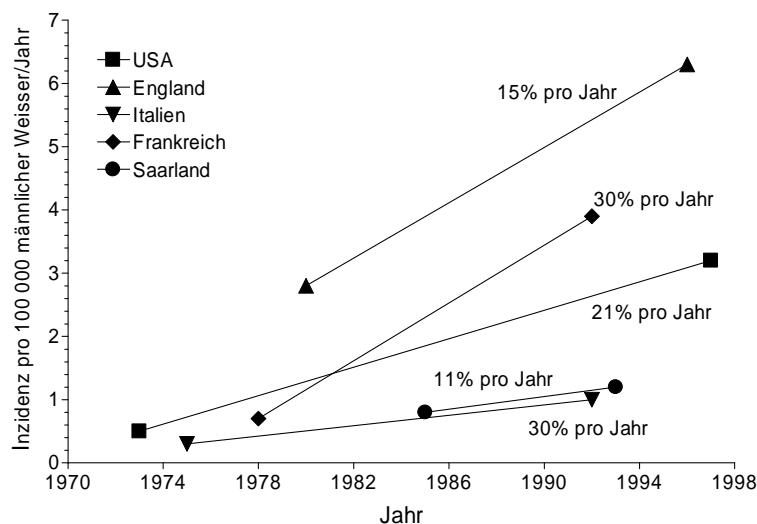


Abbildung 1-9: Zunahme des Ösophagus-Adenokarzinoms in westlichen Industrieländern [22]

Tabelle 1-2: Prozentuale Verteilung nach histologischem Befund in Ösophagusproben in den USA, 2001 – 2005 [24]

Histologie	Alle	Kaukasier	AA	API	AI/AN	Hispanic
Karzinome	99,1 %	99,1 %	99,5 %	99,3 %	100,0 %	99,0 %
Epidermis Karzinome <sup>a</sup>	37,9 %	30,3 %	82,3 %	71,6 %	51,5 %	43,5 %
ESCC	37,8 %	30,2 %	82,2 %	71,5 %	51,5 %	43,3 %
EAC	55,5 %	63,0 %	11,9 %	22,3 %	38,2 %	50,8 %
andere Karzinome	1,6 %	1,5 %	1,4 %	2,5 %	–	–
Sarkome <sup>b</sup>	0,3 %	0,3 %	–	–	–	–
keine Angaben	0,6 %	0,6 %	–	–	–	–
Total	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

a: beinhaltet Plattenepithel-, Basal- und Übergangszellkarzinome

b: beinhaltet Sarkome und andere Weichteiltumoren

AA: Afroamerikaner

API: Einwanderer aus dem asiatisch-pazifischen Raum

AI/AN amerikanische Ureinwohner und Ureinwohner Alaskas

Das Adenokarzinom zeigt eine auffällige Zunahme und Spezifität für das männliche Geschlecht, dafür gibt es bis heute keine befriedigende Erklärung. In den meisten Untersuchungen besteht ein Zusammenhang mit dem Rauchen [20,25,26], allerdings ist der Trend für andere eindeutig vom Rauchen abhängige Tumoren, z.B. für den Lungenkrebs, absolut gegensätzlich; bei weißen Männern der meisten westlichen Industrienationen hat die Inzidenz dieser Krebsformen seit Mitte der 1980er Jahre abgenommen. Deshalb wird für das Adenokarzinom vor allem ein Einfluss der Rauchinhaltsstoffe auf die frühen Phasen der Induktion der Krebserkrankung diskutiert, zumal auch das Einstellen des Tabakkonsums nicht zu einer sofortigen Risikoreduzierung führt, wie dies bei Lungenkrebs oder beim ESCC der Fall ist [20]. Auch der Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum fällt als Ursache für die Entstehung eines Adenokarzinoms bei weitem nicht so stark ins Gewicht wie beim ESCC [27]. Der auffälligste Unterschied zum ESCC ist das Körpergewicht vor Eintreten der klinischen Symptomatik. Während Patienten mit ESCC häufig normal bis untergewichtig sind, stellt für das Adenokarzinom das Übergewicht einen erheblichen Risikofaktor dar [28]. In Zusammenhang damit steht der Einfluss von fettreicher Ernährung mit geringem Anteil an ungesättigten Fettsäuren und Ballaststoffen [29]. Daher treten Herz-Kreislauf-Erkrankungen als häufige Begleiterkrankungen beim Adenokarzinom auf.

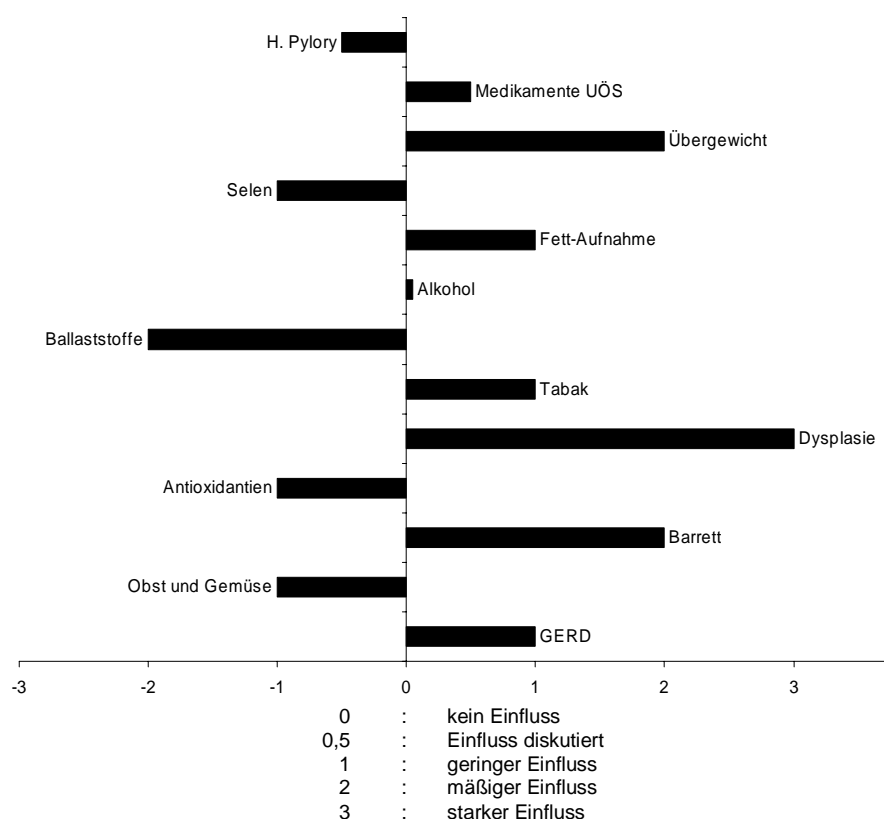


Abbildung 1-10: Protektive und Risikofaktoren für die Entstehung eines Adenokarzinoms der Speiseröhre [20] (H. pylory: *Helicobacter pylory*, UÖS: unterer Ösophagus-sphinkter, GERD: Gastroösophageale-Reflexkrankheit)

Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung des Adenokarzinoms ist in der Gastroösophagealen-Refluxkrankheit (Gastroesophageal Reflux Disease, GERD) zu sehen, aus dem sich gehäuft ein Barrett-Ösophagus entwickelt. Auf diese beiden soll im Weiteren genauer eingegangen werden. Auf Grund der geringen Überlebensraten wird eine ständige endoskopische Überwachung durch Biopsien der Speiseröhrenschleimhaut empfohlen [30].

Abbildung 1-10 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Schutzmechanismen und Risikofaktoren.

#### 1.2.2.2 Gastroösophageale Refluxkrankheit und Barrett-Ösophagus

Der Rückfluss von saurem Mageninhalt (Reflux) in die Speiseröhre kommt in der allgemeinen Bevölkerung recht häufig vor. Meist äußert er sich durch einen brennenden Schmerz, dem Sodbrennen (im Englischen: Heartburn) und führt in der Regel nicht weiter zu Komplikationen. In Europa und den USA leiden jedoch ca. 20 bis 40% an GERD, d.h. dem chronischen und häufigen Auftreten von Reflux. Dies führt beim betroffenen Patienten zu einem Verlust der normalen Ösophagusfunktionen, einer Änderung der Morphologie und damit zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität [31].

Der Magensaft beinhaltet Säure und proteolytische Enzyme, wie Pepsin und Trypsin. Diese können zum Auflösen des epithelialen Zellverbandes und damit zur Entzündung des Gewebes (Ösophagitis) führen. Aber es kommt auch zum Rückfluss von Galle und Bauchspeicheldrüsensekret. Diese Stoffe greifen ebenfalls das Epithelgewebe an, können zu erheblichen Schäden an den Zellmembranen führen und die Zelladhäsion stören [32]. Dabei führt eine längere Exposition mit einem größeren Volumen an Magensaft zu einer größeren Belastung. Durch die erhebliche Schädigung des Zellverbandes des Epithelgewebes wird es kanzerogenen Stoffen erleichtert in tiefere Schichten vorzudringen. Dadurch kann das Basalgewebe, also undifferenzierte Zellen mit hohem Proliferationspotenzial, beeinflusst und die ersten Schritte hin zur Kanzerogenese induziert werden.

Vor allem eine Schwächung des unteren Ösophagussphinkters wird für die Häufung des Refluxes verantwortlich gemacht, dabei spielt Übergewicht eine Rolle. Bei einer Großzahl der Patienten mit GERD tritt auch eine gleitende Hiatus Hernie auf, dabei wird der obere Teil des Magens, bei Belastung durch Nahrungsaufnahme oder im Liegen, durch den Zwerchfelldurchbruch gedrückt. Somit wird der gastroösophageale Übergang nach oben verschoben, und der Ösophagussphinkter kann nicht mehr richtig arbeiten [33].

Durch chronische Belastung der Speiseröhrenwand mit Magensäure und Gallensäuren kann es zur Umwandlung des normalen Plattenepithels in ein Zylinderepithel kommen. Dabei gliedert die Paul-Chandrasoma-Klassifikation den mit Zylinderepithel ausgekleideten Ösophagus



(Columnar lined esophagus) in drei histologisch unterschiedliche Gewebearten: die kardiotype Mucosa (Cardiac Mucosa), die kardiotype Mucosa mit Parietalzellen (Oxyntocardiac Mucosa) und den Barrett-Ösophagus, einer Schleimhaut mit Becherzellen (Abbildung 1-11). Durch den Einfluss des Refluxes auf das Epithelgewebe entsteht die Cardiac Mucosa, sie stellt ein Mehrschichten-Epithel aus Basalzellen von Platten- und Zylinderepithel dar. Oberflächlich sind auch schleimproduzierende Zellen sichtbar. Die Oxyntocardiac Mucosa gleicht der Magenschleimhaut und enthält säureproduzierende Drüsenzellen (Parietalzellen). Die Barrett Mucosa ähnelt eher dem Darmepithel, man spricht von einer intestinalen Metaplasie.

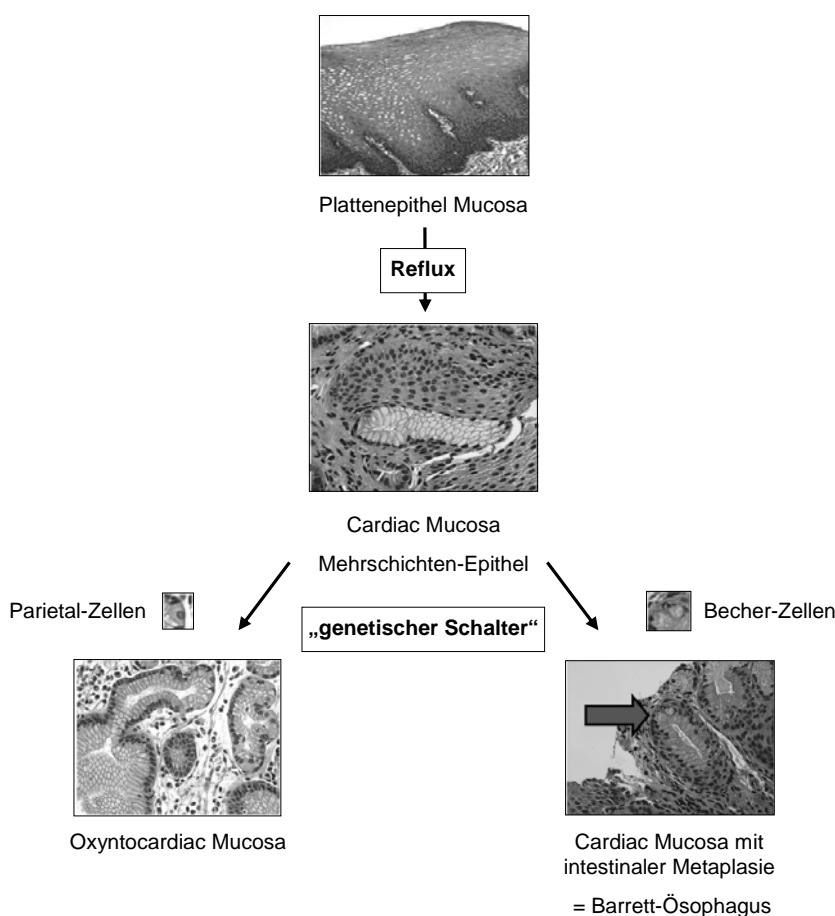


Abbildung 1-11: Bildung von Zylinderepithel durch Reflux mit Bildung von Oxyntocardiac Mucosa oder intestinaler Metaplasie, dem Barrett-Ösophagus [31]

Histologisch ist der Barrett-Ösophagus am Vorkommen von Becherzellen zu erkennen, einem schleimproduzierenden Zelltyp, der vor allem in der Dick- und Dünndarmwand auftritt. Durch bisher unbekannt genetische Veränderungen entstehen entweder der eine oder der andere Epitheltyp, wobei nur der Barrett-Ösophagus mit dem Auftreten von Becherzellen über die Stufen der Dysplasie zum Adenokarzinom führen kann [31]. Dabei entwickelt sich bei ca. 10% der Patienten mit GERD ein Barrett-Ösophagus [34], generell beträgt dann die Wahrscheinlichkeit von Barrett-Patienten ein Adenokarzinom zu entwickeln jährlich ca. 0,5%. [35]

### 1.2.2.3 Molekulargenetische Veränderungen beim Adenokarzinom

Die Entstehung eines Adenokarzinoms über GERD und Barrett-Ösophagus beinhaltet einen mehrstufigen Prozess genetischer Instabilität. Die genetischen Veränderungen umfassen Onkogene, Tumorsuppressorgene und Mismatch-Repair-Gene. Es kommt zur Überexprimierung bzw. Unterexprimierung von Faktoren, die den Zellzyklus steuern bzw. für den Selbstschutz der Zelle verantwortlich sind [36]. Abbildung 1-12 zeigt in der Übersicht einige dieser Faktoren und deren komplexes Zusammenspiel.

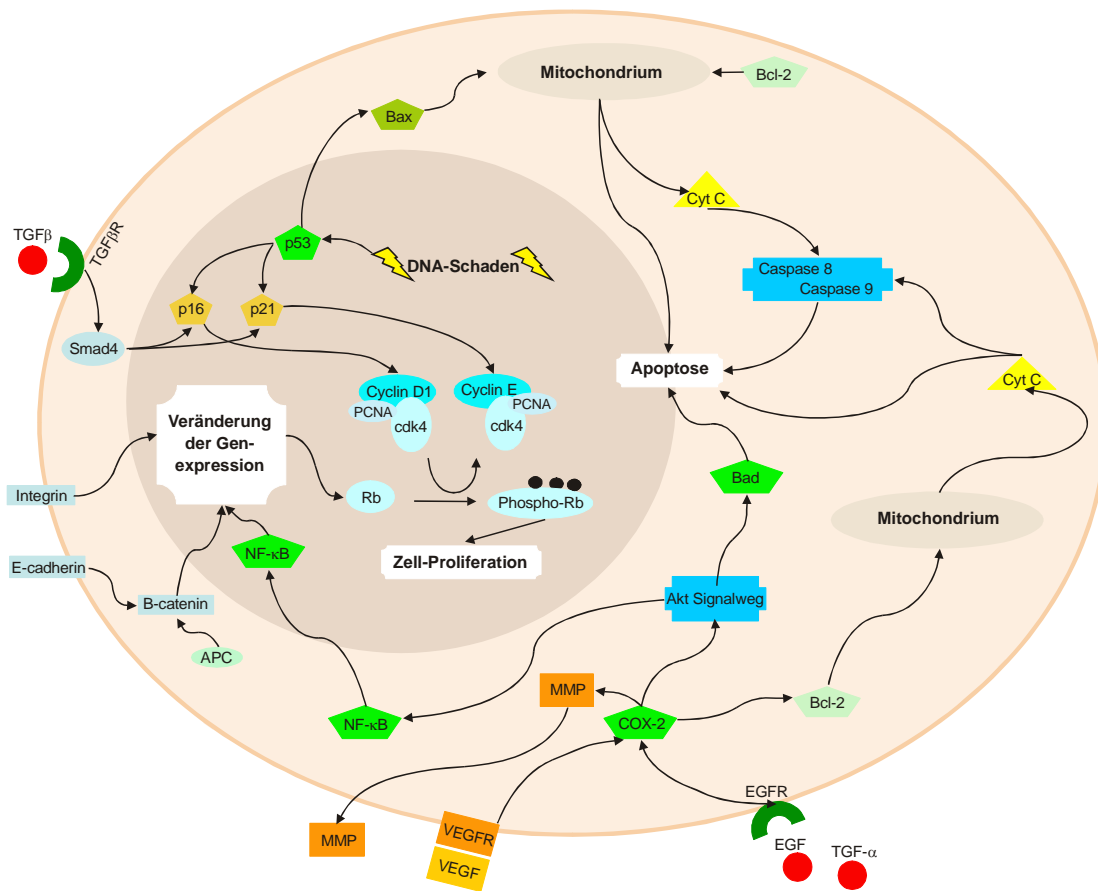


Abbildung 1-12: Schematische Darstellung der Beziehung einzelner molekularer Faktoren von prognostischer Bedeutung bei Patienten mit EAC [36]

(Akt: Proteinkinasen, APC: Adenomatosis Polyposis Coli, Bad: Bcl-2 associated death factor, Bax: Bcl associated X protein, Bcl-2: B-cell lymphoma 2, Cdk2/Cdk4: Cyclin-dependent kinases 2/4, COX-2: Cyclooxygenase 2, Cyt C: Cytochrom C, EGF: Epidermal Growth Factor, EGFR: EGF-Rezeptor, MMP: Matrix Metalloproteinase, NF-κB: Nuclear Factor κB, p16/p21/p53: Proteine, PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen, Rb: Retinoblastoma Protein, Smad4: Mother against decapentaplegic homolog 4, TGFα/TGFβ: Transforming Growth Factor α/β, TGFβR: TGFβ-Rezeptor, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-R: VEGF-Rezeptor)

Für die Entwicklung des Adenokarzinom wird kein einzelner auslösender Faktor als hauptverantwortlich betrachtet, vielmehr spielt eine Vielzahl von Faktoren zusammen. Im Folgenden sollen einige ausgewählte Faktoren näher erläutert werden.

P53 stellt einen wichtigen Faktor für die Bewahrung der genomischen Integrität dar. Durch eine Schädigung der DNA kommt es zur erhöhten p53-Ausschüttung. Der normale Zellzyklus wird unterbrochen, um eine DNA-Reparatur zu ermöglichen. Kann der Schaden nicht repariert werden wird p53 weiter exprimiert und dadurch Apoptose induziert. Mutationen am p53-Gen, die diesen Mechanismus außer Kraft setzen, kommen in fast allen humanen Krebsarten vor [37] und das Adenokarzinom des Ösophagus bildet hier keine Ausnahme. 75-80% aller Patienten mit EAC weisen eine Mutation dieses Tumorsuppressorgens auf, dabei scheint es eine der frühen genetischen Veränderungen zu sein; 14% aller Patienten mit einem Barrett-Ösophagus, 42% mit einer geringgradigen und 79% mit einer hochgradigen Dysplasie zeigen ebenfalls diese Veränderung [37].

Die gestörte Regulation des Zellzyklus während der Entwicklung einer Dysplasie hängt auch mit der gesteigerten Ausschüttung von Cyclin D1 zusammen. Bei Barrett-Patienten mit erhöhtem Cyclin D1 wurde ein gesteigertes Risiko für die Entstehung eines EAC festgestellt [38].

EGF und TGF- $\alpha$  haben im gesamten Gastrointestinaltrakt einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum der Epithelzellen durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor. Die Überexpression dieser beiden Faktoren fördert die Proliferation der Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass bei EAC Patienten die Expression dieser Faktoren erhöht war [39].

Das COX-2 Enzym wird in gesundem Gewebe kaum exprimiert, seine Aktivität wird erst durch den Einfluss von Cytokinen oder Endotoxinen induziert. Die COX-2 unterstützt die Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure, die unter anderem normale zum Zelltod führende Prozesse unterbrechen [40]. Die COX-2 Aktivität ist im Barrett-Ösophagus erhöht, und scheint durch den Einfluss von Magensäure und Gallensäure gesteigert zu werden. Eine COX-2-Überexpression im Epithel zeigen 75% aller Patienten mit ausgeprägtem Barrett-Ösophagus, 83% der Patienten mit geringgradiger Dysplasie und alle Patienten mit hochgradiger Dysplasie oder EAC [41].

Stickstoffoxid (NO) ist ein Entzündungsmediator, besitzt aber auch mutagene Eigenschaften. NO wird durch Oxidation von L-Arginin gebildet, welche durch die induzierbare Stickstoffoxid-Synthetase (iNOS) katalysiert wird. Durch Reaktion mit NO werden reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies gebildet, die dann zu Mutationen, vor allem im p53-Gen führen können. Eine erhöhte iNOS-Aktivität wurde bei 30% der GERD-Patienten, bei 48% der Barrett-Patienten und 63% der EAC-Patienten gefunden [42]. Der komplexe Einfluss nitrosierender Verbindungen auf die Entstehung des Adenokarzinoms wird im folgenden Kapitel noch ausführlicher besprochen.

### 1.2.2.4 Einfluss Reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Reaktive Sauerstoff- (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) dienen im Körper dem Abfangen von schädlichen Stoffen, da beide Verbindungsklassen eine hohe Reaktivität aufweisen. Von „oxidativen Stress“ spricht man, wenn das Gleichgewicht zwischen der Bildung von ROS/RNS und der Entgiftung gestört ist, d.h. die reaktiven Spezies im Überschuss vorliegen.

ROS werden vor allem durch enzymatische Prozesse an der Mitochondrienmembran aus Triplet-Sauerstoff gebildet. Eine zentrale Rolle nimmt dabei das Superoxid-Anion-Radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) ein; durch Dismutasen entsteht Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das im Weiteren durch Elektronentransfer zum Hydroxylradikal ( $HO^{\cdot}$ ) umgewandelt werden kann [43].

RNS können entweder durch die oben beschriebene Stickstoffoxid-Synthetase entstehen oder aber durch Nitrat ( $NO_3^-$ ), das vor allem mit der Nahrung aufgenommen wird. Die Mikroflora der Mundhöhle kann 5% bis 90% des Nitrats zu Nitrit ( $NO_2^-$ ) reduzieren. Im sauren Milieu am Übergang zwischen Speiseröhre und Magen entsteht dann aus Nitrit Salpetrige Säure ( $HNO_2$ ) und weitere nitrosierende Verbindungen ( $N_2O_3$ ,  $NO^+$ ,  $NOSCN$ ). Diese können mit sekundären Aminen zu Nitrosaminen reagieren. Die aktiv in den Magen sezernierte Ascorbinsäure kann die nitrosierenden Verbindungen weiter zu Stickstoffoxid ( $NO$ ) reduzieren. Das  $NO$  kann durch die Zellmembran diffundieren und dort mit Sauerstoff ebenfalls nitrosierende Spezies bilden [44] (Abbildung 1-13).

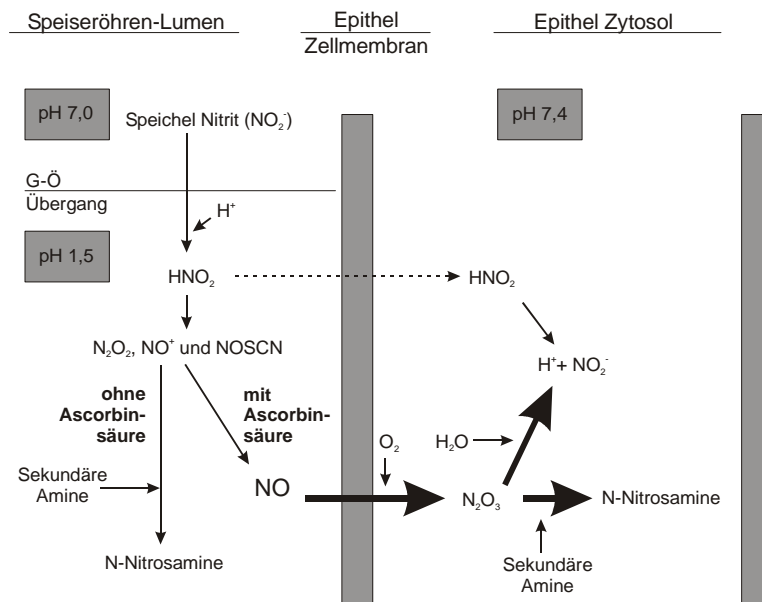


Abbildung 1-13: Vereinfachte Übersicht der chemischen Reaktionen im sauren Milieu des gastroösophagealen Übergangs mit Nitrit aus dem Speichel [44]

Die reaktiven Spezies können entweder direkt mit Biomolekülen wie Proteinen und DNA reagieren oder durch Oxidation der ungesättigten Fettsäuren in der Lipid-Doppelmembranen deren Struktur schädigen [43].

Barrett-Patienten leiden häufig unter Reflux, bei dem der pH-Wert in der Speiseröhre bis unter 2 fallen kann. *In vitro* Versuche an Ösophaguszellen zeigen, dass bei einem pH-Wert von 2 vermehrt ROS gebildet werden [45,46]. Durch oxidativen Stress kommt es in der Barrett-Mucosa zu erhöhter Schädigung der DNA [47], insbesondere zu einem starken Anstieg des 8-Hydroxy-Desoxyguanins [46]. Zusätzlich können Gallensäuren beim duodenalen Reflux die Entstehung von ROS erhöhen [48,49]. Dies zeigt sich auch im Modell des experimentell erzeugten Duodenalreflux an Ratten, in dem durch Nitrosierung von Glyko- und Taurocholsäure neue endogene DNA-Addukte entdeckt wurden [50].

### 1.3 Nitrosamine

Die Stoffklasse der Nitrosamine umfasst Verbindungen, deren charakteristisches Strukturmerkmal die Gruppierung N-NO ist, die zwei organische Molekülreste verbindet. Ihre Bedeutung als Schadstoffgruppe liegt in erster Linie in der eindeutig krebserregenden Wirkung der meisten Vertreter.

#### 1.3.1 Exogene und endogene Bildung

Wie bereits weiter oben erläutert, entstehen Nitrosamine aus der Reaktion sekundärer Amine mit salpetriger Säure. Sie können auch aus primären Aminen, Diaminen und tertiären Aminen gebildet werden. Nitrosamine konnten in einer Vielzahl von Lebensmitteln vor allem tierischer Herkunft nachgewiesen werden (Tabelle 1-3). Wichtigste Vertreter aus der Klasse der Nitrosamine sind hier das Dimethylnitrosamin und das Nitrosopyrrolidin. Bei Fleischwaren wurde gezeigt, dass der Bratvorgang den Gehalt an Nitrosaminen noch steigern kann [51].

Aber auch im Körper werden Nitrosamine gebildet, z.B. wie oben beschrieben im sauren Milieu des gastroösophagealen Überganges. Ein Hauptfaktor ist dabei die aufgenommene Menge an Nitrat. Vor allem Pflanzen können eine beachtliche Menge (4000 mg/kg Frischgewicht) Nitrat enthalten. Dabei hängt der Nitratgehalt stark von Bodenbeschaffenheit, Licht und Düngung ab. Weitere Quellen stellen tierische Lebensmittel und das Trinkwasser dar. Allerdings entsteht Nitrat endogen auch über das von Arginin gebildete NO. NO wird zu  $N_2O_3$  oxidiert, reagiert mit Wasser zu Nitrit und Hämoglobin oxidiert dann das Nitrit zu Nitrat. Dieses Nitrat wird in den Speichel sezerniert. Insgesamt wird im menschlichen Körper täglich mit ca. 1 mg/kg Körpergewicht ebensoviel Nitrat gebildet, wie über die Nahrung aufgenommen wird [51].

Tabelle 1-3: Gehalte verschiedener Nitrosamine in Lebensmitteln [51]

Lebensmittel	Verbindung <sup>a</sup>	Menge µg/kg
Frankfurter Würstchen	NDMA	0 – 84
Fisch, roh	NDMA	0 – 4
Fisch, geräuchert und mit Nitrit oder Nitrat behandelt	NDMA	4 – 26
Fisch gebacken	NDMA	1 – 9
Käse (Danish Blue, Gouda, Tilsiter, Ziegenmilchkäse)	NDMA	1 – 4
Salami	NDMA	10 – 80
Schinkenspeck, Rauchfleisch	NDMA	1 – 60
Pfefferschinken, roh und gebraten	NPIP	4 – 76
	NPYR	1 – 78

<sup>a</sup> NDMA: *N*-Nitrosodimethylamin, NPIP: *N*-Nitrosopiperidin, NPYR: *N*-Nitrosopyrrolidin.

### 1.3.2 Tabakspezifische Nitrosamine

Die tabakspezifischen Nitrosamine (TSNA) entstehen während der Tabakverarbeitung aus Tabakalkaloiden und sind deshalb sowohl in unverbranntem Tabak als auch im Tabakrauch vorhanden. Haupttabakalkaloid ist das Nicotin, es liegt im unverbrannten Tabak, je nach Sorte, mit 5 bis 180 mg/g vor. Durch oxidative Spaltung der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung entsteht aus dem tertiären Amin Nicotin das Nitrosaminoketon 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und ein Aldehyd, das 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanal (NNA). Nach Abspaltung der Methylgruppe des Nicotins entsteht *N'*-Nitrosornicotin (NNN) [52].

Aus weiteren Alkaloiden, die in geringeren Mengen im Tabak vorkommen, wie Nornicotin, Cotininsäure, Anabasin und Anatabin, die sekundäre Amine sind, entstehen NNN, 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure (iso-NNAC), *N'*-Nitrosoanatabin (NAT) und *N'*-Nitrosoanabasin (NAB) (Abbildung 1-14). Durch Reduktion der Aldehyd- bzw. Ketonfunktion entstehen 4-(Methylnitrosamino)-4(3-pyridyl)-1-butanol (iso-NNAL) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) [53].

Bis auf das NNA konnten alle Nitrosamine sowohl im unverbrannten Tabak, als auch im Hauptstrom- und Nebenstromrauch nachgewiesen werden (Tabelle 1-4). Komponenten des Hauptstromrauchs werden aktiv vom Raucher während des Zuges an der Zigarette aufgenommen,

Nebenstromrauch bezeichnet den Rauch, der zwischen den einzelnen Zügen entsteht. Die Belastung der Raumluft (environmental tobacco smoke, ETS) stellt daher immer eine Mischung aus Komponenten des Nebenstromrauchs und des ausgeatmeten Hauptstromrauchs dar. Unterschiede in der Zusammensetzung ergeben sich aus den unterschiedlichen Verbrennungstemperaturen während eines Zuges und in den Zugpausen. Die TSNA entstehen während der unterschiedlichen Trocknungs- und Fermentierungsprozesse des Rohtabaks, aber auch während der Verbrennung des Tabaks steigt die Nitrosaminbelastung des Rauches an. Und letztlich kommt es zur Bildung der TSNA durch endogene Nitrosierungsprozesse im menschlichen Körper.

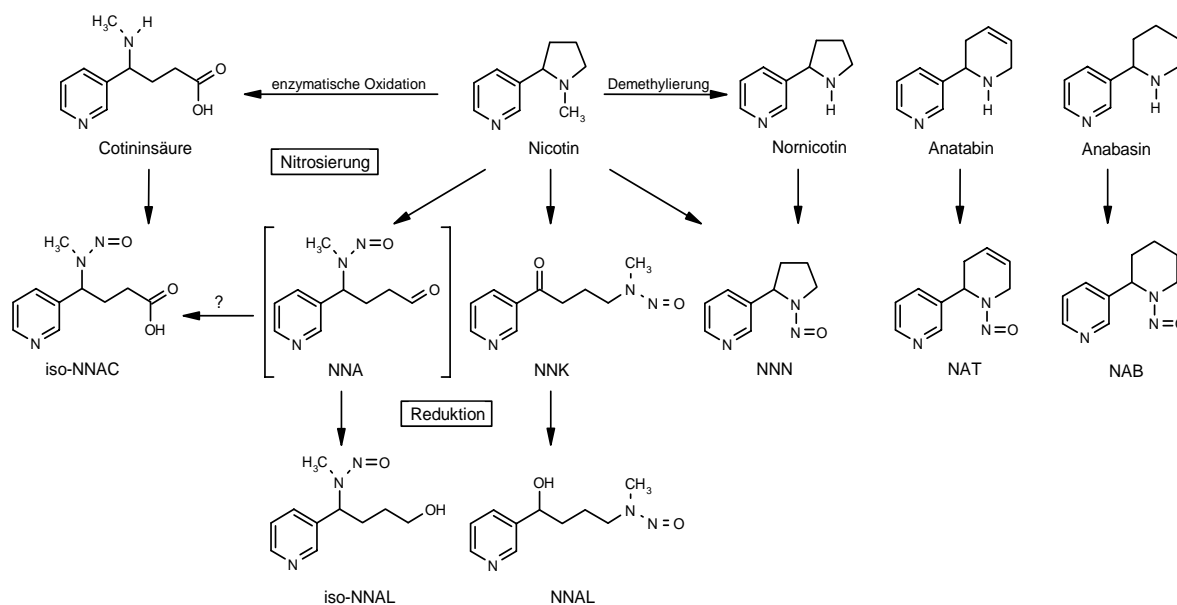


Abbildung 1-14: Bildung tabakspezifischer Nitrosamine aus Tabakalkaloiden [53]

(NNK: 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon, NNN: N'-Nitrosornicotin, NAT: N'-Nitrosoanatabin, NAB: N'-Nitrosoanabasin, iso-NNAC: 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure, NNA: 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanal, iso-NNAL: 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol, NNAL: 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol)

Tabelle 1-4: Konzentration tabakspezifischer Nitrosamine in Tabak, Zigarettenrauch und Umgebungsluft [54,55]

	NNN	NNK	NAB + NAT
Zigarettentabak [ $\mu\text{g/g}$ ]	0,3 – 5,3	0,1 – 0,96	0,25 – 2,3
Hauptstromrauch [ng/Zigarette]	66 – 490	17 – 180	100 – 740
Nebenstromrauch [ng/Zigarette]	185 – 340	390 – 750	125 – 680
Umgebungsluft [ $\mu\text{g/m}^3$ ]		0,8 – 3,2 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup> bei 0 bis 30 gerauchten Zigaretten.

## 1.4 Myosmin

Myosmin ist ein Tabakalkaloid; das im Gegensatz zu den anderen Alkaloiden der Tabakpflanze eine Imin-Bindung im Pyrrolidinring aufweist. Diese strukturelle Besonderheit führt dazu, dass in wässriger Lösung unter Säurezugabe der Iminring geöffnet wird (Abbildung 1-15), es bildet sich eine primäre Aminogruppe und in 1-Position eine Ketogruppe. Diese Keto-Imin-Tautomerie ist pH-abhängig, bei physiologischem pH ( $\text{pH} = 7,4$ ) liegt das Gleichgewicht weit auf der linken Seite, ca. 1% des Myosmins liegen in der offenkettigen Aminoketonform vor [56,57].

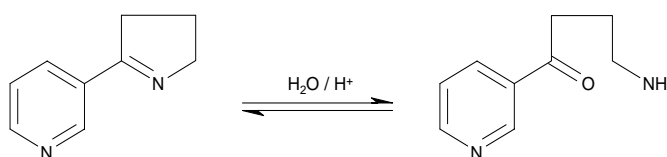


Abbildung 1-15: pH-abhängiges Hydrolysegleichgewicht von Myosmin in wässriger Lösung

### 1.4.1 Myosmin im Tabakrauch

Myosmin hat nur einen geringen Anteil an der Alkaloidfraktion der Tabakpflanze. In einer luftgetrockneten dunklen Tabaksorte hatte Myosmin einen Anteil von 0,2 bis 1,1% am Gesamtalkaloidgehalt [58]. Je nach Tabaksorte und Herstellungsprozess kann der Myosmingehalt zwischen 9 und 28  $\mu\text{g/g}$  liegen [59]. Myosmin entsteht in den Blättern durch Metabolisierung von Nicotin. Dabei wird zunächst durch Demethylierung Nornicotin und durch weitere Dehydrogenierung Myosmin gebildet, in weiteren Folgereaktionen wird Myosmin zur Nicotinsäure abgebaut (Abbildung 1-16) [60].

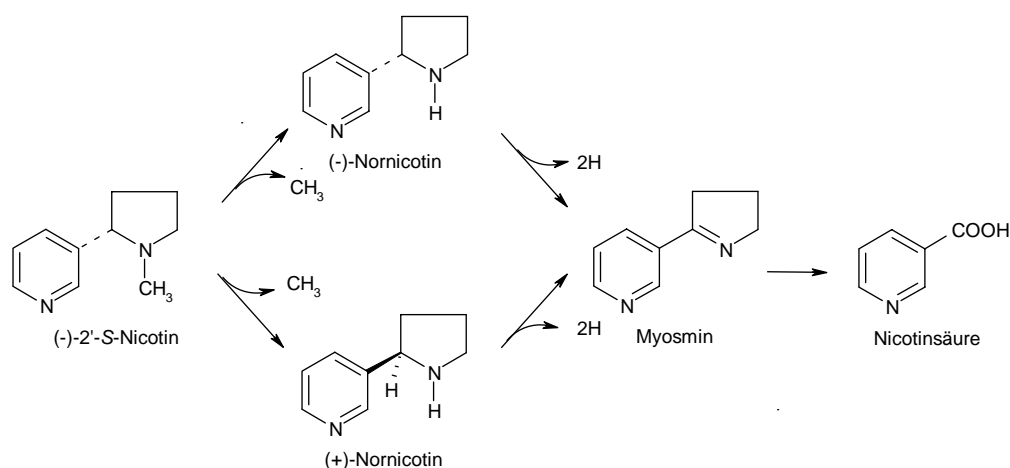


Abbildung 1-16: Vereinfachte Darstellung der Bildung von Nornicotin und Myosmin aus Nicotin im Blatt der Tabakpflanze

Im Hauptstromrauch von Zigaretten wurden Myosminkonzentrationen von 13 und 33  $\mu\text{g}$  pro Zigarette gemessen, im Nebenstromrauch 73 bis 224  $\mu\text{g}$  pro Zigarette [61]. Myosmin belastet die Luft von Räumen, in denen häufig geraucht wird, mit 0,04 bis 0,185  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  [62].



### 1.4.2 Myosmin in Nahrungsmitteln

Myosmin wurde nicht nur in der Tabakpflanze sondern auch in anderen Pflanzen identifiziert. In Papaya (*Carica papaya*) [63,64], im Nachtjasmin (*Cestrum nocturnum*) [65] und *Duboisia hopwoodii* [66,67], einer Pflanze aus der Familie der *Solanaceae*, die vor allem in Australien beheimatet ist, konnten Spuren von Myosmin nachgewiesen werden, allerdings immer in Verbindung mit dem Auftreten von Nicotin. Erste Hinweise auf eine wesentlich weitere, von Nicotin unabhängige Verbreitung ergaben Untersuchungen von *Zwickenpflug et al.* [68], die 0,2 bis 2,0 µg/g Myosmin in Erd- und Haselnüssen nachweisen konnten. Im Weiteren wurde Myosmin in einer Fülle von weiteren pflanzlichen Nahrungsmitteln gefunden (Tabelle 1-5). Dabei zeigte sich keine eindeutige Familien- oder Gattungsabhängigkeit. Auch in Milchprodukten wurde Myosmin in Konzentrationen bis über 6 ng/g nachgewiesen [68,69].

Tabelle 1-5: Vorkommen von Myosmin in pflanzlichen Nahrungsmitteln und Milchprodukten [68,69]

Myosmin nachgewiesen			Myosmin nicht nachgewiesen	
Pflanzenfamilie	Quelle	Konzentration [ng/g]	Pflanzenfamilie	Quelle
Haselgewächse (Corylaceae)	Haselnuss	0,7	Korbblütler (Compositae lig.)	Blatssalat
Schmetterlingsblütler (Papilionaceae)	Erdnuss	0,2 – 2,0	Gänsefußgewächse (Chenopodiaceae)	Spinat
Nachtschattengewächse (Solanaceae)	Kartoffel Tomate	2,41 – 4,47 0,53 – 0,66	Kürbisgewächse (Scrophulariaceae)	Gurke
Doldenblütler (Apiaceae)	Karotte	0,01 – 0,03	Lauchgewächse (Liliaceae)	Zwiebel
Sterkuliengewächse (Sterculiaceae)	Kakao	0,68 – 0,85	Weinrebengewächse (Vitaceae)	Weintraube
Rosengewächse (Rosaceae)	Apfel	1,12 – 1,25	Bananengewächse (Musaceae)	Banane
Ananasgewächse (Bromeliaceae)	Ananas	0,66 – 0,72	Rautengewächse (Rutaceae)	Mandarine Zitrone
Strahlengriffelgewächse (Actinidiaceae)	Kiwi	1,15 – 1,61		
Sauergräser	Hirse	0,41 – 0,43		
Süßgräser (Graminaceae)	Weizen Reis Mais	0,37 – 0,51 0,19 – 1,15 0,48 – 1,60		
Milchprodukte	Milch Sahne	1,16 – 1,35 5,93 – 6,26		

### 1.4.3 Toxikologische Eigenschaften von Myosmin

Allgemein existieren zur Toxizität von Myosmin bislang wenige Daten [70,71]. Es liegt nur eine Studie zur LD<sub>50</sub> von Myosmin an Ratten vor [72]. Bei oraler Gabe ist Myosmin mit einer LD<sub>50</sub> von 1875 mg/kg etwa zehnfach „weniger giftig“ als Nicotin. Bei intraperitonealer Injektion liegt der LD<sub>50</sub>-Wert bei 190 mg/kg. Bei Myosmin stehen wie bei Nicotin Konvulsionen als Vergiftungserscheinung im Vordergrund, die bei Myosmin etwas schwächer ausgeprägt sind. Bei Hamstern ergaben sich Hinweise auf eine schwache Störung der Fruchtbarkeit [73].

Im Ames-Test konnte keine mutagenen Eigenschaften für Myosmin nachgewiesen werden, jedoch wurde die Induktion von DNA-Schäden im Testsystem *Escherichia coli* polA<sup>+</sup>/polA<sup>-</sup> beobachtet [74]. In humanen Nasenschleimhautzellen und Lymphozyten zeigte Myosmin nach *in vitro* Inkubation eine konzentrations- und zeitabhängige Schädigung der DNA im Comet Assay [75]. Dieser genotoxische Effekt konnte in humanen Ösophagus-Adenokarzinomzelllinien bestätigt und durch Inkubation in saurem Milieu oder durch Zugabe nitrosierender Substanzen gesteigert werden [76]. Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf eine Hemmung der O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase durch Myosmin. In humanen Lymphozyten wird auch die Mutationsfrequenz im Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen durch Myosmin erhöht [77].

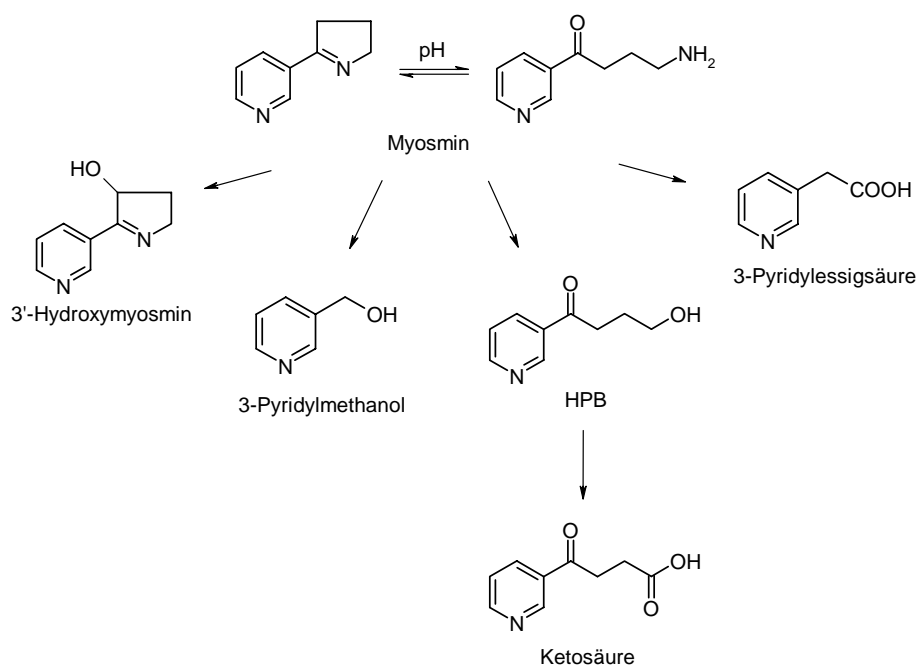


Abbildung 1-17: Metaboliten im Urin von Wistarratten nach oraler Gabe von Myosmin [78]

Untersuchungen zur Toxikokinetik von Myosmin an Ratten zeigten eine Anreicherung von <sup>14</sup>C-markiertem Myosmin in Drüsengewebe, wie Tränen-, Speichel-, Geschlechtsdrüsen, Leber, Nierenrinde und Ösophagus und im Melanin der Haut und der Netzhaut [79]. Die rasche Elimination mit einer Halbwertszeit von ca. 1 Stunde wurde in einem weiteren Versuch zur

Ausscheidung von Myosmin bestätigt [78]. Tritium-markiertes Myosmin wurde nach oraler Gabe innerhalb von 24 h zu über 90% weitgehend im Urin ausgeschieden (Abbildung 1-17). Mehr als 70% der Radioaktivität im Urin entfielen auf die beiden Hauptmetaboliten Ketosäure (50-63%) und 3-Pyridylessigsäure (20-26%).

## 1.5 Biomonitoring

Biomarker stellen charakteristische Kenngrößen dar, die objektiv gemessen, als Indikator eines normalen physiologischen Prozesses, eines pathologischen Prozesses oder einer medikamentösen Behandlung dienen [80].

In der Arbeits- und Umweltmedizin dient das Biomonitoring der Abschätzung der Belastung des Menschen und des damit verbundenen Gesundheitsrisikos durch Chemikalien in der Umwelt [81]. Unterschieden wird zwischen dem Marker der Dosis, des biochemischen Effekts und des biologischen Effekts. Bei der Bestimmung einer internen Dosis eines Biomarkers werden die Konzentrationen der schädlichen Substanz bzw. ihrer Metaboliten in Körperflüssigkeiten, wie Blut und Urin, gemessen. Im Gegensatz zum reinen Nachweis einer Chemikalie in der Umwelt wird hier das Ausmaß der Exposition des Stoffes bestimmt, unabhängig von der Aufnahme, ob oral, dermal oder inhalativ [81].

Das Biomonitoring des biochemischen Effektes umfasst erste Reaktionsprodukte der Chemikalien mit Biomolekülen wie Proteinen, z.B. Hämoglobin, und DNA. Dabei dienen Hämoglobin-Addukte als Surrogatmarker für DNA-Addukte. Mutagene Stoffe reagieren mit den nukleophilen Bereichen des Hämoglobins, z.B. Sulfhydrylgruppen des Cysteins, Stickstoffgruppen des Histidins oder dem N-terminalen Valin. Die reaktiven ultimalen Kanzerogene werden meist nicht in den Erythrozyten gebildet, sondern in metabolisch kompetenten Zellen, und müssen erst eine Zellmembran überwinden, bevor sie mit dem Biomolekül reagieren können. Hämoglobin-Addukte sind chemisch stabil und unterliegen im Vergleich zu DNA-Addukten keinen Reparaturmechanismen. Dies dürfte einer der Gründe dafür sein, dass in einigen Studien keine Korrelation zwischen Proteinaddukten und den DNA-Addukten im Zielgewebe gezeigt werden konnten [82,83].

Marker des biologischen Effekts dienen dann der Erfassung erster biologischer Effekte durch den Einfluss chemischer Substanzen wie Schwesterchromatidaustauschraten, Micronuclei oder Enzym-Aktivitäten [81].

Das Biomonitoring umfasst eine Vielzahl unterschiedlichster Matrices und Substanzen. Daher liegt auch eine Vielzahl analytischer Methoden zur Erfassung der Biomarker vor. Im Folgenden soll hier nur kurz auf wichtige Methoden zur Bestimmung von DNA-Schäden eingegangen werden, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

## 1.5.1 Messmethoden

### 1.5.1.1 $^{32}\text{P}$ -Postlabeling

Diese Methode dient dem semi-quantitativen Nachweis von DNA-Addukten in Geweben. Zunächst wird die DNA extrahiert und dann enzymatisch zu den entsprechenden Desoxyribonukleotid-3'-Monophosphaten verdaut. Das Hydrolysat wird mittels T4 Polynukleotidkinasen und radioaktivem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  entweder direkt oder nach chromatographischer Anreicherung markiert, um die entsprechenden  $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{Desoxyribonukleotid-3',5'-bisphosphate}$  zu erhalten. Die  $^{32}\text{P}$ -markierten DNA-Addukte werden anschließend chromatographisch über Dünnschichtplatten oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von den natürlichen Nukleotiden getrennt und über Radioaktivitätsmessung quantifiziert. Mit Hilfe des  $^{32}\text{P}$ -Postlabelings können komplexe Gemische von DNA-Addukten nachgewiesen werden. Die größte Einschränkung dieser Methode liegt darin, dass eine Qualifizierung und Charakterisierung der spezifischen Addukte nur bedingt möglich ist [84]. Aber auch die reproduzierbare quantitative Bestimmung bereitet große Probleme [85].

### 1.5.1.2 Comet-Assay

Dieser Test weist die durch biologische, chemische oder physikalische Noxen hervorgerufene DNA-Schädigung in isolierten Zellen nach. Nach alkalischer Lyse der Zellen wird die DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Geschädigte DNA zeigt nach der Wanderung in der Elektrophorese anstelle eines Kreises ein Bild, das aufgrund des Aussehens als „Comet“ bezeichnet wird. Der Test kann praktisch an allen zu Einzelzellen separierbaren Geweben sowohl nach *in vitro* wie auch *in vivo* Belastung mit den Prüfsubstanzen durchgeführt werden und eignet sich für das Biomonitoring als Effektmarker [86]. In seiner alkalischen Form weist der Comet-Assay Einzel- und Doppelstrangbrüche nach. Einzelstrangbrüche werden schnell repariert, so dass sie kaum zu letalen oder mutagenen Schäden führen. Bei der Exzisionsreparatur entstehen kleine DNA-Fragmente, diese bilden ebenfalls einen Teil des Schweifes. Als Maß für die Schädigung der DNA, dient das Olive Tail Moment (OTM). Es berechnet sich aus dem Anteil der DNA im Schweif, multipliziert mit der mittleren Wegstrecke der DNA. Zusätzliche Informationen lassen sich durch den Einsatz von Reparaturenzymen gewinnen. Die DNA wird nach der Lyse auf dem Gel mit läsionsspezifischen Reparaturenucleasen behandelt, die am Ort der Schädigung Strangbrüche bilden. Durch die Behandlung mit Endonuclease III können beispielsweise oxidierte Pyrimidine nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Formamidopyrimidinglykosylase (FPG) dient dem Nachweis von 8-Hydroxyguanin, das durch oxidativen Stress entsteht [86]. Die Oxidation der Basen kann zu falschen Basenpaarungen und damit zu einer Veränderung der genetischen Information bzw. Mutationen führen.

### 1.5.1.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Gaschromatographie ist ein in der allgemeinen Analytik häufig verwendetes Verfahren zur Trennung von flüchtigen Substanzen. Ein Gaschromatograph besteht aus einer Trägergasversorgung, einem Injektor, einer Trennsäule, einem Säulenofen und einem Detektor. Die Probe wird in das Gerät injiziert und mit Hilfe eines inerten Trägergases (Stickstoff, Helium) auf die so genannte Trennsäule aufgebracht. Die Säule besteht aus einer langen Glas-Silica-Kapillare, die mit einer hochviskosen, nichtflüchtigen Flüssigkeit, die als stationäre Phase dient, beschichtet ist. Die Trennung des Substanzgemisches erfolgt zum einen über das unterschiedliche Adsorptions- bzw. Lösungsverhalten der einzelnen Komponenten an der stationären Phase und zum anderen über das unterschiedliche Siedeverhalten [87].

Die Stoffe werden dann zur eindeutigen Identifizierung, sowie zur Quantifizierung in ein Massenspektrometer überführt. Im Hochvakuum werden die Substanzen am Säulenende in der Ionenquelle durch Elektronenbeschuss ionisiert. Man unterscheidet zwischen Elektronenstoßionisation (EI) und chemischer Ionisation (CI). Bei der EI werden die Teilchen mit Elektronen mit einer Energie von 70 eV beschossen, dadurch entstehen Radikal-Kationen. Im Weiteren kommt es zu zahlreichen Bindungsbrüchen, es entsteht ein substanzspezifisches Fragmentierungsmuster. Bei der positiven CI werden die Substanzen nicht direkt ionisiert, sondern durch Elektronenbeschuss eines zusätzlich eingeleiteten Ionisationsgases (Methan, Ammoniak) entstehen Kationen, die dann in weiteren Folgereaktionen die Substanzen ionisieren. In der negativen CI werden die Elektronen durch das Ionisationsgas abgebremst, es entstehen thermische Ionen, die dann die Analyten ionisieren.

Die negative CI wird auch als Elektroneneinfang-Ionisation bezeichnet. Die CI ist schonender als die EI, da weniger Fragmentierungsreaktionen auftreten und zählt zu den weichen Ionisationsarten [88]. Die so entstandenen geladenen Teilchen werden aus der Quelle heraus beschleunigt und durch elektromagnetische Linsen wird der Ionenstrahl fokussiert. Im folgenden Massenanalysator werden die Teilchen nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt und dann in einer Detektionseinheit registriert, verstärkt und als elektrisches Signal an einen Computer weitergegeben.

Von der Vielzahl an Massenanalysatoren sollen hier der Quadrupol und das Sektorfeld näher erläutert werden. Der Quadrupol besteht aus vier parallel im Quadrat angeordneten Metallstäben, von denen jeweils zwei kreuzweise miteinander verbunden sind. Legt man nun an den jeweils zwei gegenüberliegenden Stäben eine Wechselspannung an, so bilden sich abwechselnd positive und negative Felder. Die Wechselspannung ist zusätzlich mit einer Gleichspannung überlagert, die die Teilchen zur Mittelachse hin ablenkt. Durch geeignete Abstimmung der Gleich- und Wechselspannung erreicht man, dass jeweils nur Ionen einer Masse das Stabsystem

durchfliegen können [89]. Bei Sektorfeldgeräten werden die Ionen durch ein Magnetfeld abgelenkt. Die Teilchen beschreiben dabei eine Kreisbahn, wobei sich für jede Masse ein bestimmter Bahnradius ergibt. Je nach Einstellung treffen nur die gewünschten Teilchen auf den Detektor [89].

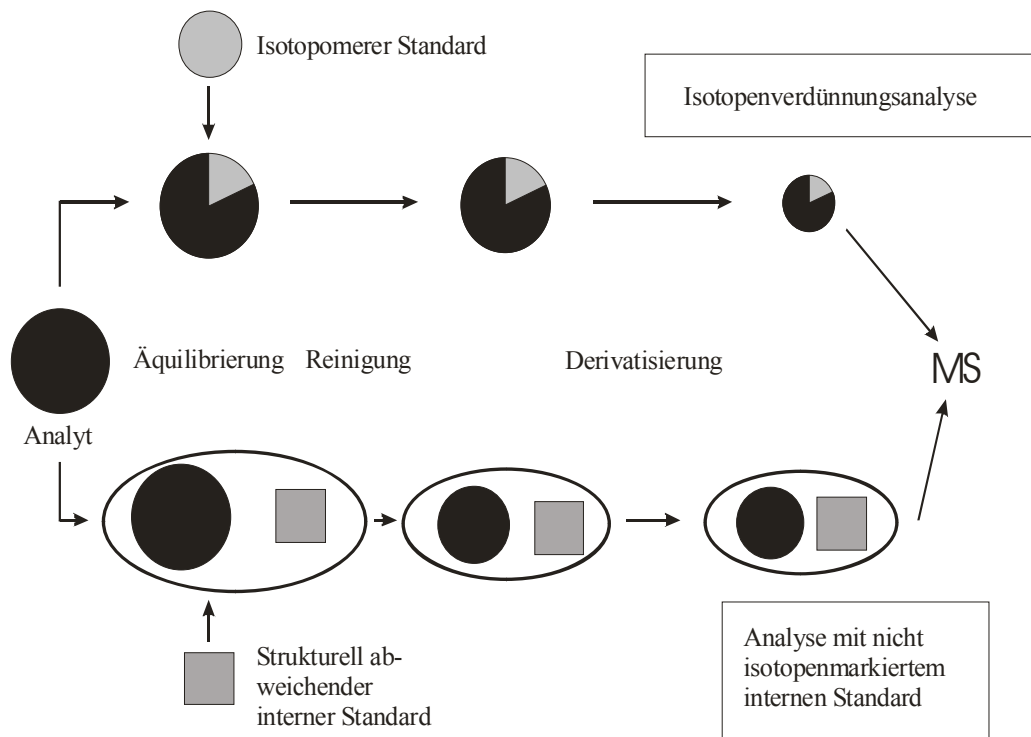


Abbildung 1-18: Prinzip der Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse im Vergleich zur konventionellen Methode des internen Standards [90]

Zur quantitativen Bestimmung wird in der Spurenanalytik der Probe meist ein interner Standard zugesetzt, der ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie die zu bestimmende Substanz besitzt. Um Fehler aufgrund unterschiedlichen Verhaltens bei der Probenvorbereitung, Extraktion und Aufreinigung gänzlich auszuschließen, liegt es nahe, als internen Standard den isotonenmarkierten Analyten zu verwenden ( $^2\text{H}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markiert), da etwaige Verluste an Analyten im selben Maße den Standard betreffen. Das Verhältnis Analyt zu Standard bleibt über die gesamte Analyse hinweg gleich (Abbildung 1-18). Im Massenspektrometer können dann Analyt und Standard getrennt werden. Bei genauer Kenntnis der eingesetzten Menge an isotopomerem Standard kann der Gehalt an Analyten berechnet werden [90].

### 1.5.2 Belastung mit TSNA und Bildung von DNA-Addukten

Rauchen wird mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht, vor allem Erkrankungen der Atemwege, Herz-Kreislaufkrankungen und Krebs [91]. Daher besteht ein großes Interesse daran, spezifische Marker zu finden, die helfen sollen sowohl die Belastung des einzelnen Individuums mit Tabakrauchinhaltsstoffen, als auch das individuelle Krankheitsrisiko besser

abschätzen zu können. Cotinin stellt einen der Hauptmetaboliten des Nicotins dar, es konnte im Blut, Urin und Speichel nachgewiesen werden. Cotinin ist aufgrund seiner längeren Halbwertszeit ( $t_{1/2} = 16$  h) im Vergleich zu Nicotin ( $t_{1/2} = 2$  h) besser geeignet, das Ausmaß einer Exposition mit Tabakrauch einzustufen. Raucher haben im Blutplasma durchschnittlich einen 100fach höheren Cotininlevel als Nichtraucher [92,93].

Unter den kanzerogenen Inhaltsstoffen sind lediglich die TSNA tabakspezifisch, da die anderen Substanzklassen, wie polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAH) oder aromatische Amine, auch während der Verbrennung anderen organischen Materials entstehen [94]. Auf Grundlage von experimentellen Daten an Versuchstieren und menschlichen Geweben wurden NNK und NNN von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als Human-Kanzerogene eingestuft [95]. Bei Ratte, Maus und Hamster fördert NNK die Bildung von Tumoren der Lunge, der Leber, der Bauchspeicheldrüse und der Nasenhöhle. NNN führt dagegen zu Ösophagustumoren, aber auch zu Tumoren der Nasenhöhle [96]. Die mutagene Wirkung beider Nitrosamine tritt erst nach metabolischer Aktivierung auf (Abbildung 1-19). Durch Reduktion der Carbonylgruppe des NNK entsteht NNAL. Dieser Schritt stellt keine Entgiftung dar, da NNAL eine ähnliche kanzerogene Wirkung wie die Ausgangssubstanz besitzt. Die Bildung von NNAL-Glucuroniden, sowohl an der Hydroxylgruppe als auch am Stickstoff des Pyridinrings (O- und N-Glucuronide) fördert wesentlich die Ausscheidung über den Urin und kann als reiner Entgiftungsweg bezeichnet werden. Die Glucuronidierung am Stickstoff des Pyridinrings ist ein weiterer Entgiftungsweg für NNK und NNN, der allerdings keine quantitative Bedeutung hat.

Die metabolische Aktivierung von NNK, NNN und NNAL erfolgt mittels Enzymen des Cytochrom P450-Systems (Abbildung 1-19). Durch Hydroxylierung der zur Nitrosogruppe benachbarten Kohlenstoffatome entstehen reaktive Zwischenstufen, die entweder mit Wasser abreagieren oder kovalente Bindungen mit DNA und Proteinen eingehen. Die 4-Hydroxylierung am Methylenkohlenstoff von NNK und NNAL führt zur Abspaltung eines Methyl-Diazohydroxids, welches ähnlich wie bei der metabolischen Aktivierung von Dimethylnitrosamin zur DNA-Methylierung führt. Nach 6-Hydroxylierung entstehen unter Formaldehydabspaltung ebenfalls Diazohydroxide, die mit der DNA Pyridyloxobutyl-(POB-) und Pyridylhydroxybutyl-(PHB)-Addukte bilden [97]. Bei NNN erfolgt nach heutigem Kenntnisstand nur die Hydroxylierung in der 2'-Position des Pyrrolidinring zu metabolischer Aktivierung durch Bildung von POB-Addukten [98]. Die Hydroxylierungen an anderen Positionen im Pyrrolidinring des NNN, im Pyridinring von NNK und NNN, sowie die N-Oxidation im Pyridinring von NNK, NNAL und NNN werden als Entgiftungsreaktionen gewertet.

Die in Abbildung 1-19 angegebenen DNA-Addukte konnten mittels LC-MS/MS *in vitro* und teilweise auch *in vivo* nach Gabe hoher Dosen von NNN, NNK und NNAL nachgewiesen werden [99]. Dabei zeigte sich, dass das Addukt mit den stärksten mutagenen Eigenschaften, das

POB-Addukt an der O<sup>6</sup>-Position des Guanins [100], nur in sehr geringem Maß gebildet wird [98,101]. Es wäre natürlich wünschenswert die spezifischen DNA-Addukte auch beim Bio-monitoring der TSNA-Belastung des Menschen zu erfassen. Die Analytik mit LC-MS/MS ist dafür allerdings noch nicht empfindlich genug.

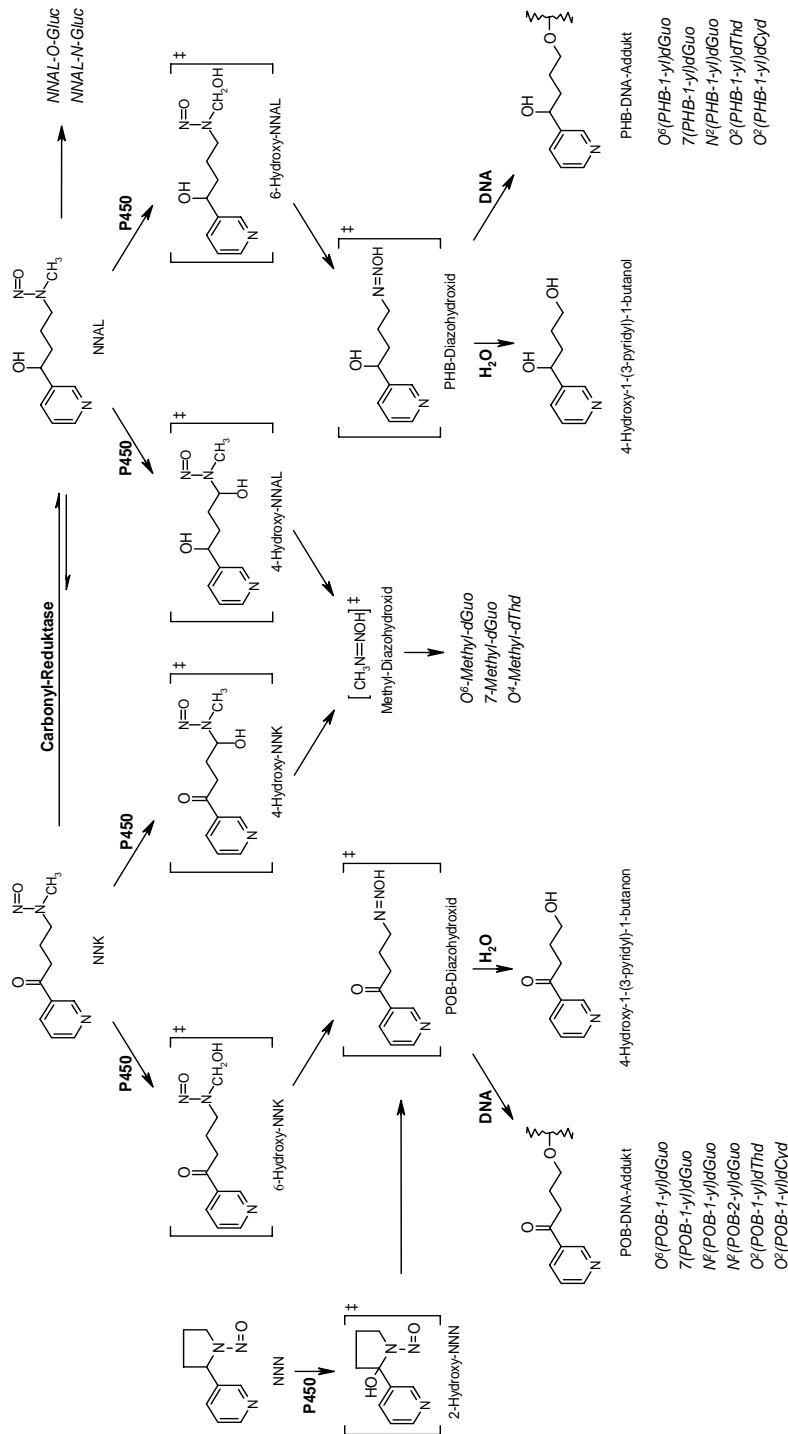


Abbildung 1-19: Metabolische Aktivierung der tabakspezifischen Nitrosamine NNK und NNN, Bildung von NNAL-Glucuroniden, Methyl-, POB- und PHB-DNA-Addukten [99]



Eine Alternative stellt die Bestimmung der Addukte nach hydrolytischer Abspaltung der POB-Gruppe von Hämoglobin und DNA dar. Das freigesetzte HPB kann nach Derivatisierung höchst empfindlich mit GC/MS nachgewiesen werden [83,102-106]. Dieser Nachweis hat gegenüber der Bestimmung von NNAL und seinen Glucuroniden im Urin den Vorteil, dass die metabolische Aktivierung der TSNA mit erfasst wird. Wegen der leichteren Zugänglichkeit und der höheren Konzentrationen wurden zuerst HPB-freisetzende Hämoglobinaddukte bestimmt, die man als Surrogatmarker der mutagenen Wirkung der TSNA bezeichnet, weil sie keine direkte Auskunft über die gewebespezifische Aktivierung in Zielorganen der Kanzerogenese gibt. Der Vergleich der Addukte bei Rauchern und Nichtrauchern ergab jedoch nur Unterschiede um das Zwei- bis Dreifache (Abbildung 1-20), viel weniger als zu erwarten war.

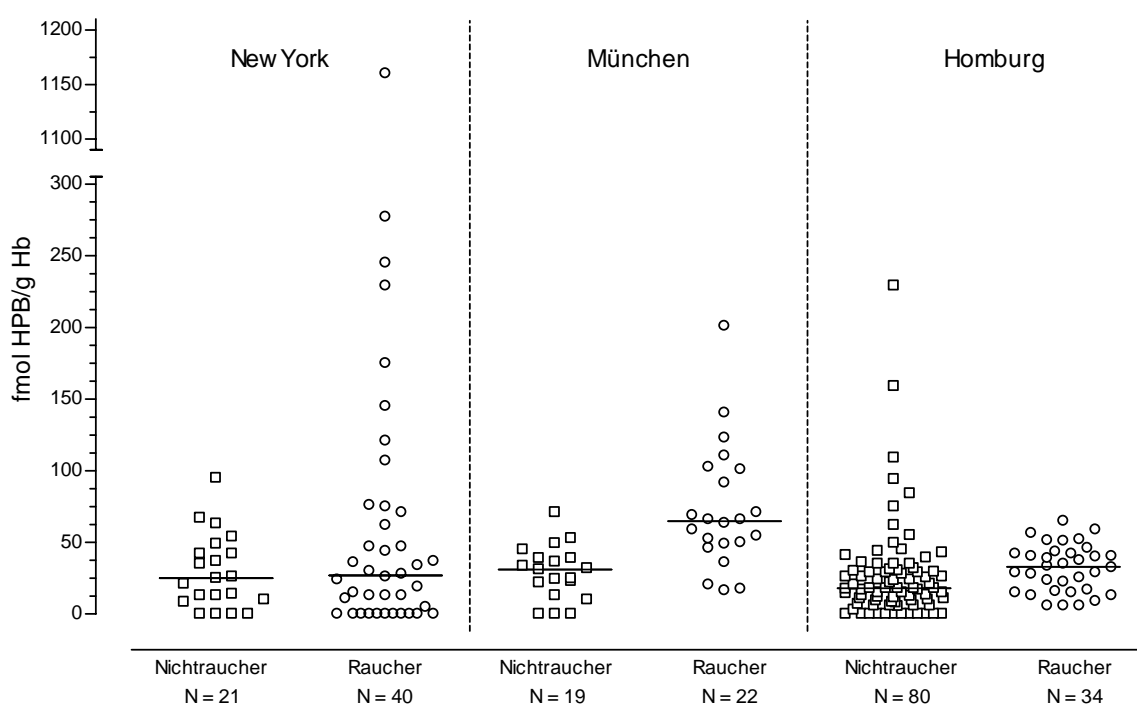


Abbildung 1-20: Hämoglobinaddukte tabakspezifischer Nitrosamine von Rauchern und Nichtrauchern aus New York [103], München [107] und Homburg [108]

Kurze Zeit nach den ersten Bestimmungen der HPB-freisetzenden Hämoglobinaddukte wurde von der Arbeitsgruppe von *Hecht* die Bestimmung von NNAL und seinen Glucuroniden ( $\Sigma$ NNAL) im Urin eingeführt [109]. In einer Vielzahl von Untersuchungen zeigten sich große Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern, die meist über einen Faktor von 70 lagen [110,111]. Im Gegensatz zu den Hämoglobinaddukten besteht eine hohe Korrelation mit den Cotininkonzentrationen, der Menge an gerauchten Zigaretten und dem Ausmaß der Passivrauchbelastung.

Nach einer Optimierung der Analytik konnten auch HPB-freisetzende DNA-Addukte zuverlässig gemessen werden [83]. Im peripheren Lungengewebe von Lungenkrebspatienten war die Konzentration bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern um das 7fache erhöht, es bestand aber

keine signifikante Korrelation mit den Hämoglobinaddukten [83]. In verschiedenen Organen akut Verstorbener ohne Krebserkrankung waren die Unterschied in den POB-DNA-Addukten, zwischen Rauchern und Nichtrauchern minimal (Abbildung 1-21) [112]. Wie schon für Hämoglobin gezeigt, stellen deshalb die HPB-freisetzenden Addukte auch für die DNA potenzieller Zielorgane der Kanzerogenese keine spezifischen Marker der Belastung mit TSNA dar.

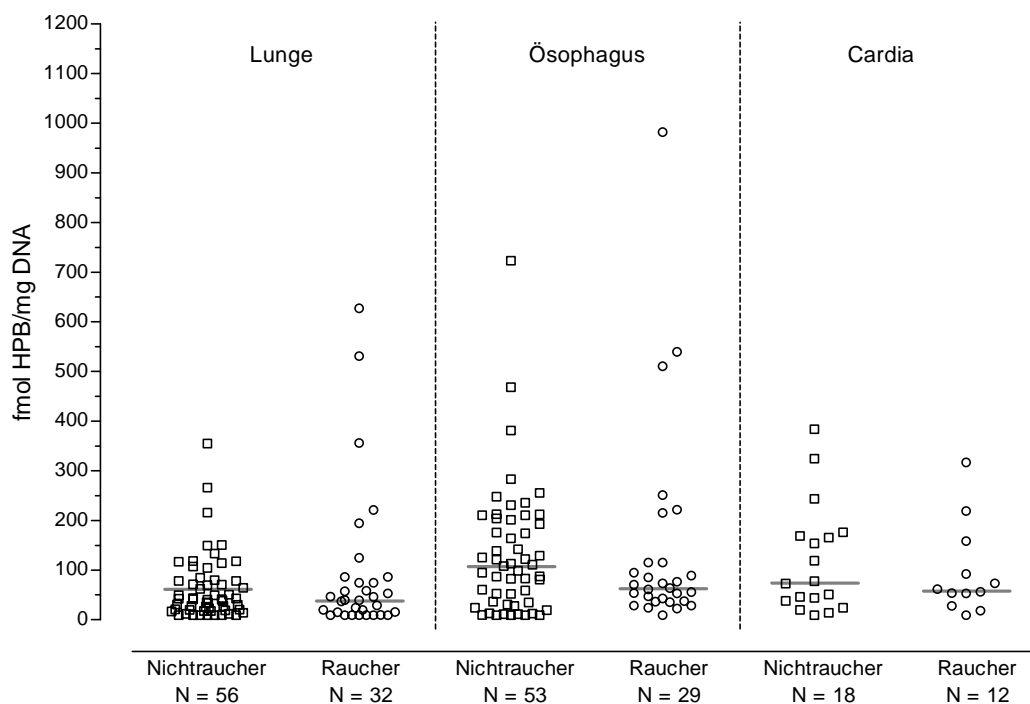


Abbildung 1-21: POB-DNA-Adduktlevel in Lunge, Ösophagus und Cardia von Rauchern und Nichtrauchern [112]

Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft der einzelnen Nicotinoide wurde nach weiteren Quellen für diese Addukte geforscht. Wegen seines Auftretens in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln wurde Myosmin ins Auge gefasst. Es konnte gezeigt werden, dass unter nitrosierenden Bedingungen aus Myosmin NNN entsteht [113]. Die Reaktion verläuft über Zwischenstufen, die auch direkt zur Bildung von POB-Addukten führen können (Abbildung 1-22). Bei *in vitro* Reaktion von radioaktiv markiertem Myosmin mit DNA zeigt sich eine deutliche pH-Wert Abhängigkeit. Bei einem pH-Wert von zwei lag nach acht Stunden 72% der Radioaktivität in Form von HPB vor. Bei diesen Versuchen konnte unter nitrosierenden Bedingungen auch die kovalente Bindung von Radioaktivität des Myosmins an die DNA gezeigt werden [114]. Auch die bereits bei der Toxikologie von Myosmin besprochene DNA-Schädigung humaner Zellen kann durch die Bildung von DNA-Addukten erklärt werden [75-77].

Eine neuere Studie von Hecht *et al* [115] unterstützt die Bildung des POB-Diazohydroxids aus Myosmin, doch wird hier nicht NNN als weiteres Produkt der Nitrosierung angegeben, sondern 3'-Oximinomyosmin (Abbildung 1-22). Allerdings haben diese Autoren die Nitrosierung von Myosmin nur bei niedrigen pH-Werten von 1,5 und 3,57 untersucht.

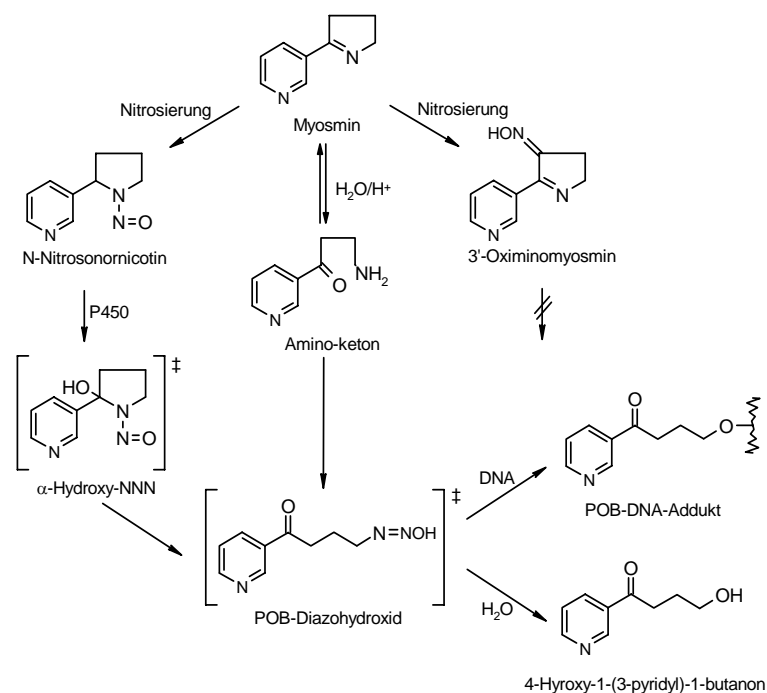


Abbildung 1-22: Nitrosierung von Myosmin und Bildung von DNA-Addukten

Bei der Untersuchung von Urinmetaboliten von Ratten, denen oral Myosmin verabreicht wurde, wurden myosmin-spezifische Metaboliten (3'-Hydroxymyosmin) identifiziert, aber auch für andere Nicotinoide typische Metaboliten konnten nachgewiesen werden [116]. Eine Reihe dieser Metaboliten konnte hier nur über eine Oxidation der Imin-Struktur hergeleitet werden. Das postulierte Reaktionsschema enthält wiederum Zwischenstufen, die zur Bildung von POB-Addukten führen könnten.

### 1.5.3 Erfassung der Myosminbelastung des Menschen

Da Myosmin in einer Vielzahl von Lebensmitteln enthalten ist, sollte die Belastung des Menschen nahezu unabhängig von dessen Exposition mit Tabakrauch sein. *Maier et al.* [117] konnte erstmals in Muttermilch und Speichel eine Myosminbelastung nachweisen. Die Myosminkonzentration betrug bei Nichtraucherinnen ( $N = 17$ ) in der Muttermilch  $0,17 \pm 0,12$  ng/ml, verglichen mit  $0,30 \pm 0,19$  ng/ml bei Passivraucherinnen ( $N = 5$ ) und  $1,34$  ng/ml bei einer Raucherin. Im Speichel hatten 14 Nichtraucher  $1,58 \pm 1,67$  ng/ml, 2 Passivraucher  $1,64$  und  $2,13$  ng/ml und 6 Raucher  $1,87 \pm 1,01$  ng/ml. Zwar deuten diese Ergebnisse auf eine leichte Abhängigkeit vom Rauchstatus hin, doch ist die Belastung von Nichtrauchern relativ hoch und der Unterschied zum Raucher sehr gering, verglichen mit der hohen Korrelation zwischen der Cotininkonzentration im Speichel und dem Rauchstatus.

Obwohl für den Menschen noch keine Untersuchungen zur Kinetik von Myosmin vorliegen und keine Angaben zur Halbwertszeit verfügbar sind, kann in Analogie zu Nicotin von einer kurzen

Halbwertszeit unter zwei Stunden ausgegangen werden. Deshalb wurde nach einem Marker gesucht, der die Einschätzung der Myosminbelastung über einen längeren Zeitraum erlaubt. Studien zeigten die kumulative Einlagerung von Nicotin, Cotinin, NNN und NNAL im Keratin des Fußnagels [118-120]. Dieser Methode folgend konnte Myosmin ebenfalls in Fußnägeln nachgewiesen werden [121]. Die Fußnägel von 10 Nichtrauchern waren mit  $21 \pm 15$  ng/g belastet, bei 14 Rauchern fanden sich  $66 \pm 56$  ng/g. Zwar waren diese Unterschiede signifikant, aber im Vergleich zum Nicotin zu gering ( $132 \pm 82$  ng/g bei Nichtrauchern gegenüber  $1\,971 \pm 818$  ng/g bei Rauchern).

## 1.6 Zielsetzung

In den westlichen Industrienationen stellt das Adenokarzinom des Ösophagus eine Krebsart mit der höchsten Inzidenzrate dar. Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom gelten hier nicht Rauchen und Alkoholkonsum als Risikofaktoren. Vielmehr erhöhen der aus der Refluxkrankheit resultierende Barrett-Ösophagus und damit verbunden das Übergewicht der Patienten das Risiko an einem Adenokarzinom zu erkranken.

Das tabakspezifische Nitrosamin *N'*-Nitrosornicotin (NNN) ist eines der wenigen Kanzerogene, das im Tierversuch Tumoren in der Speiseröhre hervorruft. NNN wird im Körper metabolisch aktiviert. Ähnlich wie das tabakspezifische Nitrosamin 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) bildet NNN nach metabolischer Aktivierung instabile Zwischenstufen, die zur Pyridyloxobutylierung von DNA führen. Unter saurer Hydrolyse spalten diese Addukte 4-Hydroxy-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) ab, das nach Derivatisierung mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie nachgewiesen werden kann. Bei der Bestimmung der Addukte hatte sich allerdings keine hinreichende Spezifität für die Belastung mit Tabak bzw. Tabakrauch ergeben.

Myosmin wurde lange Zeit als tabakspezifisches Alkaloid angesehen, es konnte aber ebenfalls in einer Reihe von Grundnahrungs- und Genussmitteln nachgewiesen werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Myosmin entweder zu NNN oder direkt zu einem instabilen Produkt nitrosiert wird, das zur Pyridyloxobutylierung führt. Auch die Bildung dieser Addukte durch Peroxidierung des Myosmins wird diskutiert.

An Zelllinien des ösophagealen Adenokarzinoms konnte der genotoxische Effekt von Myosmin gezeigt werden, welcher pH-abhängig war und durch die Zugabe nitrosierender Verbindungen noch gesteigert werden konnte.

Ein Ziel der Arbeit war es HPB-freisetzende DNA-Addukte in Biopsien der unteren Speiseröhre mittels GC/MS zu quantifizieren, dazu musste eine bestehende Methode an die Bedingungen

des minimalen Ausgangsgewebes angepasst und entsprechend angeglichen werden, um den Analyten noch reproduzierbar und hoch sensitiv bestimmen zu können.

Zusätzlich musste eine Methode zur Quantifizierung von Myosmin aus humanem Blutplasma entwickelt und validiert werden.

Inwiefern die Myosminbelastung Einfluss auf die Entstehung eines Adenokarzinoms im Ösophagus nimmt, war ein weiteres Ziel der Arbeit. Dazu wurden Patienten des Klinikums rechts der Isar während einer endoskopischen Untersuchung zwei Biopsien der unteren Speiseröhre und eine Vollblutprobe entnommen. Die Biopsien wurden hinsichtlich des Adduktlevels, die Blutprobe auf die Myosminkonzentration im Plasma untersucht. Zusätzlich wurden die Patienten gebeten eine ausführlichen Fragebogen zu Lebensumständen, Ernährungsgewohnheiten, Rauch- und Trinkverhalten, sowie zu Symptomen und Begleiterkrankungen auszufüllen. Letztes Ziel war die statistische Auswertung aller Daten aus Fragebogen und Analytik hinsichtlich deutlicher Signifikanzen und Korrelationen von Krankheitsstatus, Ernährung, Rauchen, Trinken und Symptome auf die HPB-Addukte und die Myosminkonzentration.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

#### 2.1.1 GC/MS-Geräte und Zubehör

System 1:      Quadrupol

GC:	Fisons Serie 8060 (Fisons Instruments, Manchester, UK)
Injektor:	Split/Splitless-Injektor (splitless), Temperatur 220 °C
Trennsäule:	DB-5ms, 30 m, ID 0,25 mm, Film 0,25 µm (J&W Scientific, Folsom, USA)
Trärgas:	Säulenkopfdruck 80 kPa, Helium 5.0 (Linde technische Gase GmbH, Höllriegelskreuth)
Temperaturverlauf:	50 °C, 1 min isotherm, 15 °C/min, 170 °C, 7,5 °C/min, 200 °C, 15 °C/min, 300 °C, 5 min isotherm
Kopplung:	Transferline 220 °C
MS:	TRIO 1000 Benchtop GC/MS, (Fisons Instruments)
Quellen-Modus:	EI <sup>+</sup> , Temperatur 200 °C, Wolframfilament, Elektronenenergie: 70 eV.
Software:	MassLab <sup>®</sup> Version 1.3 (Fisons Instruments)

System 2:      Sektorfeld

GC:	Fisons Serie 8060 (Fisons Instruments)
Injektor:	Split/Splitless-Injektor (splitless), Temperatur 270 °C
Trennsäule:	Factor Four VF-17 ms, 30 m, ID 0,25 mm, Film 0,25 µm (Varian, Darmstadt)
Trärgas:	Säulenkopfdruck: 50 kPa, 0,9 ml/min, Helium 5.0 (Linde)
Temperaturverlauf:	50 °C, 2 min isotherm, 20 °C/min, 180 °C, 10 °C/min, 250 °C, 20 °C/min, 300 °C, 8 min isotherm
Kopplung:	Capline 1, Capline 2, Reentrant: Temperatur 250 °C
MS :	Autospec M 299 Ultima (Fisons Instruments)
Quellen-Modus:	CI, Temperatur 115 °C; Rheniumfilament Low EV, Filamentstrom: 1 µA, Elektronenenergie: 225 eV
Ionisationsgas:	Ammoniak 3.8 (Linde)
Quellendruck:	4 – 7,5×10 <sup>-5</sup> mbar
Software:	Opus <sup>®</sup> Version 3.2 X (Fisons Instruments)

### 2.1.2 Sonstige Geräte

UV/VIS-Analysator:	Shimadzu UV-265 FW (Shimadzu, Düsseldorf) mit Quarzküvette (Hellma, Mülheim)
	Nanophotometer mit LabelGuard-Küvette (Implen, München)
Destillationsanlage:	Destamat (Heraeus-Kendro, Langensebold)
pH-Meter:	Digital pH-Meter (Knick GmbH, Berlin)
Überkopfschüttler:	Labortechnik (Frobel, Lindau)
Magnetrührer:	IKA, Combinag RCT (Jahnke & Kunkel, Staufen i. Breisgau)
$\beta$ -Counter:	TriCarb 2500 TR (Packard, Dreireich) mit WinSpectral 1414 (Perkin Elmer, Rodgau-Jülich)
Präzisionswaage:	Cobos precision A-150-SX (Cobos, Spanien)
Vortex-Rüttler:	Heidolph Reax DR (Heidolph, Kelheim)
Zentrifugen:	Hettich Zentrifugen Universal 16 R & Mikro 22 R (Hettich, Tuttlingen)
Zeitmesser:	Model Nr. TR 118 (Oregon Scientific, Neu Isenburg)
Trockenschrank:	Funktion Line (Heraeus-Kendro)
Thermorüttler:	Thermomixer (Eppendorf, Hamburg)
Festinstallierte Vakuumpumpe:	VNC 1 (Vaccubrand, Wertheim)
Stickstoff-Abblasvorrichtung:	Feinmechanikerwerkstatt des Walther-Straub-Instituts, München

## 2.2 Material

### 2.2.1 Festphasenextraktion

SPE-Säulen:	Strata-X-C Cation Mixed Polymer 60 mg/3 ml (Phenomenex; Aschaffenburg)
SPE-Hähne:	Luer Stopcocks (Varian)
Säulenadapter:	Adapter caps 1, 3, 6 ml (Varian)
SPE-Vakuumkammer:	Vac-Elut, (Analytichem International, Harbor City, USA)
Plexiglasständer für die Elution:	Feinmechanikerwerkstatt des Walther-Straub-Instituts

### 2.2.2 DNA-Extraktion

DNA-Kit	Invisorb Spin Tissue Midi Kit (Invitek, Berlin)
---------	---

### 2.2.3 Einweggefäße und Zubehör

Schraubgefäße:	15 ml PP-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
Wheaton-Gläser:	1,5 ml und 4,0 ml mit Schraubdeckel und Teflondichtung (Chromatographiehandel Müller, München)
Einsätze für Wheaton-Gläser:	Minivials 100 µl, (Chromatographiehandel Müller)
Einmalkanülen:	Peha CHB (Braun, Melsungen)
Eppendorf-Cups:	Volumen 2 ml (Eppendorf, Hamburg)
Szinti-Vials:	20 ml (Packard, Dreieich)
Racks für Wheaton-Gläser:	Feinmechanikerwerkstatt des Walther-Straub-Instituts
Ständer für Trockenvorgang:	Feinmechanikerwerkstatt des Walther-Straub-Instituts

### 2.2.4 Pipetten und Zubehör

GC-Spritze:	Microliter Syringes 701N, 10 µl (Hamilton, Frankfurt)
Laborpipetten: (Direktverdränger)	Microman: 10 µl, 25 µl, 100 µl, 250 µl, 1000 µl (Gilson; Bad Camberg)
Laborpipetten:	Pipetman 200 µl, 1000 µl, 5000 µl (Gilson)
Glaspipetten:	Pasteur Pipetten 150 mm, mit Pipettenhütchen und Watte (VWR, Darmstadt)
pH-Indikatorpapier:	Neutralit pH 5,5-9 (Merck, Darmstadt)

## 2.3 Chemikalien

25%ige Ammoniak-Lösung	reinst (Merck)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (Dichlormethan)	Suprasolv für (Merck)
D <sub>3</sub> -Cotinin	Toronto-Research (Toronto, Kanada)
D <sub>4</sub> -HPB	Toronto-Research
D <sub>4</sub> -Myosmin	Toronto-Research
Eisessig	100% wasserfrei (Merck)
HCl <sub>conc</sub>	konz. Salzsäure (Merck)
Heptacosä	Referenzgas FC43 (SMS GmbH, Bad Idstein)
Hexan	Suprasolv für GC (Merck)
<sup>3</sup> H-Myosmin	spez. Aktivität 24 Ci/mmol in ethanolischer Lösung (Hartmann Analytik, Braunschweig)
Invisorb Spin Tissue Midi Kit	(Invitex GmbH) mit ▷ Lysis Buffer G           ▷ Proteinase K ▷ Binding Buffer T       ▷ Elution Buffer D
Kälberserum	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Köstrolith	3 Å Molsieb (CWK Chemiewerk, Bad Köstritz)
Methanol	Suprasolv für GC (Merck)
NaOH Micropills	Natriumhydroxid (Riedel-deHaën, Deisenhofen)



$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Dinatriumphosphatdihydrat (Merck)
PFBC	Pentafluorobenzoylchlorid (Fluka, Deisenhofen)
$\text{H}_3\text{PO}_4$	Phosphorsäure (Merck)
$\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	Reinstwasser, hauseigene Anlage (Millipore, Schwalbach)
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	Bidestilliertes Wasser Destamat (Heraeus)
Szintillator	Ultima Gold (Merck)
$\text{N}(\text{CH}_3)_3 \times \text{HCl}$	Trimethylaminhydrochlorid (Fluka)

### 2.3.1 Herstellung der Reagenzien

#### 2.3.1.1 Bestimmung HPB-freisetzender DNA-Addukte

Proteinase K:	Gefäß mit 1,5 ml bidest. Wasser auffüllen und homogenisieren.
Wash Buffer:	Gefäß mit 105 ml Ethanol (97%) auffüllen.
1 mol/l Natronlauge:	0,4 g NaOH werden in 10 ml bidest. Wasser gelöst.
4 mol/l Salzsäure:	3,33 ml konz. HCl werden mit bidest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt.
Phosphat-Puffer:	0,89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ werden in 10 ml bidest. Wasser gelöst (0,5 mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Anschließend wird mit Hilfe von $\text{H}_3\text{PO}_4$ der pH-Wert auf 7 bis 7,5 eingestellt.
0,1 mol/l TMA-Lösung:	0,3 g $\text{TMA} \times \text{HCl}$ werden in 20 ml bidest. Wasser gelöst und mit 5 ml 1 mol/l NaOH versetzt. Die Lösung wird geschüttelt und anschließend 10 min bei RT stehen gelassen. Dann werden 20 ml abgenommen und mit 20 ml Hexan extrahiert. Zum Trocknen wird die Lösung auf Köstrolith gegeben und bis zum Gebrauch bei RT aufbewahrt.
Vormischung 1:	490 µl Dichlormethan werden mit 10 µl PFBC vermischt.
Vormischung 2:	Ein Äquivalent der Vormischung 1 wird mit 50 Äquivalenten der 0,1 mol/l TMA-Lösung gemischt.
HPB-Lösung:	10 mg HPB in 10 ml Hexan lösen, je 1 ml in 1,5 ml Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 1 mg pro Gefäß). 1 mg HPB/Gefäß mit 100 µl Hexan lösen, je 4 µl in 4 ml Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 40 µg pro Gefäß). 40 µg HPB/Gefäß mit 2000 µl Hexan lösen, je 10 µl in 4 ml Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 200 ng pro Gefäß). 200 ng HPB/Gefäß mit 2000 µl Hexan lösen, je 50 µl in 1,5 ml Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 5 ng pro Gefäß). 5 ng HPB/Gefäß mit 1000 µl Hexan lösen, je 100 µl in 1,5 ml Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 500 pg pro Gefäß).

D <sub>4</sub> -HPB-Lösung:	5 mg D <sub>4</sub> -HPB in 10 ml Hexan lösen, je 1 ml in 1,5 ml Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 500 µg pro Gefäß).
	500 µg D <sub>4</sub> -HPB/Gefäß mit 100 µl Hexan lösen, je 4 µl in 4 ml Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 20 µg pro Gefäß).
	20 µg D <sub>4</sub> -HPB/Gefäß mit 2000 µl Hexan lösen, je 20 µl in 4 ml Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 200 ng pro Gefäß).
	200 ng D <sub>4</sub> -HPB/Gefäß mit 2000 µl Hexan lösen, je 50 µl in 1,5 ml Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 5 ng pro Gefäß).
	5 ng D <sub>4</sub> -HPB/Gefäß mit 1000 µl Hexan lösen, je 100 µl in 1,5 ml Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 500 pg pro Gefäß).
Interner Standard (groß):	Bei Bedarf 5 ng D <sub>4</sub> -HPB pro Gefäß mit 1000 µl Dichlormethan lösen (entspricht 5 pg/µl D <sub>4</sub> -HPB).
Interner Standard (klein):	Bei Bedarf 500 pg D <sub>4</sub> -HPB pro Gefäß mit 100 µl Dichlormethan lösen (entspricht 5 pg/µl D <sub>4</sub> -HPB).

### 2.3.1.2 Bestimmung der Cotinin- und Myosminkonzentration im Plasma

0,1 mol/l Essigsäure:	555,56 µl Eisessig mit reinst Wasser zu 100 ml auffüllen.
1 mol/l HCl:	8,33 ml konzentrierte Salzsäure mit reinst Wasser zu 100 ml auffüllen.
4 mol/l NaOH:	16 g Natriumhydroxid in 100 ml reinst Wasser lösen.
Elutionslösung:	4 ml 25%ige NH <sub>3</sub> -Lösung mit 11,20 ml Methanol und 4,8 ml reinst Wasser mischen.
D <sub>4</sub> -Myosmin-Lösung:	5 mg D <sub>4</sub> -Myosmin im 100 ml Messkolben mit Dichlormethan auffüllen. Davon jeweils 200 µl aliquotieren, eindampfen und bei -20 °C lagern (entspricht 10 µg/Gefäß).
D <sub>3</sub> -Cotinin-Lösung:	4,5 mg D <sub>3</sub> -Cotinin im 100 ml Messkolben mit Dichlormethan auffüllen. Aliquots von 2 ml dieser Lösung im 4 ml Schraubgefäß zur Trockene einengen. Dann mit 1 ml Dichlormethan auffüllen, 100 µl entnehmen und mit 900 µl Dichlormethan verdünnen. Bis zum Gebrauch bei -20 °C lagern (entspricht jeweils 9 µg/ml).
Interner Standard:	D <sub>4</sub> -Myosmin-Gefäß (m = 10 µg) mit 1000 µl Dichlormethan lösen. 50 µl dieser Lösung mit 150 µl D <sub>3</sub> -Cotinin-Lösung (c = 9 µg/ml) und 800 µl Dichlormethan mischen (entspricht 0,5 ng/µl D <sub>4</sub> -Myosmin und 1,35 ng/µl D <sub>3</sub> -Cotinin).

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Bestimmung HPB-freisetzender DNA-Addukte

#### 2.4.1.1 Entnahme der Biopsien im Rahmen der Ösophagus-Studie

In Zusammenarbeit mit der chirurgischen Abteilung unter Leitung von Prof. Dr. Stein der Universität Salzburg wurde Herr Dr. Stadlhuber für die Entnahme von Gewebe- und Blutproben, zur Erfassung der Fragebögen zu Rauch- und Ernährungsgewohnheiten, sowie zur Bestimmung des Krankheitsstatus (s. Anhang), nach München abgestellt.

Alle Patienten wurden am Morgen nüchtern einbestellt. Zum Nachweis der Konzentrationen an HPB-freisetzenden DNA-Addukten wurden den an der Studie teilnehmenden Patienten am Klinikum rechts der Isar im Rahmen einer endoskopischen Untersuchung unter Narkose jeweils zwei Biopsien genommen. Generell wurden die Proben in der unteren Region der Speiseröhre am gastroösophagealen Übergang zum Magen entnommen, die erste Probe oberhalb der jeweiligen Läsion (im Weiteren als orale Probe bezeichnet), die andere unterhalb der Schädigung (im Weiteren als aborale Probe bezeichnet). Bei Patienten der Kontrollgruppe, die also keine ersichtliche Gewebstörung aufwiesen, lag die orale Probe 3 cm und die aborale Probe 1 cm oberhalb des gastroösophagealen Überganges. Die Biopsien wurden nach der Entnahme in ein 2 ml-Cup überführt und sofort bei -80 °C tief gefroren. Spätestens am Tag nach der Entnahme wurden die Proben in einem geeigneten Kühlcontainer in unser Institut überführt und bis zur Analyse wiederum bei -80 °C gelagert. Zur Identifizierung wurden die Proben mit einer labor-internen Nummer codiert.

#### 2.4.1.2 Isolierung der DNA aus Gewebeproben

Zur Bestimmung der Feuchtgewichte der erhaltenen Proben wurden zunächst die Gefäße mit dem darin enthaltenen Gewebe gewogen. Dann wurde die DNA extrahiert. Anschließend die Gefäße nochmals leer gewogen. Somit entspricht die Differenz aus dem Gewicht vor der Extraktion und dem Leergewicht dem Gewicht der Mucosaprobe.

Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe eines DNA-Kits, die Aufarbeitung folgte dabei dem mitgelieferten Protokoll. Zur Lyse des Zellverbandes wurden 1,3 ml Lysis Buffer G und 52 µl der vorbereiteten Proteinase K-Lösung zugegeben. Die Verdauung erfolgte bei 52 °C im Thermorüttler bei 750 rpm für ca. 2,5 Stunden. Befanden sich nach dieser Zeit noch unverdaute Gewebereste in der Probe, so setzte man die Lyse bis zur vollständigen Verdauung fort. Noch nicht zersetztes Material wurde bei 5000 U/min für 3 min abzentrifugiert. Den Überstand überführte man in neue Röhrchen und versetzte ihn mit 1 ml Binding Buffer T. Die Probe wurde gut gemischt und mit dem Vortex-Rüttler homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung auf den

so genannten Spin-Filter gegeben und für 1 min im Thermorüttler bei 52 °C inkubiert. Dabei bindet die DNA an die non-chaotrope Membran des Filters. Der Überstand wurde dann bei 4000 U/min für 10 min durch den Filter zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Filter auf ein neues Röhrchen gesetzt. Nach Zugabe von 3 ml Wash Buffer wurde für 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Damit wird die DNA von eventuellen Verunreinigungen durch Proteine und Kohlenhydrate gereinigt. Das Filtrat wurde wieder verworfen und der Waschvorgang noch einmal wiederholt.

Der Filter wurde nun bei 45 °C im Trockenschrank getrocknet bis das Ethanol des Wash Buffers vollständig verdampft war (ca. 15 min).

Zur Elution der gereinigten DNA von der Membran wurden 500 µl des auf 52 °C vorgewärmten Elution Buffer D aufgegeben, für 6 min bei 52 °C inkubiert und die DNA bei 5000 U/min für 5 min abzentrifugiert. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das DNA-Eluat in 2 ml-Cups überführt.

#### 2.4.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde über deren Absorptionsmaximum bei 260 nm photometrisch bestimmt. Zusätzlich wurden über die Absorptionen bei 230 und 280 nm mögliche Verunreinigungen durch Kohlenhydrate und Proteine kontrolliert.

Hierbei wurde eine spezielle Messzelle verwendet. Hoch konzentrierte Proben führen zu einer Absorption >1, bei welcher kein lineares Verhältnis zwischen Absorption und Konzentration mehr besteht, es müsste also „verdünnt“ werden. Stattdessen wird die Schichtdicke durch Aufsetzen unterschiedlicher Deckel auf die Küvette verändert, um die benötigte Schichtdicke zu erhalten.

Zur Messung wurde zunächst reines Wasser zum Nulllinienabgleich als „Blank“ eingesetzt. Dann wurden jeweils 4 µl des DNA-Extraktes auf die Messzelle der LabelGuard®-Küvette gegeben, der Küvettendeckel aufgesetzt und dann die Absorption bei 230, 260 und 280 nm gemessen. Die DNA Konzentration errechnet sich dann nach folgender Formel:

$$c(DNA) = \frac{A_{260}}{20} \times F \quad (\text{Formel 2-1})$$

$A_{260}$ : Absorption bei 260 nm

F: Verdünnungsfaktor des jeweiligen Deckels

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  $\geq 2$  sein, damit die Verunreinigungen die weitere Analyse nicht stören.

#### 2.4.1.4 Hydrolyse und Aufreinigung

Die gereinigte DNA wurde nun mit 105  $\mu\text{l}$  4 mol/l HCl angesäuert. Zur späteren Quantifizierung wurde der Probe 10  $\mu\text{l}$  der internen Standardlösung mit 5 pg  $D_4$ -HPB/ $\mu\text{l}$  zugegeben. Die Hydrolyse erfolgte nun bei 80 °C für drei Stunden im Trockenschrank.

Durch saure Hydrolyse wird die DNA nahezu komplett gespalten, so auch das zu untersuchende Addukt. Dadurch wird HPB freigesetzt und liegt ungebunden und protoniert in wässriger Lösung vor.

Zur weiteren Aufreinigung wurde das Hydrolysat mit 500  $\mu\text{l}$  Dichlormethan versetzt, für 10 min im Überkopfschüttler extrahiert, zur besseren Phasentrennung für 3 min bei 5000 U/min zentrifugiert und die organische Phase verworfen. Das HPB verblieb in der wässrigen Phase. Der Reinigungsschritt wurde nochmals wiederholt. Durch Zugabe von ca. 410  $\mu\text{l}$  1 mol/l NaOH wurde der pH-Wert der Probe auf 7,2 eingestellt, durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Phosphat-Puffer das System nochmals stabilisiert. Der pH-Wert wurde durch Aufnahme von 0,5  $\mu\text{l}$  der Probe auf einen Streifen Indikatorpapier überprüft, gegebenenfalls musste noch Natronlauge bzw. Salzsäure zugegeben werden, um den pH-Wert auszugleichen.

Nun verbleibt das HPB nicht mehr in der wässrigen Phase, durch Zugabe von 300  $\mu\text{l}$  Dichlormethan konnte der Analyt extrahiert werden. Dazu wurde wieder im Überkopfschüttler für 10 min geschüttelt und für 3 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Darauf wurde die untere organische Phase abgenommen und in ein 1,5 ml Gläschen überführt. Der Extraktionsschritt wurde anschließend noch dreimal wiederholt, um eine möglichst quantitative Ausbeute zu erreichen. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann in der Abblasvorrichtung unter konstantem Stickstoffstrom zur Trockne eingengt.

#### 2.4.1.5 Derivatisierung

Im reinen Zustand ist HPB zur Quantifizierung mittels GC/MS nicht geeignet, da die Substanz einen Siedepunkt von über 300 °C besitzt. Daher musste der Analyt geeignet derivatisiert werden. Durch Umsetzung der Hydroxylgruppe mit einem Säurechlorid entsteht ein Ester, der einen niedrigeren Siedepunkt als der Alkohol besitzt. Zur Erhöhung der Elektronendichte, und damit zur leichteren negativchemischen Ionisation, wurde das fünffach fluoridierte Säurechlorid der Benzoesäure (Pentafluorobenzoylchlorid, PFBC) verwendet. Durch die Zugabe von Trimethylamin (TMA) wurde die Aktivierungsenergie herabgesetzt, so dass die Reaktion auch bei Raumtemperatur ablaufen kann. Dabei wirkt das TMA als molarer Katalysator, der über mehrere Zwischenschritte die Chloridgruppe des Säurechlorids, sowie das Proton der Hydroxylgruppe des Alkohols vom TMA unter Bildung des Hydrochlorids aufnimmt und damit die Bildung des Esters erleichtert (Abbildung 2-1).

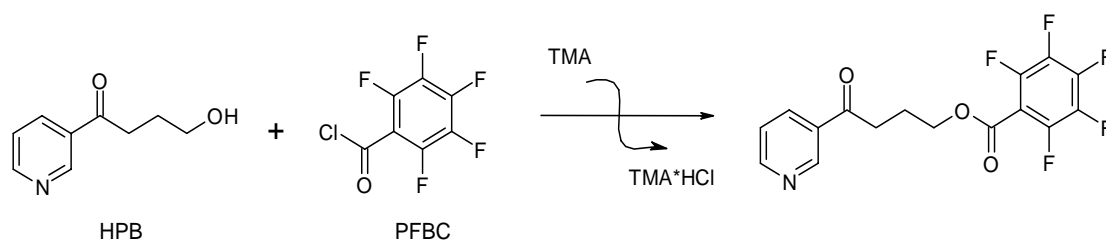


Abbildung 2-1: Reaktionsschema zur Derivatisierung von 4-Hydroxy-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) durch Esterbildung mit Pentafluorobenzoylchlorid (PFBC)

Zunächst wurden die eingedampften Proben in 123,8  $\mu\text{l}$  Dichlormethan durch 30 sec auf dem Vortex-Rüttler gelöst. Zum Starten der Reaktion wurden nun 126,2  $\mu\text{l}$  der Vormischung 2 zugegeben und 30 sec auf dem Vortex-Rüttler gemischt. Die Esterbildung lief dann für zwei Stunden bei Raumtemperatur ab. Zum Beenden der Reaktion wurde die Probe in der Abblasvorrichtung unter konstantem Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Anschließend wurde das Derivatisierungsprodukt in 80  $\mu\text{l}$  einer 2:3 Mischung aus Hexan und Dichlormethan durch eine Minute auf dem Vortex-Rüttler gelöst und mit der Direktverdrängerpipette in einen konischen Einsatz überführt, wiederum im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt und bis zur GC/MS Analyse bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2.4.1.6 GC/MS-Analyse

Zur Quantifizierung des HPB nach saurer Hydrolyse und Derivatisierung wurde der eingengte Analyt wieder in 10  $\mu\text{l}$  einer 2:3 Mischung aus Hexan und Dichlormethan durch eine Minute auf dem Vortex-Rüttler gelöst und mittels GC-Spritze jeweils 1  $\mu\text{l}$  der Probe in das GC/MS-System injiziert.

Das System bestand aus einem Gaschromatographen Fisons Serie 8060, gekoppelt mit einem Autospec M 299, einem hochauflösenden doppelfokussierenden Sektorfeldmassenspektrometer.

Als Trennsäule diente eine VF-17 ms Säule mit 30 m Länge und einem Innendurchmesser von 0,25 mm. Die Filmdicke betrug 0,25  $\mu\text{m}$ . Als Trägergas diente Helium mit einem Säulenkopfdruck von 50 kPa, das entspricht bei  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  einem Fluss von ca. 0,9 ml/min. Die Injektortemperatur betrug  $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der Säulenofen wurde mit folgendem Programm geladen:

2 min  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  halten

mit  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  auf  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$

mit  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  auf  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$

mit  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  auf  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$

8 min  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  halten

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

Die Temperatur der Kopplung von Gaschromatograph und Massenspektrometer kann in drei Stufen geregelt werden. Hier wurden Cap-Line 1, Cap-Line 2 und Reentrant auf 250 °C gestellt, um den Verlust des Analyten bei der Überführung zum Massenspektrometer gering zu halten.

Zur chemischen Ionisation wurde Ammoniak verwendet, mit einem Vordruck von 0,6 bar. Der CI-Gasdruck wurde so geregelt, dass der Quelldruck zwischen 4,0 und  $7,5 \times 10^{-5}$  mbar lag. Die Elektronenenergie betrug 225 eV und der Filamentstrom 1  $\mu$ A. Es wurde ein spezielles Rheniumfilament verwendet, das nur niedrige Filamentströme benötigt, damit die Quelltemperatur bei 115 °C gehalten werden konnte.

Nach der Ionisation wurden die entstandenen negativen Teilchen mit 5000 V aus der Quelle heraus beschleunigt und durch verschiedene elektromagnetische Linsen fokussiert. Die Auftrennung der Teilchen nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) vollzog sich durch ein magnetisches Feld und durch zwei elektrische Felder, die jeweils vor und nach dem Magneten angeordnet sind (Abbildung 2-2). Die Optimierung aller Einstellungen von Druck, Filamentstrom, Elektronenenergie bis zu den Linsen wurde an Hand des  $m/z$  333 Fragments des Referenzgases Heptacosa durchgeführt, dabei wurde die Spannung dem Analyten angepasst.

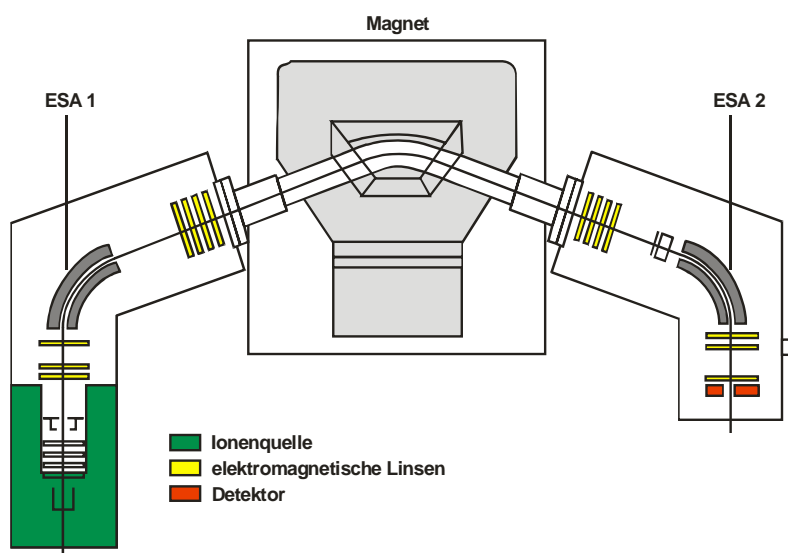


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des Autospec M 299 Massenspektrometers (ESA: Electric sector assembly)

Alle Linsen wurden dahingehend optimiert, dass die Auflösung bei 10%iger Peakhöhe 5000 betrug.

Am Ende trifft der Ionenstrahl auf eine Phosphorplatte, die verknüpft mit einem Photomultiplier mit 350 V, das eintreffende Signal in elektrischen Strom umwandelt. Dieser kann dann mit der entsprechenden Software als Chromatogramm dargestellt werden.

Für die Bestimmung des derivatisierten HPB wurde wegen der höheren Nachweisempfindlichkeit im Single Ion Recording (SIR) Modus gemessen. Dabei beschränkt man sich auf einzelne Massenspuren, im Gegensatz zum SCAN-Modus, bei dem man ganze Massenbereiche abfährt und so substanzspezifische Massenspektren erhält.

Zur Quantifizierung dienten die charakteristischen Ionenspuren  $m/z$  359 des HPB ( $M^-$ -Ion) und  $m/z$  363 des internen Standards  $D_4$ -HPB ( $M^-$ -Ion). Zur online Kalibrierung wurde zusätzlich  $m/z$  333 des Referenzgases FC43 gemessen (die so genannte Lockmasse). Die Dwell-Time betrug für die Ionen des Analyten und des internen Standard 50 ms, für die Lockmasse 40 ms.

#### 2.4.1.7 Berechnung der HPB-Konzentration

Um den HPB-Gehalt der Proben zu bestimmen, wurde die Methode der Stabilisotopenverdünnungsanalyse verwendet. Dabei setzt man voraus, dass alle Verluste im Analysengang Analyt und deuterierten Standard in gleichem Maße betreffen. Es muss vorausgesetzt werden, dass man die Fläche unter dem Peak gleich der Stoffmenge des zugehörigen Analyten setzen kann, da jedes eintreffende Teilchen am Detektor einen entsprechenden Strom induziert.

Somit lässt sich die Adduktkonzentration wie folgt berechnen:

$$c(\text{HPB}) [pg/mg \text{ DNA}] = \frac{(A_{\text{HPB}} - BW_{\text{HPB}}) \times M(\text{HPB}) \times m(\text{D}_4 - \text{HPB})}{(A_{\text{D}_4\text{-HPB}} - BW_{\text{D}_4\text{-HPB}}) \times M(\text{D}_4 - \text{HPB}) \times m(\text{DNA})} \quad (\text{Formel 2-2})$$

$c(\text{HPB})$	Konzentration des HPB pro mg DNA
$A_{\text{HPB}}$	Peakfläche des Analyten im Chromatogramm
$BW_{\text{HPB}}$	Peakfläche auf der Analytenspur in einem Leerlauf
$M(\text{HPB})$	molekulare Masse des Analyten (165,194 g/mol)
$m(\text{D}_4\text{-HPB})$	absolute zugesetzte Menge an internem Standard in Picogramm
$A_{\text{D}_4\text{-HPB}}$	Peakfläche des internen Standards im Chromatogramm
$BW_{\text{D}_4\text{-HPB}}$	Peakfläche auf der Spur des internen Standards in einem Leerlauf
$M(\text{D}_4\text{-HPB})$	molekulare Masse des internen Standards (169,225 g/mol)
$m(\text{DNA})$	photometrisch bestimmter DNA-Gehalt der Probe

Durch Umrechnung von Picogramm auf Femtogramm und Division durch das Molekulargewicht von HPB kann der Adduktlevel in der Einheit fmol/mg DNA angegeben werden.



## 2.4.2 Bestimmung der Plasmakonzentration von Myosmin und Cotinin

### 2.4.2.1 Methodenentwicklung mit tritiummarkiertem Myosmin

Zur Überprüfung der Festphasenextraktion wurden 4 ml Kälberserum mit 20  $\mu\text{l}$  der  $^3\text{H}$ -Myosmin-Ausgangslösung versetzt. Der Ansatz erfolgte in vierfacher Ausführung. Anschließend wurde mit 8 ml 0,1 mol/l Essigsäure angesäuert und die Probe auf die vorbereiteten Festphasensäulchen gegeben. Diese wurden zuvor mit 2 ml Methanol konditioniert und mit 2 ml 0,1 mol/l Essigsäure equilibriert.

Über einen entsprechenden Adapter wurde den Säulchen eine Spritze aufgesetzt um die Proben durch die Säulchen zu drücken. Die Lösung wurde im Szinti-Vial aufgefangen und zunächst beiseite gestellt. Die Säulen wurden dann mit 2 ml 1 mol/l HCl und mit 2 ml Methanol gewaschen, die jeweilige Lösung wurde wiederum aufgefangen.

Zur Elution wurde auf die Festphase 2 ml Elutionslösung gegeben und nach kurzer Einwirkzeit durch das Säulchen gedrückt. Der Elutionsvorgang wurde einmal wiederholt. Die aufgefangenen Eluate und restlichen Lösungen wurden im Vial mit 12 ml Szintillator versetzt, gemischt und dann im  $\beta$ -Counter vermessen, ebenso 20  $\mu\text{l}$  der  $^3\text{H}$ -Myosmin-Ausgangslösung.

Um die Analyten mittels GC/MS vermessen zu können, musste eine Überführung aus dem wässrigen Elutionsmittel in ein organisches Lösemittel eingeführt werden. Auch hier wurden die einzelnen Schritte mit  $^3\text{H}$ -Myosmin überprüft. Zunächst wurden 2,2 ml Elutionsmittel mit 20  $\mu\text{l}$  der  $^3\text{H}$ -Myosmin-Ausgangslösung in einem 2 ml-Cup vermengt. Der Ansatz erfolgte in zweifacher Ausführung.

Den Proben wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  entnommen, die im Szinti-Vial mit 12 ml Szintillator versetzt wurden. Die Proben wurden mit 20  $\mu\text{l}$  4 mol/l NaOH versetzt und dann bei 50 °C für 15 min unter Stickstoffstrom eingengt. Wiederum wurden 100  $\mu\text{l}$  entnommen. Nun wurden die Proben dreimal mit je 500  $\mu\text{l}$  Dichlormethan extrahiert, von Hand für 2 min geschüttelt und danach bei 4 °C mit 5000 U/min für 5 min zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde mit einer 250  $\mu\text{l}$  Direktverdrängerpipette abgenommen. Danach wurden den vereinigten Phasen wiederum 100  $\mu\text{l}$  entnommen. Die restliche Lösung wurde auf eine mit Watte und  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  beschickte Pasteurpipette gegeben und in ein entsprechendes Rack mit 1,5 ml Wheatongläser eingesetzt. Nach dem Trockenvorgang wurde die Pipette mit 100  $\mu\text{l}$  Dichlormethan gespült. Wiederum wurden 100  $\mu\text{l}$  entnommen. Nun wurden die getrockneten Proben im Stickstoffstrom bei 50 °C auf ca. 100  $\mu\text{l}$  eingengt, danach 10  $\mu\text{l}$  entnommen. Die restliche Probe wurde mit 1 ml Hexan aufgefüllt und dann auf 20  $\mu\text{l}$  eingengt. Diese und alle vorher entnommenen Proben wurden im Szinti-Vial 12 ml Szintillator versetzt und am  $\beta$ -Counter gemessen.

#### 2.4.2.2 Entnahme der Plasmaproben im Rahmen der Ösophagus-Studie

Den nüchternen Patienten wurde am Klinikum rechts der Isar vor der Endoskopie Blut entnommen. Für die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Myosmin und Cotinin wurde zusätzlich ca. 6 ml Vollblut in einer EDTA-K-Monovette aufgefangen und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Spätestens am Tag nach der Entnahme wurden die Proben in einer Kühltasche in unser Institut gebracht und anschließend sofort aufgearbeitet.

Die EDTA-K-Monovetten wurden bei 4 °C und 4000 U/min für 10 min zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde in 15 ml PP-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert. Zur Identifizierung wurden die Proben mit einer labor-internen Nummer codiert.

#### 2.4.2.3 Festphasenextraktion und weitere Aufarbeitung

Im Prinzip wurde der oben beschriebenen Methode gefolgt, mit leichten Anpassungen hinsichtlich der Reduzierung eines möglichen Blindwertes.

Am Tag der Aufarbeitung wurden die Proben aus dem Gefrierschrank genommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die SPE-Säulen wurden auf die Hähne mit Luer-Aufsatz gesetzt und zusammen auf die Vakuumkammer gesteckt. Diese wurde über eine Wulffsche Flasche mit der Vakuumpumpe verbunden. Nach Konditionierung der Säulen, dreimal jeweils mit 2 ml Elutionslösung (Flussrate 3-6 ml pro min), wurden die Säulen mit 3 ml Methanol konditioniert (Flussrate 9-18 ml/min) und anschließend mit 3 ml 0,1 mol/l Essigsäure angesäuert (Flussrate 9-18 ml/min). Ein Trockenlaufen des Säulenmaterials sollte dabei unbedingt vermieden werden.

Die Plasmaproben wurden nach dem Auftauen vollständig in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt (ca. 2 bis 4 ml), dabei wurde das Probenvolumen notiert und 8 µl der internen Standardlösung zugesetzt. Dann verdünnte man die Proben mit dem doppelten Probenvolumen an 0,1 mol/l Essigsäure und zentrifugierte anschließend eventuell denaturiertes Protein bei 4 °C und 4000 U/min für 10 min ab.

Die vorbereitete Probe wurde mittels Pasteurpipette auf die konditionierte und equilibrierte Säule gegeben (Flussrate: 3-6 ml/min). Dabei war unbedingt zu vermeiden, dass das Säulenmaterial trocken lief. Dann wurde einmal mit 3 ml 1 mol/l HCl und zweimal mit je 3 ml Methanol gewaschen. Überschüssige Flüssigkeit wurde mittels Vakuum von der Säule gezogen und für drei Minuten bei höchstem Vakuum (ca. 120 mbar) getrocknet.

Die Säulen mit Hähnen wurden von der Vakuumkammer genommen, Kanülen wurden aufgesteckt und so in den Elutionsständer gestellt. Unter die Kanülen wurden im entsprechenden Rack 4 ml Wheatongläser gestellt, um das Eluat aufzufangen. Die Gläschen wurden vorher mit

100  $\mu\text{l}$  4 mol/l NaOH versetzt, um das Eluat zusätzlich zu alkalisieren. Jeweils 2 ml Elutionslösung (5%ige  $\text{NH}_3$ -Lösung in 70%igen Methanol) wurden auf die Säulen gegeben. Nach einer Minute Reaktionszeit wurden die Hähne geöffnet, damit das Elutionsmittel die Analyten vom Säulenmaterial lösen konnte. Zuletzt wurden auf die Säulen Adapter gesetzt, um restliches Elutionsmittel mit Pressluft von der Säule zu blasen.

Nach Vortexen wurden die Gläser in die Stickstoff-Abblasvorrichtung eingebracht, die zuvor mit einer Heizplatte auf 50 °C erwärmt worden war. Im Stickstoffstrom wurden Methanol und Ammoniak innerhalb von ca. 15 min abgeblasen.

Die verbliebene wässrige Phase wurde in ein 2 ml Eppendorfcup überführt, das Glas mit 500  $\mu\text{l}$  Dichlormethan gespült, die vereinigten Phasen von Hand für 2 min geschüttelt und danach bei 4 °C mit 5000 U/min für 5 min zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde mit einer 250  $\mu\text{l}$  Direktverdrängerpipette abgenommen und auf eine mit Watte und  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  beschickte Pasteurpipette gegeben. Die befüllten Pasteurpipetten wurden vorher mit 500  $\mu\text{l}$  Dichlormethan gespült und in ein entsprechendes Rack mit 1,5 ml Wheatongläser eingesetzt.

Der Vorgang der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde insgesamt zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Pasteurpipette nochmals mit 100  $\mu\text{l}$  Dichlormethan gespült um das restliche Lösungsmittel in das Glas zu überführen. Zur vollständigen Wiederfindung konnte man mit einem Pipettenhütchen, welches auf die Glaspipette aufgesetzt wurde, das restliche Dichlormethan in das Glas drücken.

Die so getrocknete organische Phase wurde an der Abblasvorrichtung bei 50 °C mit Stickstoffstrom auf ca. 100  $\mu\text{l}$  eingeengt. Es wurde mit 1 ml Hexan aufgefüllt und kurz gemischt. Anschließend wurde erneut auf ein Restvolumen von 20  $\mu\text{l}$  eingeengt. Mit einer 25  $\mu\text{l}$  Pipette wurde die Lösung in ein 100  $\mu\text{l}$  Microinsert überführt. Dabei konnte nochmals das exakte Volumen überprüft werden und gegebenenfalls mit Hexan aufgefüllt bzw. weiter auf 20  $\mu\text{l}$  abgeblasen werden. Beim Abblasen der Proben war stets darauf zu achten, dass die Proben nicht zu trocken eingedampft wurden, da es sonst zu erheblichen Verlusten der Analyten kommt.

#### 2.4.2.4 GC/MS-Analyse

Aus 20  $\mu\text{l}$  der Hexanlösung wurde zur Bestimmung des Myosmin- und Cotiningehalts 1  $\mu\text{l}$  in den Gaschromatographen eingespritzt.

Das hier verwendete System bestand aus einem Gaschromatographen Fisons Serie 8060 gekoppelt mit einem Trio 1000, einem Quadrupolmassenspektrometer.

Eine DB-5 Säule, mit 30 m Länge und einem Innendurchmesser von 0,25 mm wurde als Trennsäule verwendet. Die Filmdicke betrug 0,25  $\mu\text{m}$ . Als Trägergas diente Helium mit einem Säulenkopfdruck von 80 kPa das entspricht bei 50 °C einem Fluss von ca. 1,3 ml/min. Die

Injektortemperatur betrug 200 °C. Der Säulenofen wurde mit dem folgenden Programm geladen:

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

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

Die Temperatur der Kopplung von Gaschromatograph und Massenspektrometer (Transferline) wurde auf 220 °C gestellt.

Die Identifizierung und Quantifizierung der Analyten erfolgte im SIM Modus (Single Ion Monitoring).

Zur Quantifizierung dienten die zwei Hauptfragmente der zu messenden Substanzen bzw. die entsprechenden deuterierten internen Standards. Bei dem verwendeten Programm des Massenspektrometers wurden zwei zeitlich getrennte Messbereiche mit unterschiedlichen Massen definiert. Zwischen 4 min und 11,5 min wurden die Fragmente  $m/z$  118 bzw.  $m/z$  122 für Myosmin bzw. den internen Standard D<sub>4</sub>-Myosmin aufgenommen, anschließend, zwischen 11,5 min und 18 min, die Fragmente  $m/z$  176 bzw.  $m/z$  179 für Cotinin und den entsprechenden Standard D<sub>3</sub>-Cotinin. Dabei diente immer ein Wolframfilament mit 70 eV im EI-Modus zur Ionisation. Die Quellentemperatur betrug 200 °C.

Nach der Ionisation wurden die geladenen Teilchen im Ionenstrom aus der Quelle heraus beschleunigt und dabei durch elektromagnetische Linsen fokussiert. Im anschließenden Quadrupol wurden die Teilchen nach ihrem entsprechenden Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt.

Am Detektor treffen die Teilchen auf eine Phosphorplatte, die verbunden mit einem Photomultiplier mit 400 V, zu einem elektrischen Signal führt, das mit Hilfe entsprechender Software aufgenommen wurde. Die Dwell-Time für alle Ionen betrug 60 ms.

#### 2.4.2.5 Berechnung der Konzentration von Myosmin und Cotinin

Um die Konzentration von Myosmin und Cotinin im Plasma zu bestimmen, wurde die Fläche des entsprechenden Ions, wie in Formel 2-3 beschrieben, durch die Fläche des internen Standards (ISTD) geteilt und mit den Verhältnissen der Molekulargewichte ( $M_{\text{Substanz}}/M_{\text{ISTD}}$ ) und der absoluten Menge des zugesetzten internen Standards multipliziert. Dieser Wert wurde durch das

Volumen der eingesetzten Probe dividiert. Dadurch erhielt man den Wert für die Menge Myosmin bzw. Cotinin in ng/ml Plasma. Die unten genannte Formel beschreibt den Rechenweg für die Berechnung am Beispiel von Myosmin.

$$c(MYO) [ng/ml] = \frac{(A_{MYO} - BW_{MYO}) \times M(MYO) \times m(D_4 - MYO)}{(A_{D_4 - MYO} - BW_{D_4 - MYO}) \times M(D_4 - MYO) \times V(Plasma)} \quad (\text{Formel 2-3})$$

c(MYO)	Konzentration des Myosmins pro ml Plasma
A <sub>MYO</sub>	Peakfläche des Analyten im Chromatogramm
BW <sub>MYO</sub>	Peakfläche auf der Analytenspur in einem Leerlauf
M(MYO)	molekulare Masse des Analyten (146,193 g/mol)
m(D <sub>4</sub> -MYO)	absolute zugesetzte Menge an internem Standard in Nanogramm
A <sub>D<sub>4</sub>-MYO</sub>	Peakfläche des internen Standards im Chromatogramm
BW <sub>D<sub>4</sub>-MYO</sub>	Peakfläche auf der Spur des internen Standards in einem Leerlauf
M(D <sub>4</sub> -MYO)	molekulare Masse des internen Standards (150,225 g/mol)
V(Plasma)	eingesetztes Plasmavolumen in Milliliter

### 2.4.3 Validierung der Methoden

Die Validierung dient der Bestätigung, dass eine Analysenmethode die besonderen Anforderungen für einen speziellen Gebrauch erfüllt. Zur Bewertung einer analytischen Methode werden bestimmte Leistungsmerkmale, wie Richtigkeit, Präzision, Linearität, Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate im Rahmen der Methodvalidierung über einen gewissen Arbeitsbereich bestimmt. Zur Überprüfung der Methode der DNA-Addukte wurde anstelle humaner DNA Lachssperma-DNA, für die Plasmaextraktion anstelle von humanem Plasma Kälberserum verwendet.

#### 2.4.3.1 Berechnung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Für beide Methoden wurden die analytischen Parameter auf dieselbe Weise bestimmt und errechnet. Die Nachweisgrenze (engl. limit of detection, LOD) ist die Konzentration, die qualitativ noch erfasst werden kann. Mit ihr kann das Vorhandensein des Analyten in fünfzig Prozent der Fälle mit der gewählten Methode gezeigt werden.

Zur quantitativen Bestimmung berechnet man die Bestimmungsgrenze (engl. limit of determination bzw. limit of quantification, LOQ). Die LOQ gibt die Konzentration an, ab der die Methode vorgegebene Anforderungen an die Präzision erfüllt. Hier wird die Nachweisgrenze nach DIN 32 645 bestimmt und berechnet.

Im Idealfall sollte die Matrix der Validierungsproben der Matrix der Analysenproben entsprechen. Nach der Kalibriergeradenmethode berechnet sich dann die Nachweisgrenze nach Formel 2-4.

In der chromatographischen Praxis wird meist nur die Kalibriergerade bestimmt. Die Nachweisgrenze entspricht dann der Konzentration, bei der das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) bei 1 zu 3 liegt. Die Bestimmungsgrenze liegt bei einem S/N von 1 zu 6.

Häufig kommt es bei Messungen zu matrix- bzw. methodenbedingten Blindwerten, wodurch nicht mehr einfach, durch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf die Nachweisgrenze geschlossen werden kann. Zusätzlich zur Kalibriergeraden werden, wenn vorhanden, die Blindwerte (Leerwerte) vermessen. Über deren Streuung und der Steigung der Kalibriergeraden wird dann die Bestimmungsgrenze berechnet. Sie entspricht dem Mittelwert der Blindwerte plus deren vierfache Standardabweichung, d.h. ab dieser Grenze können Messwerte signifikant vom Blindwert unterschieden werden (vgl. Ausreißertests in der Statistik). Diese Fläche kann dann mit Hilfe der Gleichung der Kalibriergeraden in die entsprechende Konzentration umgerechnet werden.

$$x_{NG} = \frac{s_y}{m} \times t_{f,\alpha} \times \sqrt{\frac{1}{\hat{N}} + \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad \text{mit} \quad Q_{xx} = \sum_{i=1}^N x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i\right)^2}{N} \quad (\text{Formel 2-4})$$

- $x_{NG}$  Nachweisgrenze
- $s_y$  Reststandardabweichung (Abweichung der Messwerte von der Regressionsgeraden)
- $m$  Steigung der Kalibriergeraden
- $t_{f,\alpha}$  Quantil der Student'schen t-Verteilung für Fehler 1. Art (Grenzwert, der abhängt von der Anzahl an Messungen und der Fehlerwahrscheinlichkeit, meist 5%).
- $\hat{N}$  Anzahl an Einzelbestimmungen
- $N$  Anzahl der Kalibrierkonzentrationen
- $\bar{x}^2$  Quadrat des Mittelwertes aller Konzentrationen
- $Q_{xx}$  Quadratsumme (Maß für die Streuung der x-Werte)
- $x_i$  Mittelwerte der Konzentrationen

#### 2.4.3.2 Berechnung der Präzision

Die Präzision ist im Messwesen ein Kriterium zur qualitativen Beurteilung eines Messverfahrens. Man erhält die Präzision durch wiederholtes Messen unter gleichen Parametern, mit demselben Messgerät und der gleichen Methode. Die Präzision zeigt somit die Stabilität des Messgeräts und der Methode an. Zur Ermittlung der Methodenpräzision wird eine Reihe von gespikten Leerproben hergestellt. Ein Teil wird nacheinander am selben Tag aufgearbeitet und vermessen (within day). Der andere Teil wird in einem Intervall von mehreren Wochen aufgearbeitet und vermessen (between day). Dann wird jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

### 2.4.3.3 Berechnung von Linearität und Wiederfindungsrate

Nimmt man eine Standardverdünnungsreihe und vermisst diese ohne Aufarbeitung, so lässt sich die Linearität aus der Regression der Geraden und die Wiederfindungsrate bestimmen. Die Wiederfindung ergibt sich aus dem Vergleich der Geraden, die man ohne Aufarbeitung und nach Durchlaufen des kompletten Analysengangs erhält. Damit können etwaige Verluste durch den vorherigen Analysengang ausgeschlossen werden.

### 2.4.3.4 Methodenvalidierung für DNA-Addukte aus Gewebeproben

Zunächst musste die Methode auf Linearität in dem zu erwartenden Arbeitsbereich untersucht werden. Dafür wurden 0,01 g Lachssperma-DNA mit Elutionspuffer auf 100 ml aufgefüllt. Es wurden parallel zwei Reihen mit jeweils zehn Proben hergestellt. Jeweils 500 µl der DNA-Lösung wurden in 2 ml-Cups überführt. Das entspricht einem Gehalt pro Probe von 50 µg DNA. Die Proben sollten mit 1, 2, 3, 10, 20, 30, 40, 48, 49 und 50 pg versetzt werden. Das entspricht einer Konzentration von 20, 40, 60, 200, 400, 600, 800, 960, 980 und 1000 pg/mg DNA.

Zunächst wurde eine HPB-Stammlösung hergestellt, dafür wurden 200 ng HPB pro Gefäß mit 2000 µl Dichlormethan aufgefüllt und gemischt, dann fuhr man wie im Pipettierschema in Tabelle 2-1 beschrieben fort.

*Tabelle 2-1: Pipettierschema zur Herstellung einer HPB-Verdünnungsreihe für die Bestimmung der Linearität im zu erwartenden Arbeitsbereich  
c(Stammlösung) = 100 pg/µl*

DNA-Konzentration [pg/mg DNA]	Konzentration im Standard [pg/µl]	Volumen aus vorheriger Verdünnung [µl]	Zusatz an CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> [µl]
990	4,9	4,9 (Stammlösung)	95,1
980	4,8	4,8 (Stammlösung)	95,2
1000	5,0	30 (Stammlösung)	570
800	4,0	480	120
600	3,0	450	150
400	2,0	400	200
200	1,0	300	300
60	0,3	180	420
40	0,2	400	200
20	0,1	300	300

Ähnlich wurde auch für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze eine Verdünnungsreihe hergestellt, doch wurde HPB in kleineren Schritten zugegeben, so dass die Konzen-

trationen bei 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 und 200 pg/mg DNA lagen. Es wurde dem Pipettierschema wie in Tabelle 2-2 gefolgt.

*Tabelle 2-2: Pipettierschema zur Herstellung einer HPB-Verdünnungsreihe für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze  
c(Stammlösung) = 100 pg/μl*

DNA-Konzentration [pg/mg DNA]	Konzentration im Standard [pg/μl]	Volumen aus vorheriger Verdünnung [μl]	Zusatz an CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> [μl]
200	1,0	10 (Stammlösung)	990,00
180	0,9	810,00	90,00
160	0,8	800,00	100,00
140	0,7	787,50	112,50
120	0,6	771,43	128,57
100	0,5	750,00	150,00
80	0,4	720,00	180,00
60	0,3	675,00	225,00
40	0,2	600,00	300,00
20	0,1	450,00	450,00

Bei beiden Ansätzen wurden 500 μl DNA-Lösung vorgelegt und jeweils 10 μl der jeweiligen Konzentration der HPB-Reihe den entsprechend beschrifteten Proben zugesetzt. Weiter wurde dem normalen Aufarbeitungsprotokoll ab der Hydrolyse gefolgt, und dabei auch 10 μl der internen Standardlösung mit 5 pg D<sub>4</sub>-HPB/μl zugegeben. Damit enthielten die Proben HPB in aufsteigender und den internen Standard in konstanter Konzentration. Zusätzlich zur Verdünnungsreihe wurden zur Bestimmung der Nachweisgrenze acht Blindwerte angesetzt. Dabei wurden jeweils 500 μl DNA-Lösung neben den Reihen aufgearbeitet, ohne das HPB oder interner Standard zugesetzt wurden.

Zur Ermittlung der Methodenpräzision wurde eine Reihe von identischen Proben hergestellt. Dafür wurde 1,3 g Leber einer mit 30 nmol NNN/kg/Tag behandelten Ratte eingewogen und gemäß Protokoll hydrolysiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und dann die Probe in elf Aliquote aufgeteilt. Sechs Aliquote wurden nacheinander am selben Tag ab der Hydrolyse aufgearbeitet und anschließend vermessen (within day). Die restlichen fünf wurden in einem Intervall von einer Woche aufgearbeitet und vermessen (between day).

Für die Bestimmung von Linearität und Wiederfindung wurden jeweils 10 μl der Standardverdünnungsreihe (Tabelle 2-2) mit 10 μl internem Standard versetzt, direkt derivatisiert und vermessen.



## 2.4.3.5 Validierung der Methode zur Bestimmung der Plasmakonzentration

Es wurden parallel zwei Reihen mit jeweils neun Proben, sechs wässrigen Blindwerten und vier wässrigen Standards hergestellt.

Die Verdünnungsreihen sollen für Myosmin folgende Konzentrationen enthalten:

10, 50, 100, 500, 800, 1000, 1500 und 2000 pg/ml Plasma. Aufgrund der geringeren Empfindlichkeit der Methode für Cotinin wurde die Reihe für Cotinin höher angesetzt: 200, 500, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 und 5000 pg/ml Plasma.

Die Reihen wurden mit jeweils 2 ml Kälberserum angesetzt, die Blindwerte und wässrigen Standards mit 2 ml Wasser. Den Proben wurden jeweils 8 µl der entsprechenden Myosmin- und Cotininkonzentration zugesetzt. Das Pipettierschema wird in den Tabellen 2-3 und 2-4 gezeigt.

Anschließend wurde jeder Probe dem Protokoll entsprechend die gleiche Menge an internem Standard, D<sub>4</sub>-Myosmin und D<sub>3</sub>-Cotinin, zugesetzt. Zusätzlich zu den Reihen wurden acht Blindwerte angesetzt.

*Tabelle 2-3: Pipettierschema zur Herstellung einer Myosminverdünnungsreihe für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze  
c(Stammlösung) = 45,0 ng/µl*

Myosminkonzentration im Plasma [ng/ml]	Konzentration im Standard [ng/µl]	Volumen aus vorheriger Verdünnung [µl]	Zusatz an CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> [µl]
2,00	500,0	10 (Stammlösung)	890
1,50	375,0	450	150
1,00	250,0	400	200
0,80	200,0	480	120
0,50	125,0	375	225
0,20	50,0	240	360
0,10	25,0	300	300
0,05	12,5	300	300
0,01	2,5	120	480

*Tabelle 2-4: Pipetierschema zur Herstellung einer Cotininverdünnungsreihe für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze  $c(\text{Stammlösung}) = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$*

Cotinkonzentration im Plasma [ng/ml]	Konzentration im Standard [ng/ $\mu\text{l}$ ]	Volumen aus vorheriger Verdünnung [ $\mu\text{l}$ ]	Zusatz an $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ [ $\mu\text{l}$ ]
5,0	1250,0	20 (Stammlösung)	780
3,0	750,0	360	240
2,5	625,0	500	100
2,0	500,0	480	120
1,5	375,0	450	150
1,0	250,0	400	200
0,8	200,0	480	120
0,5	125,0	375	225
0,2	50,0	240	360

Zur Ermittlung der Methodenpräzision wurden 22 ml Kälberserum mit Myosmin und Cotinin versetzt. Dabei entsprach die Endkonzentration 1 ng/ml Myosmin bzw. 3 ng/ml Cotinin. Die Lösung wurde in elf Aliquote zu 2 ml aufgeteilt. Sechs Proben wurde nacheinander am selben Tag (within day), die restlichen fünf in einem Intervall von einer Woche hintereinander aufgearbeitet und vermessen (between day).

Zur Bestimmung der Linearität und der Wiederfindung wurden jeweils 8  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Konzentration der Myosmin- und Cotininverdünnungsreihe mit 8  $\mu\text{l}$  interner Standardlösung versetzt und im Stickstoffstrom auf 20  $\mu\text{l}$  eingengt. Anschließend wurden die Proben am GC/MS vermessen.

#### **2.4.4 Statistische Auswertung der Daten**

Die Ergebnisse wurden in Datenblätter des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2003 für Windows (Microsoft, Seattle, USA) eingegeben. Die Auswertung aller analytischen Parameter erfolgte mit GraphPad Prism V.4.01 (GraphPad Inc., San Diego, USA). Die epidemiologische Auswertung der Fragebögen und die anschließende Statistik, zusammen mit den Messergebnissen, wurde mit SPSS V.16.0.1 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Anhand aller Basisdaten wurden die Absolutwerte, Mittelwerte (MW), Standardabweichungen vom Mittelwert (SD = standard deviation), der Standardfehler (SE = standard error) und die Medianwerte berechnet.

Für Werte unterhalb des LOD wurde ein Wert von Null, für Werte zwischen dem LOQ und der LOD, jeweils die Hälfte vom LOQ für die Berechnung verwendet.

Die statistischen Analysen und die Abbildungen wurden mit GraphPad Prism oder SPSS erstellt. Soweit nicht anders angegeben, werden die Ergebnisse als Mittelwerte mit dem Standardfehler (SE) dargestellt.

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk Test. Bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  wurde keine Normalverteilung angenommen. Der statistische Vergleich auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde entweder mit dem t-Test (bei Normalverteilung) oder mit dem Wilcoxon Rang Test bzw. dem Mann-Whitney Test durchgeführt, je nach Voraussetzung mit gepaarten oder mit ungepaarten Daten. Bei mehreren ungepaarten Gruppen wurde entweder die ANOVA (bei Normalverteilung) oder der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Anschließend wurde zum Vergleich der Untergruppen zueinander der Post-Hoc-Test nach Tamhane verwendet, bei dem keine Varianzgleichheit angenommen wird. Zur Untersuchung des Einflusses von kategorialen Werten wurde der  $\chi^2$ -Test angewendet und zusätzlich, auf Grund der teilweise zu kleinen Probenmengen, mit dem Exakt-Test nach Fisher überprüft. Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Spearman Rank Test.

Sind die Ergebnisse als Boxplot dargestellt, so entspricht die waagerechte Linie innerhalb des Rechtecks bzw. der Box dem Median der jeweiligen Variablen. Die unteren und oberen Begrenzungen der Box repräsentieren die 25. bzw. 75. Perzentile. Entsprechend liegen 50% aller Messwerte innerhalb des Rechtecks und 50% außerhalb. Die außerhalb der Box vertikal angeordneten Spannweitenlinien (Whisker) markieren die 5. und 95. Perzentile. Ausreißer (°) liegen mehr als 1,5-fach außerhalb der Box, Extremwerte (\*) mehr als dreifach. Im Säulendiagramm sind Mittelwert und Standardfehler dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Analytik

#### 3.1.1 Bestimmung HPB-freisetzender DNA-Addukte

##### 3.1.1.1 Anpassung des Methodenprotokolls

Zunächst wurden die einzelnen Teilschritte des Analysenganges überprüft und gegebenenfalls angepasst. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Reduzierung von Verunreinigungen, die im Chromatogramm dieselbe Retentionszeit wie der Analyt besitzen. Diese Stoffe entstehen, nach unserem Kenntnisstand, durch bisher unbekannte Nebenreaktionen während des Derivatisierungsschrittes. Vor allem durch Reaktion der TMA-Lösung für zehn Minuten vor der Extraktion mit Hexan konnten diese Verunreinigungen minimiert werden. Auch das Herstellen von frischen Lösungen für jeden Analysengang führte zur Reduzierung des Blindwertlevels.

Zusätzlich wurden noch die einzelnen Schritte der Aufarbeitung untersucht, um eine möglichst hohe Wiederfindung zu erzielen. Dafür wurden 500 µl Wasser mit HPB versetzt und hydrolysiert. Danach wurde dreimal mit Dichlormethan gereinigt, dann neutralisiert und viermal mit Dichlormethan extrahiert. Die jeweiligen organischen Phasen wurden jedoch nicht vereinigt, sondern einzeln derivatisiert und vermessen. Zum Vergleich wurde derselbe HPB-Standard direkt derivatisiert, um damit die Wiederfindungsraten zu bestimmen (Abbildung 3-1).

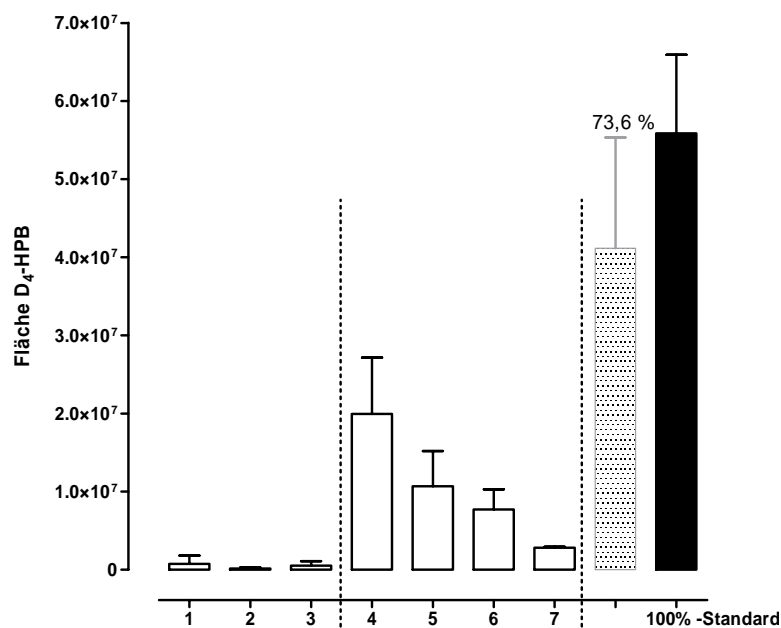


Abbildung 3-1: Ergebnis der Extraktionsversuche zur Verbesserung der Wiederfindungsrate (Schritte 1 bis 3: Reinigung im Säuren, Schritte 4 bis 7: Extraktion nach Neutralisation, grauer Balken: vereinigte Extraktionsschritte mit Wiederfindung, schwarzer Balken: 100%-Wert)

### 3.1.1.2 GC/MS-Analyse und Parameter

Der Nachweis von HPB aus kleinsten Gewebemengen erfordert eine hochspezifische und sensible Messmethode. Daher wurde hier ein Gaschromatograph, gekoppelt mit einem hochauflösenden doppelfokussierenden Massenspektrometer, verwendet.

Vor allem das Massenspektrometer mit seinem komplexen Linsensystem erforderte eine gezielte Einstellung aller Parameter auf die zu analysierende Zielmasse. Zur Trennung der einzelnen Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis wurden durch Verändern der Beschleunigungsspannung die unterschiedlichen Massen abgefahren, die kleinste Masse bei 5000 Volt die höchste Masse bei entsprechend niedrigerer Spannung. Die beiden elektrischen Felder wurden entsprechend angepasst.

Damit die Software erkennt, welche Masse bei welcher Spannung auf den Detektor trifft, muss das Gerät kalibriert werden (sog. Location Data). Die Software beinhaltet für die entsprechende Referenzsubstanz die jeweiligen häufigsten Massenfragmente. Es wird nun im Massenfenster des entsprechenden Experimentes ein Fragment im unteren Bereich, eines im mittleren und eines im oberen gesucht. Im Kalibrationsfenster kann der Anwender diese an der roten Markierung erkennen und gegebenenfalls auf die exakte Masse einstellen. Nun kann die exakte Spannung für den jeweiligen Analyten bestimmt werden. Im Kalibrationsfenster sieht man den maximalen Massenbereich der Methode. Die kleinste Masse entspricht einer Spannung von 5000 V. Die Spannung  $U$  der höchsten Masse berechnet sich nach Formel 3-1.

$$U = 5000 \times \frac{\text{kleinste Masse}}{\text{größte Masse}} \quad [\text{Volt}] \quad (\text{Formel 3-1})$$

Daraus ergibt sich der Spannungs- für den entsprechenden Massenbereich. Nun kann für die Analytenmasse die entsprechende Spannung bestimmt werden. Man errechnet die Massendifferenz von Analytenmasse zur kleinsten Masse, und über Dreisatz die entsprechende Spannungsdifferenz, zieht man diese von 5000 Volt ab, erhält man die exakte Spannung für den Analyten.

Damit ließ sich für die HPB-Bestimmung die Spannung berechnen:

Im Kalibrationsfenster:

$$\text{kleinste Masse} = 306$$

$$\text{Größte Masse} = 381$$

$$\text{Massendifferenz} = 75$$

daraus folgt der Spannungsbereich:

$$\text{größte Spannung} = 5000 \text{ V}$$

$$\text{kleinste Spannung} = 5000 \times \frac{306}{381} = 4016 \text{ V}$$

$$\text{Spannungsdifferenz} = 984 \text{ V}$$

daraus die Massendifferenz des Experiments  
(Analytenmasse - kleinste Masse):

$$359 - 306 = 53$$

hier ergibt sich die Spannungsdifferenz:

$$\frac{984 \text{ V}}{75} \times 53 = 695 \text{ V}$$

damit errechnet sich die Analytenspannung:

$$5000 \text{ V} - 695 \text{ V} = \underline{\underline{4305 \text{ V}}}$$

Daher wurden die Linseneinstellungen bei einer Beschleunigungsspannung von 4305 V optimiert, um den Analyten entsprechend sensitiv und selektiv messen zu können.

Zur Identifizierung des HPB wurden Massenspektren im SCAN-Modus, im Massenbereich von  $m/z$  100 bis 400, aufgenommen. Dazu wurde sowohl ein 5 ng HPB/Gefäß Standard direkt derivatisiert und vermessen, als auch die Proben der Tages- und Wochenpräzision gepoolt und gemessen.

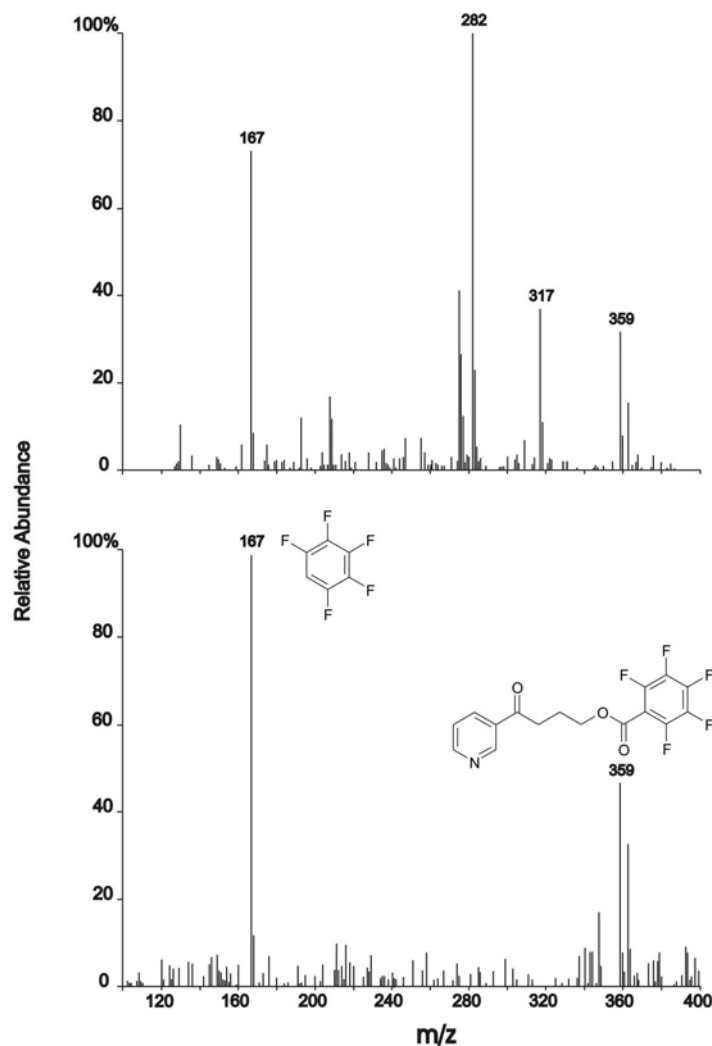


Abbildung 3-2: Typische Massenspektren einer gepoolten Leberprobe (oben) und eines derivatisierten 5 ng HPB-Standards (unten) mit den charakteristischen Zerfallsfragmenten

Die chemische Ionisation zeichnet sich vor allem als schonende Ionisationsart mit geringer Fragmentierung der Analyten aus, und ist daher gut für die quantitative Spurenanalytik geeignet. Abbildung 3-2 zeigt die aufgenommenen Massenspektren von gepoolter Probe und derivatisiertem Standard. Die charakteristischen Fragmente  $m/z$  359 für den Molekülpeak und  $m/z$  167 für das Pentafluorobenzoyl-Fragment treten in beiden Spektren auf und dienen zur eindeutigen Identifizierung des Analyten. Bei der Leberprobe zeigen die zusätzlichen Massenfragmente eine Verunreinigung durch DNA-Bruchstücke.

### 3.1.1.3 Bestimmung der Linearität

Alle Kalibriergeraden wurden mit Lachssperma DNA durchgeführt, von der 0,1 mg/ml in Elutionspuffer gelöst wurde. HPB wurde in steigender Konzentration, der interne Standard  $D_4$ -HPB in gleich bleibender Konzentration zugesetzt. Alle Reihen wurden, wie oben beschrieben, hergestellt und im doppelten Ansatz aufgearbeitet. Die einzelnen Proben durchliefen den gesamten Analysengang von der Hydrolyse bis zur GC/MS-Messung.

Zur Auswertung wurde das Verhältnis der Flächen von HPB zu  $D_4$ -HPB gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen und das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression ( $r^2$ ) bestimmt.

Im maximal zu erwartenden Arbeitsbereich lag das Bestimmtheitsmaß bei 0,99 und nahe der Nachweisgrenze bei 0,85 (Abbildung 3-3).

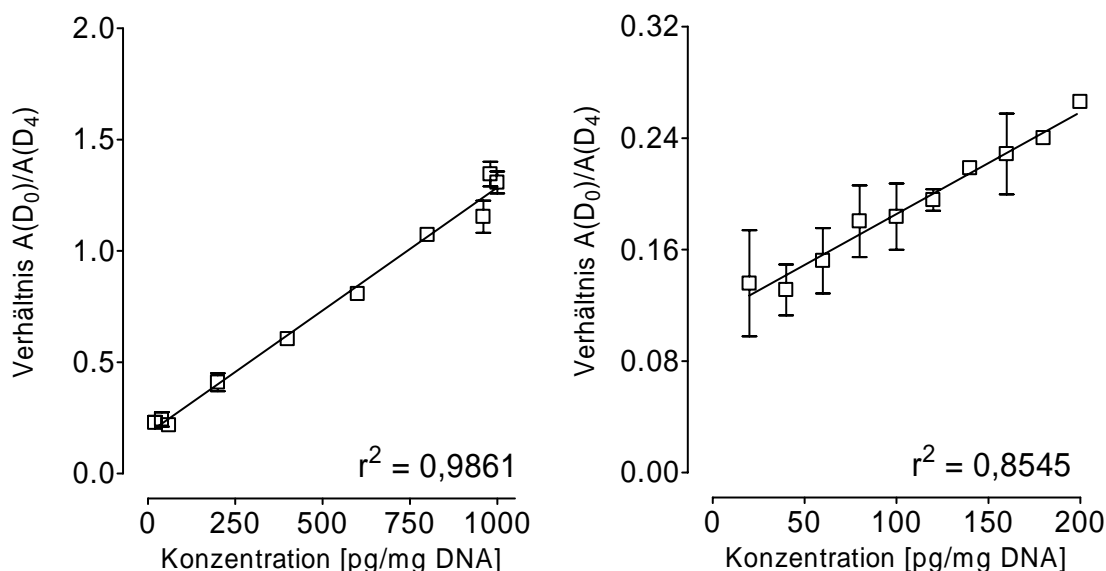


Abbildung 3-3: Kalibriergeraden der Verdünnungsreihen für den maximalen Arbeitsbereich (links) und nahe der Nachweisgrenze (rechts), mit Angabe des Bestimmtheitsmaßes der linearen Regression ( $r^2$ )

#### 3.1.1.4 Bestimmung der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze

Zur Berechnung der Nachweisgrenze wurde Formel 2-4 nach DIN 32 645 herangezogen. Es wurden zehn Konzentrationen hergestellt und in Doppelbestimmung aufgearbeitet und vermessen. Die einzelnen Konzentrationen lagen zwischen 20 und 200 pg HPB/mg DNA mit ansteigenden Schritten von 20 pg/mg. Der Mittelwert der Konzentration lag bei 110 pg HPB/mg DNA. Für die Gerade (s. oben) ergab sich eine Steigung von  $7,4 \times 10^{-4}$  und eine Reststandardabweichung von  $7,1 \times 10^{-3}$ . Daraus errechnet sich die Quadratsumme der x-Werte mit  $7,5 \times 10^{-4}$ . Die Quantile der t-Verteilung für eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% beträgt 1,833.

Die errechnete Nachweisgrenze betrug damit 15,2 pg HPB pro mg DNA, bezogen auf 50 µg Lachssperma DNA. Für das freigesetzte HPB nach saurer Hydrolyse entspricht das einem Gehalt von 762 fg HPB.

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden acht DNA-Lösungen ohne Zugabe von Standards aufgearbeitet und vermessen. Die Fläche des Blindwertes auf der Massenspur des Analyten betrug  $1,5970 \times 10^6 \pm 4,0898 \times 10^5$ . Um einen Messwert eindeutig vom Blindwert zu unterscheiden, wird zum mittleren Blindwert die vierfache Standardabweichung addiert. Über die Geradengleichung kann zur Fläche der entsprechende Gehalt errechnet werden, dieser lag mit 171 fg nahe der Nachweisgrenze. Die Streuung der Blindwerte wies einen Variationskoeffizienten von 23% auf. Damit zeigte das Auftreten der Blindwerte einen geringeren Einfluss auf die Bestimmungsgrenze als die Streuung der Kalibriergeraden. Daher wurde die Bestimmungsgrenze, wie in der chromatographischen Praxis üblich, als dreifache Nachweisgrenze angegeben.

Damit betrug die Bestimmungsgrenze 45,7 pg HPB/mg DNA; für das freigesetzte HPB nach saurer Hydrolyse entspricht das einem Gehalt von 2,29 pg.

#### 3.1.1.5 Präzision und Wiederfindung

Die eingewogene Leber wurde in elf Aliquote geteilt, die getrennt voneinander aufgearbeitet und vermessen wurden. Der mittlere DNA-Gehalt betrug  $214,90 \pm 1,24$  µg DNA, daraus ergab sich für die sechs Proben, die in einem Analysengang aufgearbeitet wurden, eine mittlere HPB-Fläche von  $9,64 \pm 1,77 \times 10^7$  und eine Fläche von  $2,07 \pm 0,37 \times 10^8$  für 50 pg zugesetzten D<sub>4</sub>-HPB-Standard. Für die restlichen fünf Proben, die im Wochenrhythmus aufgearbeitet wurden, ergab sich eine Fläche von  $7,75 \pm 2,48 \times 10^7$  bzw.  $1,68 \pm 0,51 \times 10^8$  für HPB und den internen Standard. Für die Tages- bzw. Wochenpräzision errechneten sich Adduktgehalte von  $592,94 \pm 15,89$  und  $619,95 \pm 18,90$  fmol HPB/mg DNA. Dies entspricht einem Variationskoeffizienten von 2,68% bzw. 3,05% für die entsprechende Präzision.



Wurde die Verdünnungsreihe für die Bestimmung der Nachweisgrenze direkt derivatisiert und vermessen, so betrug das Bestimmtheitsmaß 0,94. Daraus errechnete sich die Wiederfindung mit  $45 \pm 15\%$  für den internen Standard D<sub>4</sub>-HBP.

Tabelle 3-1 fasst die Ergebnisse der Validierung der Methode zur Bestimmung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten noch einmal zusammen.

*Tabelle 3-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Methodvalidierung zur Bestimmung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten nach saurer Hydrolyse*

	freies HPB	HPB-Addukt (für 0,05 mg DNA)	
Nachweisgrenze	0,76 pg	15,24 pg/mg DNA	92,28 fmol/mg DNA
Bestimmungsgrenze	2,29 pg	45,73 pg/mg DNA	276,84 fmol/mg DNA
Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ )	0,98		
max. Arbeitsbereich	20 – 1000 pg/mg DNA, entspricht 121 – 6053 fmol/mg DNA		
Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ )	0,99		
Blindwert (AUC m/z 359)	$1,5970 \pm 0,40898 \times 10^6$		
Variationskoeffizient	23,75 %		
Wiederfindung	$45 \pm 15\%$		
Tagespräzision	$97,95 \pm 2,62$ pg/mg DNA, entspricht $592,9 \pm 15,9$ fmol/mg DNA		
Variationskoeffizient	2,68 %		
Wochenpräzision	$102,4 \pm 3,1$ pg/mg DNA, entspricht $620,0 \pm 18,9$ fmol/mg DNA		
Variationskoeffizient	3,05 %		

AUC: „Area under the curve“

### 3.1.2 Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Myosmin und Cotinin

#### 3.1.2.1 Entwicklung und Anpassung der Extraktionsmethode

Zum Beginn der Arbeit waren am Institut schon Methoden für die Myosminextraktion aus Nahrungsmitteln [69] und Muttermilch [117] vorhanden, die jedoch mit einem hohen Material- und Zeitaufwand verbunden waren. Deshalb wurde versucht, eine Methode für die Plasmaextraktion von Cotinin und Nicotin [122], die eine Extraktion mittels Mischphase beinhaltet, für Myosmin zu adaptieren und anzupassen. Die Versuche wurden dafür alle mit <sup>3</sup>H-markiertem Myosmin durchgeführt, um etwaige Schwankungen des GC/MS-Instrumentes zu vermeiden.

Die einzelnen Aufgabe-, Wasch- und Reinigungsschritte der Festphasenextraktion ergaben einen vernachlässigbaren Verlust an  $^3\text{H}$ -Myosmin. Im ersten Eluat waren  $98,0 \pm 2,4\%$  der Ausgangsstrahlung wieder zu finden, im zweiten dagegen nur  $1,0 \pm 0,1\%$ .

Bei der Überprüfung der Extraktionsschritte musste aus dem jeweils entnommenen Volumen auf das Gesamtvolumen rückgerechnet werden, um sich bei der Angabe der Wiederfindung auf die gesamte Strahlung zu beziehen. Dabei musste jedoch die jeweils beim vorherigen Schritt entnommene Strahlung abgezogen werden.

Tabelle 3-2 fasst die die jeweiligen Wiederfindungsraten der einzelnen Extraktionsschritte zusammen. Eine gewisse Ungenauigkeit der Ergebnisse musste dabei in Kauf genommen werden, da ein genaues Bestimmen des jeweiligen Ausgangsvolumens nicht möglich war.

*Tabelle 3-2: Wiederfindungsraten der einzelnen Extraktionsschritte im Vergleich zum vorherigen bezogen auf  $^3\text{H}$ -Myosmin*

	Probe 1	Probe 2	Mittelwert
15 min Abdampfen	74,18%	74,58%	74,38%
Extraktion $3 \times 500 \mu\text{l CH}_2\text{Cl}_2$	65,23%	57,96%	61,59%
Trocknen	122,96%	118,56%	120,76%
Einengen auf $100 \mu\text{l}$	93,1%	78,18%	86,04%
Einengen auf $20 \mu\text{l}$	58,89%	76,20%	68,05%
Insgesamt	45,44%	33,80%	39,62%

Im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung wurde die GC/MS-Anlage mit einbezogen und die Methode nochmals leicht verändert. Vor der Probenaufgabe wurde die Festphase zweimal mit dem Elutionsmittel vorgereinigt, um eine mögliche Vorbelastung mit den Analyten zu vermeiden. Eine genaue Bestimmung der Wiederfindung wurde im Rahmen der endgültigen Methodenvalidierung durchgeführt.

### 3.1.2.2 Identifizierung der Tabakalkaloide Myosmin und Cotinin

Um die zu bestimmenden Nicotinoide zu identifizieren, wurde eine Standardlösung der Analyten hergestellt und im SCAN-Modus zwischen  $m/z$  50 und  $m/z$  200 vermessen. Bei Elektronenstoßionisation kommt es dabei zu charakteristischen Fragmentierungsmustern.

Myosmin zerfällt in die Hauptfragmente  $m/z$  146, 145 und 118 (Abbildung 3-4 A). Cotinin zeigt die Hauptfragmente  $m/z$  98, 119, 118 und 147 (Abbildung 3-4 B).

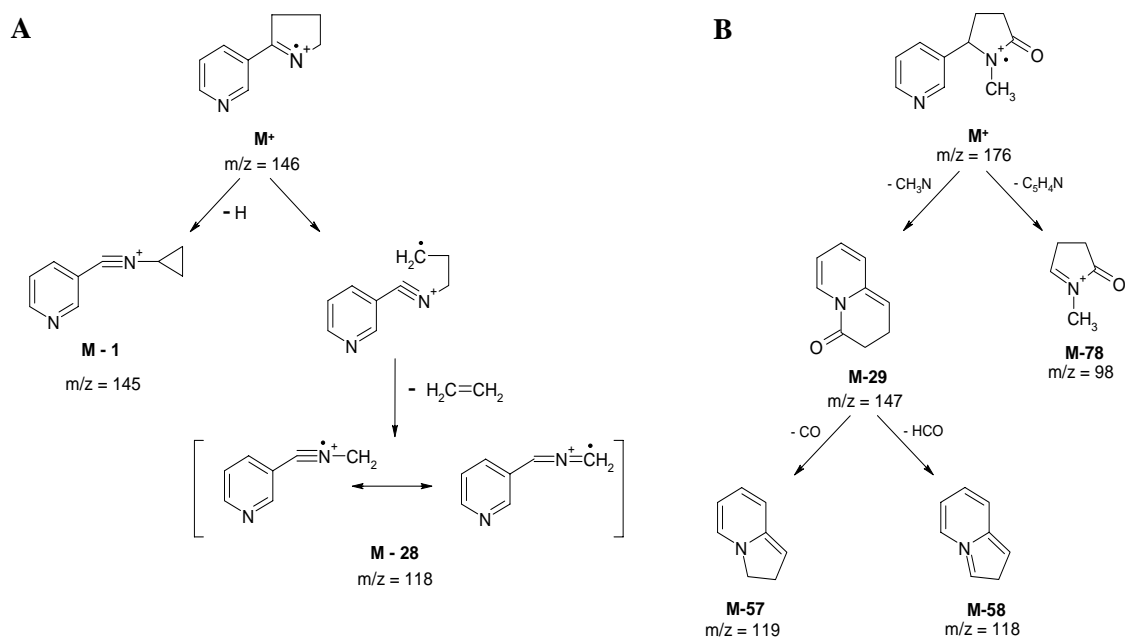


Abbildung 3-4: Fragmentierungsschema von Myosmin (A) und Cotinin (B) zur Bildung der positiv geladenen Hauptionen nach Elektronenstoßionisation [123, 124]

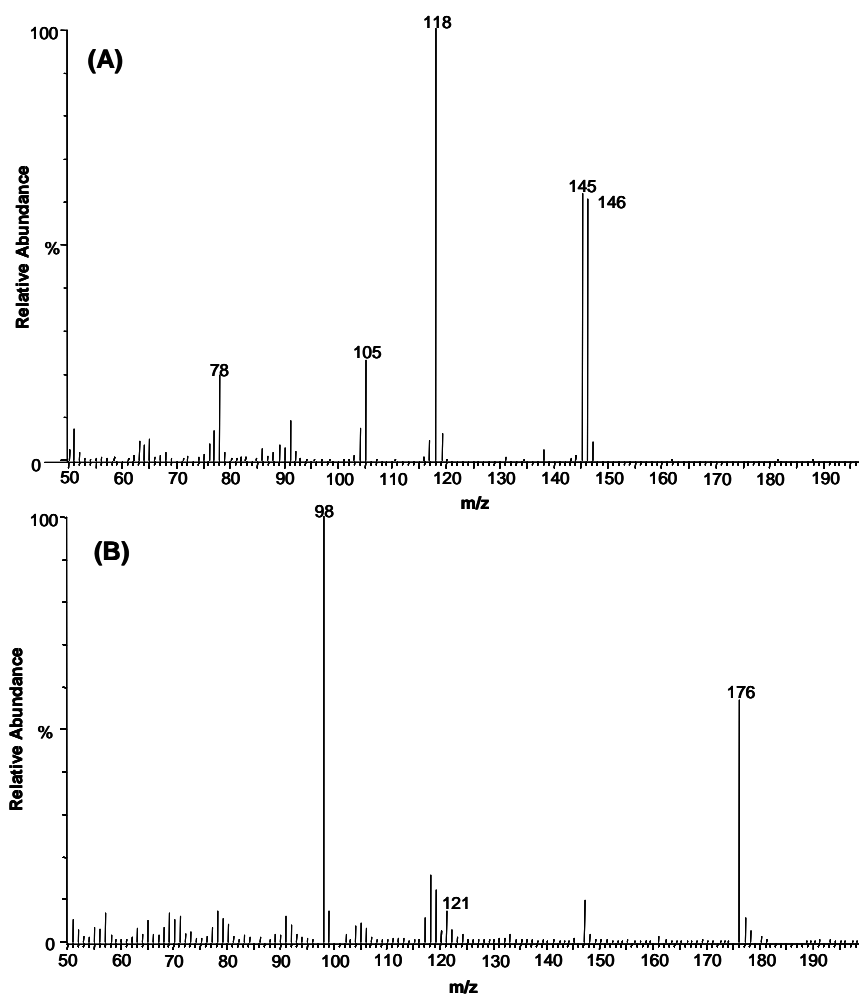


Abbildung 3-5: Massenspektren von Myosmin (A) und Cotinin (B) aus einer Standardlösung im Fullscan bei 70 eV

Die Spektren der Standardlösung zeigten die zu erwartenden Zerfallsschemata. Dabei traten bei Myosmin der Molekülpeak bei  $m/z$  146 und der Basispeak bei  $m/z$  118 auf (Abbildung 3-5 A). Im Cotininspektrum lag der Molekülpeak bei  $m/z$  176 und der Basispeak bei  $m/z$  98 (Abbildung 3-5 B). Zur weiteren Identifizierung dienen die Retentionszeiten, die sich von den Retentionszeiten der jeweiligen deuterierten Standards nur geringfügig unterscheiden, wobei der Analytenpeak kurz hinter dem entsprechenden Peak des deuterierten Standards liegt.

### 3.1.2.3 Überprüfung der Präzision der GC/MS Anlage und der Methode

Die Validierung der Methode zur Bestimmung der Plasmakonzentration von Myosmin und Cotinin wurde mit Kälberserum anstelle von Plasma durchgeführt.

Für die Bestimmung der Tagespräzision wurden sechs identische Proben an einem Tag aufgearbeitet. Die Proben wurden alle mit dem zugehörigen Standard der Konzentration 1 ng/ml Myosmin und 3 ng/ml Cotinin versehen. Von jeder Probe wurde 1  $\mu$ l in das GC/MS eingespritzt und auf den entsprechenden Massenspuren vermessen. Neben den Abweichungen der Flächeneinheiten wurde ebenso die Konzentration des jeweiligen Analyten bestimmt. Die Konzentrationen der Analyten sollten ebenso immer im gleichen Bereich liegen (Tabelle 3-3). Die Bestimmung der Wochenpräzision gleicht jener der Tagespräzision, nur wurde hier über sechs Wochen jeweils eine Probe der gleichen Ausgangsmatrix aufgearbeitet und vermessen (Tabelle 3-3).

*Tabelle 3-3: Tages- und Wochenpräzision (Werte des internen Standards) aus Kälberserum, stellvertretend für Plasma und Speichel (MW  $\pm$  SD, n = 6)*

Substanz	Flächeneinheiten (AUC $\times 10^6$ )	Abweichungen	Konzentration (ng/ml)
<b>Tagespräzision</b>			
Myosmin	7,10 $\pm$ 1,05	14,75%	0,65 $\pm$ 0,10
D <sub>4</sub> -Myosmin	21,39 $\pm$ 2,89	13,52%	
Cotinin	10,18 $\pm$ 0,76	7,47%	1,00 $\pm$ 0,14
D <sub>3</sub> -Cotinin	54,36 $\pm$ 5,13	9,43%	
<b>Wochenpräzision</b>			
Myosmin	10,79 $\pm$ 1,93	17,85 %	0,84 $\pm$ 0,11
D <sub>4</sub> -Myosmin	20,73 $\pm$ 1,23	5,95 %	
Cotinin	30,59 $\pm$ 1,14	3,71 %	1,97 $\pm$ 0,10
D <sub>3</sub> -Cotinin	80,87 $\pm$ 1,28	1,58 %	

## 3.1.2.4 Bestimmung von Linearität und Bestimmtheitsmaß

Anhand der unter 2.4.3.5 beschriebenen Verdünnungsreihen wurde die Linearität für beide Analyten bestimmt. Die Bestimmung wurde mit doppeltem Ansatz durchgeführt. Zur Angabe der Linearität wurde das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) berechnet, gleichzeitig konnte durch Vergleich der gemessenen Reihen mit der aufgearbeiteten Verdünnung die Wiederfindung bestimmt werden. Die Bestimmtheitsmaße der Verdünnungen von Myosmin und Cotinin lagen bei 0,99 und 0,98 (Abbildung 3-6).

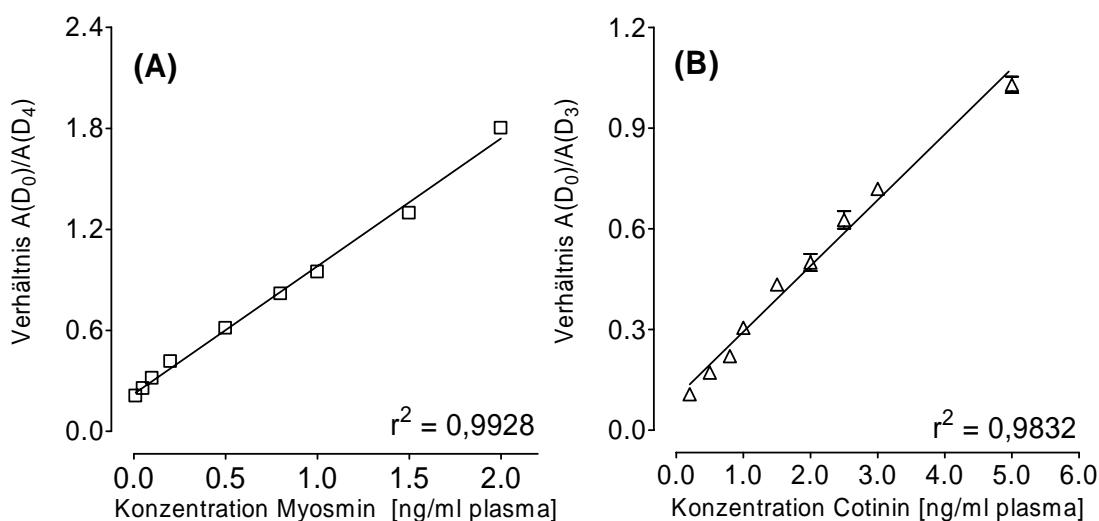


Abbildung 3-6: Kalibriergeraden der Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) von Myosmin (A) und Cotinin (B) in Kälberserum

## 3.1.2.5 Identifizierung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Bei Vermessung von acht Leerwertproben traten keine eindeutigen Blindwerte auf. Daher wurden die analytischen Grenzen über das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) ermittelt. Die Nachweisgrenze entspricht der Konzentration, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis bei 1 zu 3 liegt. Die Bestimmungsgrenze liegt bei einem S/N = 1 zu 6 (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Nachweis- und Bestimmungsgrenze (ng/ml) in Plasma und Speichel

Analyt	Nachweisgrenze (LOD)	Bestimmungsgrenze (LOQ)
Myosmin	0,0012	0,0036
Cotinin	0,05	0,16

LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantification

## 3.1.2.6 Wiederfindung der Analyten

Die Wiederfindung wurde durch Vermessung von neun Proben des internen Standards bestimmt und lag für Myosmin bei  $92,6 \pm 10,0\%$  und für Cotinin bei  $91,1 \pm 12,4\%$ .

## 3.2 Ergebnisse der Ösophagus-Studie

Im Rahmen dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen der Entstehung des EAC und der Myosminbelastung durch Ernährungsgewohnheiten untersucht. Alle für diese Studie durchgeführten Probenahmen und Befragungen wurden durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt.

Die teilnehmenden Probanden waren in der Zeit zwischen Februar und Mai 2007 in der Gastroenterologie der medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar in Behandlung. Die Patienten wurden vom behandelnden Arzt über Sinn und Zweck der Studie unterrichtet und erklärten durch Unterschrift ihr Einverständnis im Rahmen der Studie zwei Biopsien der Speiseröhre und eine Blutprobe zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich wurde ihnen ein Fragebogen übergeben, den die Teilnehmer eigenständig ausfüllten. Dieser Fragebogen erfasste soziodemographische Daten, sowie Informationen zu Ernährungsgewohnheiten, Genuss von Tabakprodukten und alkoholischen Getränken; zusätzlich wurde nach Symptomen und Begleiterkrankungen gefragt. Im Anschluss an den Fragebogen konnte der behandelnde Arzt noch Angaben zum Krankheitsstatus der Patienten anfügen.

### 3.2.1 Einteilung der Probanden

Im Rahmen der Studie konnten Daten von 92 Probanden über den Fragebogen erfasst werden. Dabei waren 48,9% Frauen (N = 45) und 51,1% Männer (N = 47). Das Alter der Patienten betrug im Mittel  $53,4 \pm 15,1$  Jahre (20 – 80).

Tabelle 3-5: Einordnung des Probandenpools in Untergruppen nach ihrem Krankheitsstatus

Status	Anzahl		Alter [MW $\pm$ SD]	weiblich		männlich	
	N	%		N	%	N	%
Kontrolle	19	20,7	$48 \pm 16$	16	84,2	3	15,8
Reflux	6	6,5	$54 \pm 10$	2	33,3	4	66,7
GERD	21	22,8	$50 \pm 17$	6	28,6	15	71,4
Barrett	8	8,7	$56 \pm 10$	2	25,0	6	75,0
EAC	4	4,3	$63 \pm 9$			4	100,0
ESCC	8	8,7	$60 \pm 8$	4	50,0	4	50,0
sonst. CA	16	17,4	$58 \pm 16$	8	50,0	8	50,0
Gastritis	9	9,8	$53 \pm 18$	6	66,7	3	33,3
Mycosis	1	1,1	57	1	100,0		

CA: Karzinom

Jeder Teilnehmer konnte nach dem ärztlichen Befund hinsichtlich seines Krankheitsstatus eingeordnet werden. Insgesamt ergaben sich neun Untergruppen: Kontrolle, Reflux, gastroösophageale Refluxkrankheit und Ösophagitis (GERD), Barrett-Ösophagus (Barrett), ösophageales Adenokarzinom (EAC), Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (ESCC), andere Karzinome (sonst. CA), Gastritis und Ulcus (Gastritis), sowie ein Patient mit einer Mycosis. Tabelle 3-5 zeigt eine Übersicht der Patienten eingeteilt nach ihrem Krankheitsstatus.

Insgesamt gaben 69 Probanden (75%) Informationen zu ihrem höchsten erreichten Schulabschluss ab, dabei hatten 28% ein abgeschlossenes Studium, 19% die allgemeine Hochschulreife, 19% die mittlere Reife, 25% einen Hauptschulabschluss und 10% einen sonstigen Abschluss. In Bezug auf den Krankheitsstatus ergab sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

### 3.2.2 Bestimmung der Plasmakonzentration von Myosmin und Cotinin

Vor der Endoskopie wurde den am Morgen einbestellten nüchternen Patienten in der Klinik Blut entnommen. Insgesamt wurden 84 Blutproben gewonnen und in unser Institut überführt, das entspricht 91% aller Teilnehmer. Das Plasma wurde abzentrifugiert und die Nicotinoide mittels Festphase extrahiert und mit GC/MS quantifiziert. Die Abbildungen 3-7 und 3-8 zeigen typische Chromatogramme für Myosmin und Cotinin.

An Hand der Methodvalidierung konnten die Proben eingeordnet werden; bei der Myosminbestimmung lagen 12 Proben unterhalb der Nachweisgrenze, sie wurden als nicht detektierbar gewertet. Bei der Cotininbestimmung waren es 50 Proben. Beim Myosmin lagen 72 Proben oberhalb der Bestimmungsgrenze, beim Cotinin 34 und waren somit einwandfrei quantifizierbar (Tabelle 3-6), das entspricht für die Myosminbestimmung 86% und für die Cotininbestimmung 40% aller erhaltenen Proben.

Tabelle 3-6: Einordnung der Plasmaproben nach Nachweis- und Bestimmungsgrenze

	Gesamt	n.d.	nur qualitativ	quantitativ
Myosmin	84	12	0	72
Cotinin	84	50	0	34

*n.d.: nicht detektierbar.*

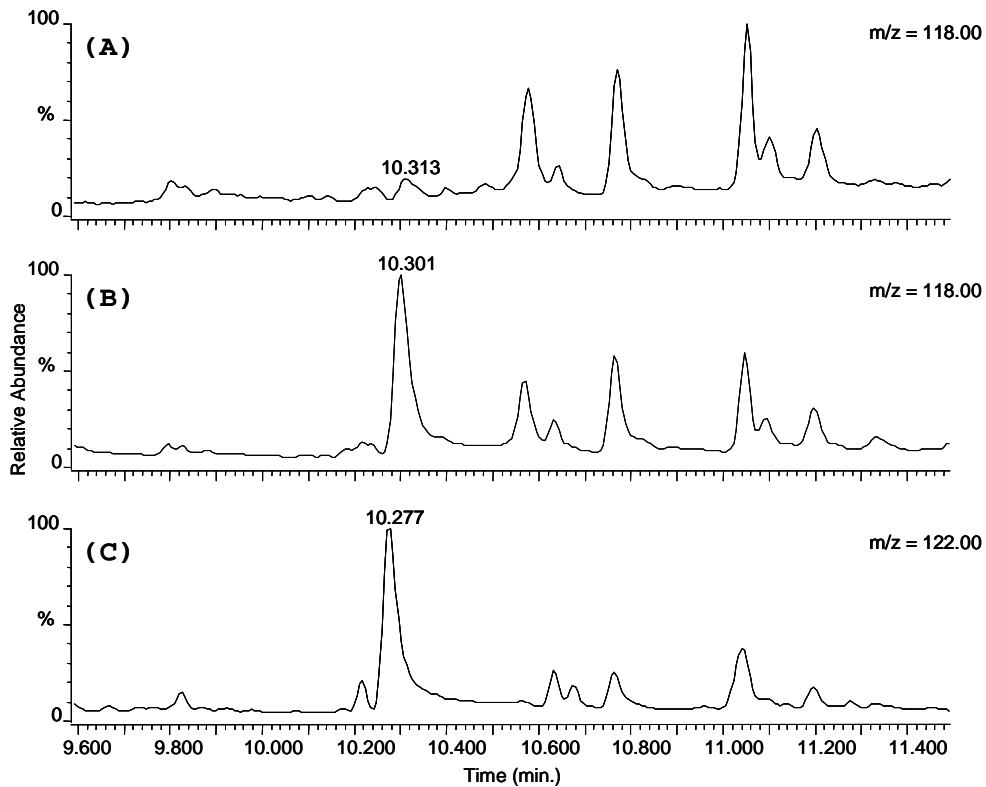


Abbildung 3-7: Typisches GC/MS-Chromatogramm. (A) Analytenspur einer Leerprobe, (B) Massenspur des Myosmins, (C) Massenspur des internen Standards  $D_4$ -Myosmin derselben Probe

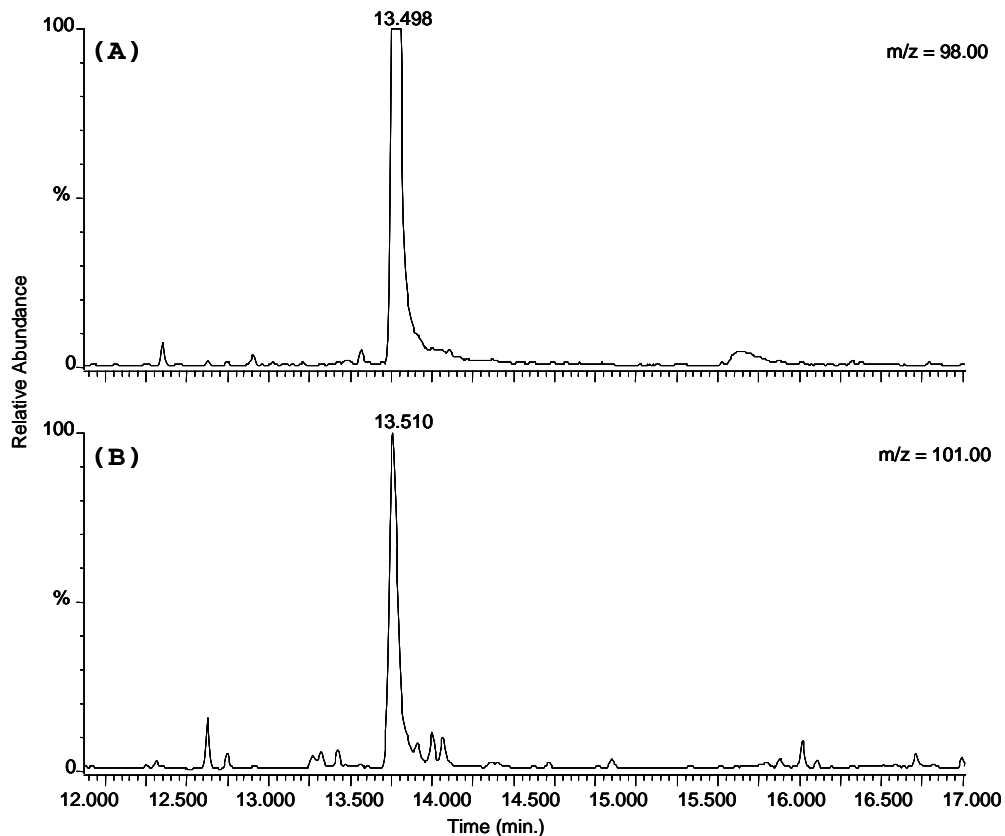


Abbildung 3-8: Typisches GC/MS-Chromatogramm. (A) Massenspur des Cotinins einer Raucherprobe, (B) Massenspur des internen Standards  $D_3$ -Cotinins



### 3.2.3 Beurteilung und Einordnung des Rauchstatus

Im Fragebogen gaben insgesamt 26 Teilnehmer an, regelmäßig Zigaretten zu rauchen. Dahingegen bezeichneten sich 47 Probanden als Nichtraucher und 19 gaben an seit längerem nicht mehr geraucht zu haben (Tabelle 3-7). In der Literatur wird ein Cotininwert von 15 ng/ml Plasma als Grenze angesehen, ab der ein Raucher eindeutig identifizierbar ist („cut-off“-Wert) [125]. Von den 84 untersuchten Plasmaproben lagen 24 über diesem Wert. Es zeigte sich, dass auf Grund des Plasmacotininwertes  $>15$  ng/ml zwei Patienten der Nichtrauchergruppe und drei der Ex-Rauchergruppe zu den aktuellen Rauchern gerechnet werden mussten. Zwei Raucher wiesen ein Plasmacotinin unter dem „cut-off“-Wert auf, wurden jedoch weiterhin zu den Rauchern gerechnet. Im Mittel gaben die Ex-Raucher an seit  $16,5 \pm 12,8$  Jahren (3 -40 Jahre) nicht mehr zu rauchen, daher wurde bei der Betrachtung des akuten Rauchstatus die Ex-Raucher zu den Nichtrauchern gezählt (Tabelle 3-7).

*Tabelle 3-7: Einteilung des Probandenpools nach Rauchgewohnheit; Vergleich zwischen Angaben im Fragebogen, Plasmacotinin und dem akuten Rauchstatus*

		N	%
Rauchgewohnheit nach Fragebogen	Nichtraucher	47	51,1
	Ex-Raucher	19	20,7
	Raucher	26	28,3
Rauchgewohnheit nach Plasmacotinin	Nichtraucher	45	48,9
	Ex-Raucher	16	17,4
	Raucher	31	33,7
Akuter Rauchstatus	Nichtraucher	61	66,3
	Raucher	31	33,7

Hinsichtlich des Geschlechts zeigen sich keine auffälligen Unterschiede beim Rauchstatus. In Bezug auf den akuten Rauchstatus beträgt das Verhältnis Frauen zu Männern bei den Nichtrauchern 31/30 und bei den Rauchern 14/17.

Tabelle 3-8 fasst die Einteilung aller teilnehmenden Patienten hinsichtlich Krankheitsstatus, der Rauchgewohnheit nach dem Cotininlevel und dem akuten Rauchstatus zusammen.

Es tritt eine signifikante Beziehung zwischen dem Krankheitsstatus und der unterschiedlichen Einteilung des Rauchstatus auf. Interessanter Weise zeigt sich bei der Einteilung nach dem Cotinin im Plasma der Patienten eine höhere Signifikanz ( $\chi^2$ -Test,  $p = 0,012$ ), als dies bei der Gliederung nach dem akuten Rauchstatus der Fall ist ( $\chi^2$ -Test,  $p = 0,015$ ), es muss bei der

weiteren Auswertung also immer zwischen kurzzeitigen Ereignissen und langwierigen Prozessen unterschieden werden, die die Krankheitsentstehung beeinflussen können.

*Tabelle 3-8: Einteilung der einzelnen Untergruppen des Krankheitsstatus hinsichtlich der Rauchgewohnheit bzw. dem akuten Rauchstatus*

		Rauchgewohnheit nach der Cotininkonzentration			akuter Rauchstatus	
		NR	R	ER	NR	R
Kontrolle	N	10	6	3	13	6
	%	52,6	31,6	15,8	68,4	31,6
Reflux	N	4	2		4	2
	%	66,7	33,3		66,7	33,3
GERD	N	14	4	3	17	4
	%	66,7	19,0	14,3	81,0	19,0
Barrett	N	6	1	1	7	1
	%	75,0	12,5	12,5	87,5	12,5
EAC	N		3	1	1	3
	%		75,0	25,0	25,0	75,0
ESCC	N	3		5	8	
	%	37,5		62,5	100	
sonst. CA	N	6	8	2	8	8
	%	37,5	50,0	12,5	50,0	50,0
Gastritis	N	2	6	1	3	6
	%	22,2	66,7	11,1	33,3	66,7
Mycosis	N		1			1
	%		100			100

NR: Nichtraucher, ER: Ex-Raucher, R: Raucher

### 3.2.4 Übergewicht und Krankheitsstatus

Um den Einfluss des Körpergewichts besser beurteilen zu können wurde der Body-Mass-Index herangezogen, der sich nach Formel 3-2 berechnet:

$$BMI = \frac{\text{Gewicht [ kg ]}}{(\text{Körpergröße [ m ]})^2} \quad (\text{Formel 3-2})$$

Angaben zu Körpergröße und Gewicht machten 97% aller Teilnehmer, damit konnte von 89 Probanden der BMI berechnet werden. Im Mittel betrug der BMI  $25,22 \pm 4,57$ , dabei hatten Männer mit  $25,71 \pm 4,32$  einen leicht höheren BMI als Frauen, mit  $24,71 \pm 4,81$ .

Innerhalb der einzelnen Krankheitsgruppen zeigt sich der BMI vor allem bei Refluxpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 3-9). Tabelle 3-9 zeigt die unterschiedlichen Signifikanzniveaus der Untergruppen nach Kruskal-Wallis-Test und Test nach Tamhane unter

Ausschluss des einzelnen Patienten mit Pilzbefall. Refluxpatienten haben einen signifikant höheren BMI als die Kontroll- und die ESCC-Gruppe und die Patienten mit anderen Krebsarten.

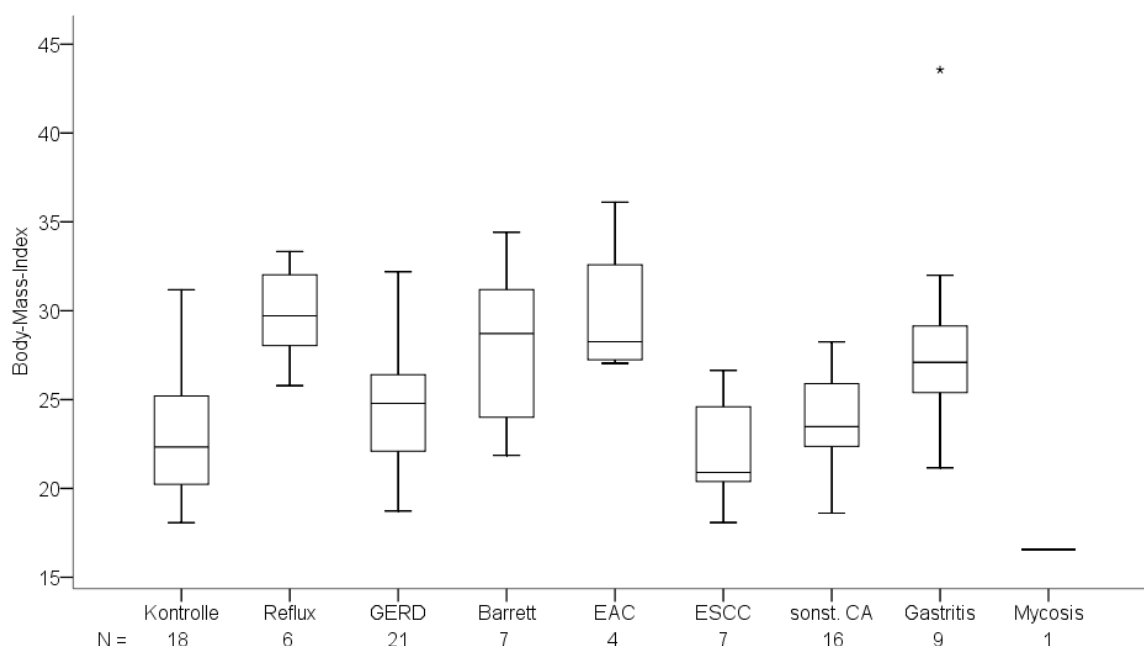


Abbildung 3-9: Body-Mass-Index in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus

Tabelle 3-9: Signifikanzniveaus für den Body-Mass-Index bezogen auf den Krankheitsstatus nach statistischer Analyse (Kruskal-Wallis  $p \leq 0,001$ ) und Tamahane-Test.

	Reflux	GERD	Barrett	EAC	ESCC	sonst CA.	Gastritis
Kontrolle	<b>0,023</b>	1,000	1,000	0,710	1,000	1,000	0,772
Reflux		0,117	1,000	1,000	<b>0,020</b>	<b>0,048</b>	1,000
GERD			0,986	0,920	0,944	1,000	0,985
Barrett				1,000	0,469	0,859	1,000
EAC					0,511	0,821	1,000
ESCC						0,999	0,518
sonst CA.							0,877

### 3.2.5 Ernährungsgewohnheiten und Krankheitsstatus

Der Fragebogen umfasste eine Vielzahl von Fragen zu Ernährungsgewohnheiten, sowohl allgemeiner Art, wie bevorzugte Küche, Verzehrttemperatur, Geschwindigkeit des Verzehr, Hauptmahlzeiten und Zwischenmahlzeiten, tägliche Trinkmenge usw., aber es wurde auch nach Aufnahme spezieller Lebensmittel gefragt. Dabei waren vor allem Fleisch- und Wurstwaren, Fisch, Obst und Gemüse, geräucherte Lebensmittel, sowie jegliche Art von Süßwaren und Süßspeisen von besonderem Interesse. Auch Informationen über Kaffee-, Tee- und Alkoholkonsum wurden abgefragt.

Die Auswertung dieser Daten gestaltete sich als schwierig, da im Rahmen dieses Fragebogens die Komplexität der Ernährung und der Einfluss der einzelnen Nahrungskomponenten nicht hinreichend geklärt werden konnte. Aufgrund der zu geringen Probandenzahl konnte meist keine aussagekräftige Auswertung durchgeführt werden. Es wurde versucht durch Zusammenfügung einzelner Fragestellungen, z.B. zum Konsum von Fleisch und Wurst (Abbildung 3-10), eine ausreichende Anzahl für einzelne Kategorien zu erhalten, aber selbst dann zeigten sich oft keine auffälligen Tendenzen bzw. signifikanten Unterschiede. Im Nachfolgenden werden nur interessante Ergebnisse bzw. markante Unterschiede zwischen den Untergruppen aufgezeigt. Es ergaben sich keine Auffälligkeiten hinsichtlich Krankheitsstatus mit der Verzehreremperatur und mit dem Anteil von Fisch, Obst, Gemüse und Süßwaren an der täglichen Ernährung. Auf diese Ergebnisse wird daher nicht mehr eingegangen. Auch beim Konsum von schwarzem und grünem Tee zeigten sich keine Tendenzen zu den einzelnen Gruppen des Krankheitsstatus.

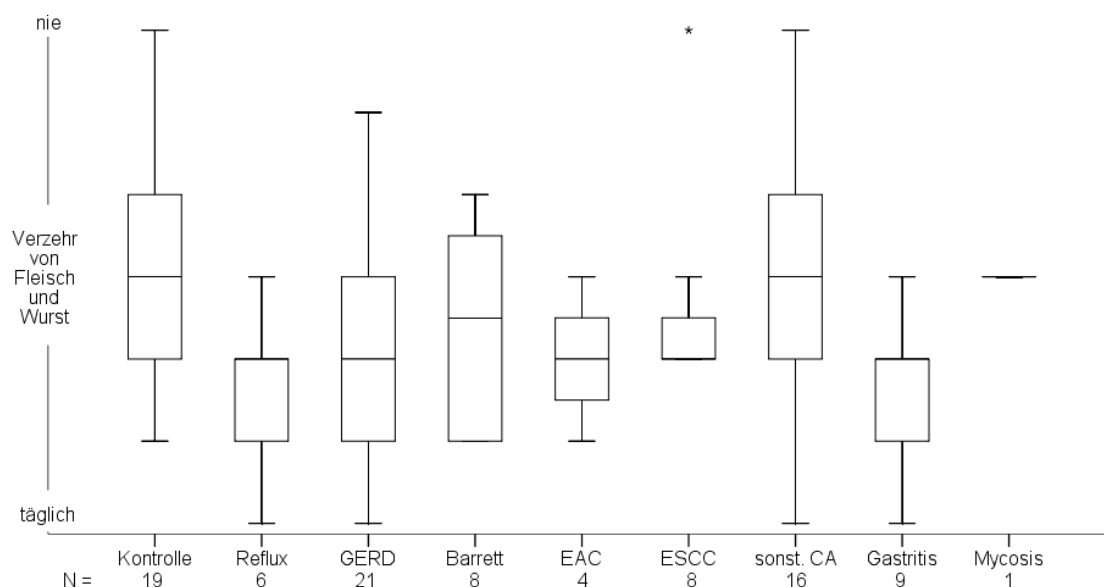


Abbildung 3-10: Konsum von Fleisch- und Wurstwaren in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus

Bei der Frage nach den Hauptmahlzeiten gaben 47% der Befragten Frühstück, Mittagessen und Abendessen gleichzeitig an, damit entfällt eine Analyse hinsichtlich des Krankheitsstatus und der Hauptmahlzeit. Bei der Frage, ob der Proband regelmäßig Zwischenmahlzeiten zu sich nehmen, antworteten 48% von 89 Befragten mit ja. Allerdings nehmen von den Patienten mit Reflux oder Barrett-Ösophagus weniger als ein Drittel Zwischenmahlzeiten zu sich (Tabelle 3-10), während bei der Kontrollgruppe nahezu zwei Drittel diese Frage bejahten. Doch erreicht die Beziehung zwischen dem Krankheitsstatus und dem regelmäßigen Verzehr von Zwischenmahlzeiten keine Signifikanz ( $\chi^2$ -Test,  $p = 0,411$ ).

Tabelle 3-10: Verzehr von Zwischenmahlzeiten in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus

Status	Zwischenmahlzeiten		keine Zwischenmahlzeiten	
	N	%	N	%
Kontrolle	12	63,2	7	36,8
Reflux	1	16,7	5	83,3
GERD	9	45,0	11	55,0
Barrett	2	25,0	6	75,0
EAC	3	75,0	1	25,0
ESCC	3	42,9	4	57,1
sonst. CA	8	50,0	8	50,0
Gastritis	4	50,0	4	50,0
Mycosis	1	100,0		
Gesamt	43	48,3	46	51,7

Der Vergleich zwischen den Untergruppen des Krankheitsstatus und der Verzehrsgeschwindigkeit erreicht dagegen Signifikanz ( $\chi^2$ -Test,  $p \leq 0,05$ ). Ein Teil der Patienten mit einer Schädigung der Speiseröhre (Reflux, GERD, Barrett, ESCC) scheinen ihre Nahrung im Vergleich zur Kontrolle bewusster zu sich zu nehmen, ein anderer Teil dieser Gruppe im Gegensatz dazu nicht (Tabelle 3-11).

Tabelle 3-11: Verzehrsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus

Status	hastig		normal		sehr bewusst und langsam	
	N	%	N	%	N	%
Kontrolle	2	10,5	15	78,9	2	10,5
Reflux	1	16,7	4	66,7	1	16,7
GERD	5	23,8	16	76,2		
Barrett			5	62,5	3	37,5
EAC			4	100,0		
ESCC	3	37,5	2	25,0	3	37,5
sonst. CA			11	68,8	5	31,2
Gastritis	1	11,1	8	88,9		
Mycosis					1	100,0
Gesamt	12	13,0	65	70,7	15	16,3

Die Auswertung der Aufnahme gewürzter bzw. scharfer Speisen im Vergleich zu den Untergruppen des Krankheitsstatus ist in Abbildung 3-11 wiedergegeben. Es fällt auf, dass unter den Patienten mit Reflux bzw. ESCC der Anteil von gelegentlicher bzw. häufiger Aufnahme stark gewürzter Speisen erhöht ist. Die Unterschiede sind aber nicht signifikant.

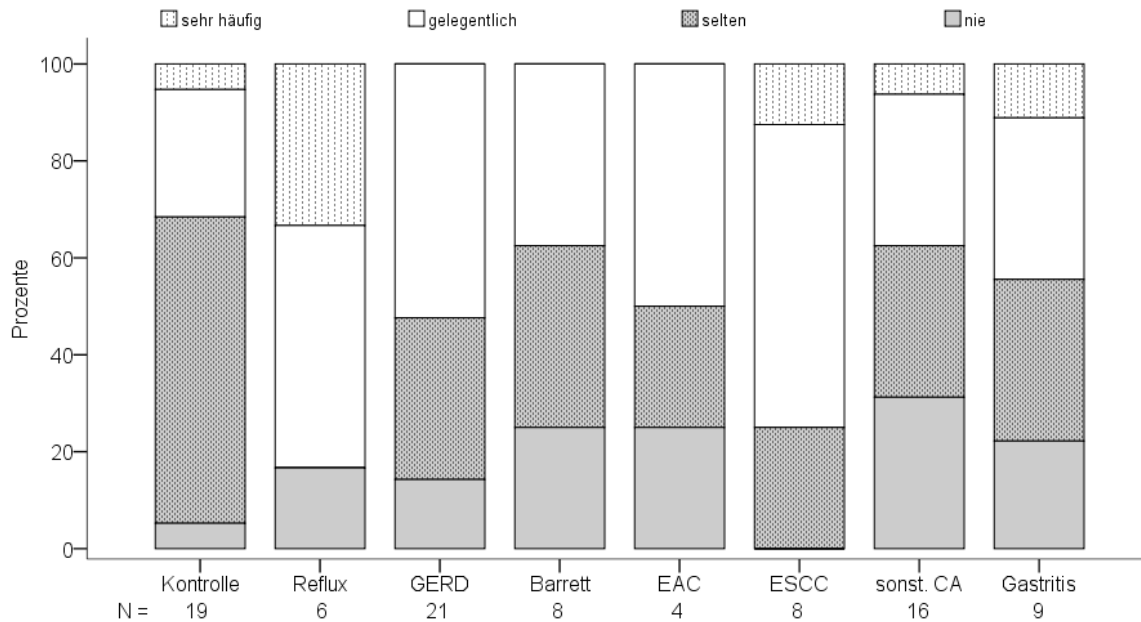


Abbildung 3-11: Aufnahme scharfer Speisen in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus

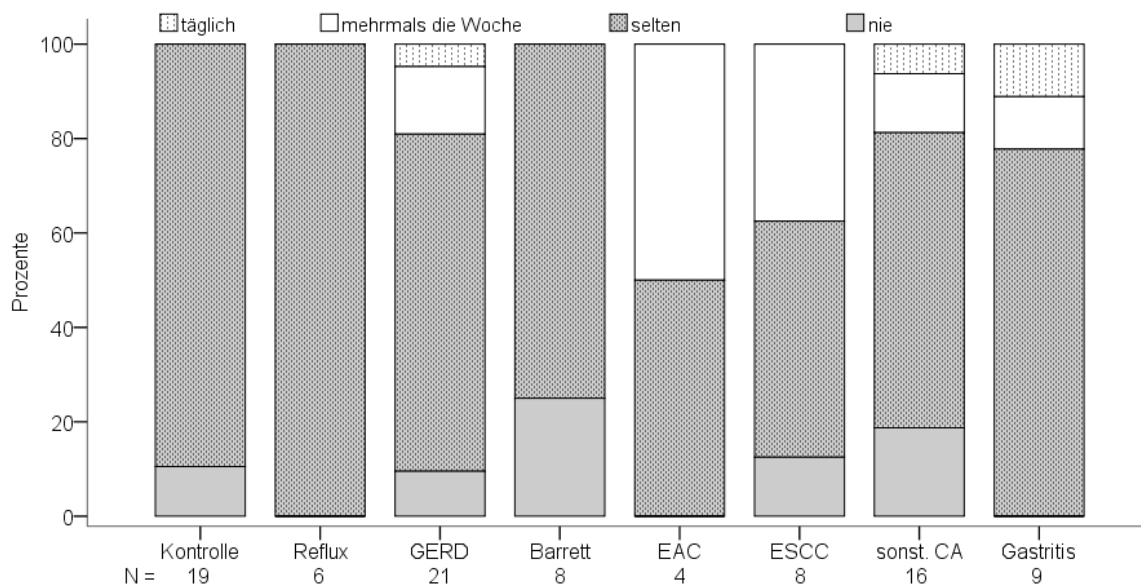


Abbildung 3-12: Aufnahme geräucherter Lebensmittel in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus

Der Fragebogen sollte ebenfalls Informationen zur Aufnahme geräucherter Lebensmittel erfassen. Alle Probanden beantworteten diese Frage. Im Vergleich zum Krankheitsstatus zeigt sich bei den Gruppen mit EAC und ESCC ein höherer Anteil von Patienten, die angaben geräucherte Lebensmittel mehrmals die Woche bis täglich zu sich zu nehmen (Abbildung 3-12).

Ein weiterer Punkt des Fragebogens war die tägliche Flüssigkeitsaufnahme; 98% aller Teilnehmer machten dazu eine Angabe. Auffallend ist, dass die Kontrollgruppe und die Gruppe der Patienten mit Reflux eine Tendenz zu einer höheren täglichen Trinkmenge zeigen, als die anderen Gruppen, mit einer Schädigung der Speiseröhre bzw. mit Tumorerkrankungen (Abbildung 3-13, Tabelle 3-12).

Tabelle 3-12: Tägliches Trinkvolumen [l pro Tag] im Vergleich zum Krankheitsstatus

Status	N	MW $\pm$ SD
Kontrolle	19	2,24 $\pm$ 0,84
Reflux	6	2,75 $\pm$ 0,89
GERD	20	1,97 $\pm$ 0,78
Barrett	8	1,75 $\pm$ 0,58
EAC	4	2,00 $\pm$ 0,41
ESCC	8	1,91 $\pm$ 0,82
sonst. CA	15	1,88 $\pm$ 0,59
Gastritis	9	1,67 $\pm$ 0,78
Mycosis	1	1,00
Gesamt	90	2,00 $\pm$ 0,77

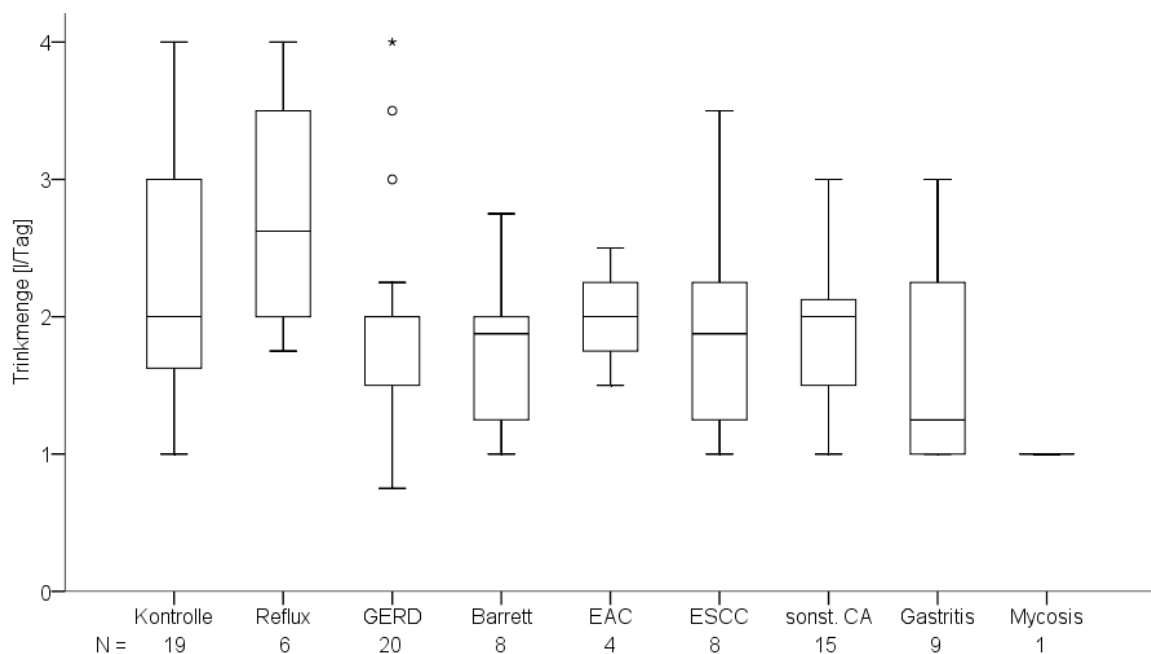


Abbildung 3-13: Gegenüberstellung des Krankheitsstatus zur täglichen Trinkmenge

Auch bei der Betrachtung des Kaffeekonsums zeigte sich, dass vor allem ESCC Patienten mit einem mittleren Konsum von drei Tassen pro Tag mehr Kaffee trinken als die Probanden anderer Untergruppen (Tabelle 3-13).

Tabelle 3-13: Analyse des Kaffeekonsums [Tassen pro Tag] nach dem Krankheitsstatus

Status	N	MW $\pm$ SD
Kontrolle	18	1,75 $\pm$ 1,22
Reflux	6	1,58 $\pm$ 1,69
GERD	20	1,30 $\pm$ 1,48
Barrett	8	1,81 $\pm$ 1,89
EAC	4	1,38 $\pm$ 1,25
ESCC	6	3,00 $\pm$ 1,55
sonst. CA	13	2,04 $\pm$ 1,42
Gastritis	9	1,94 $\pm$ 1,59
Gesamt	84	1,77 $\pm$ 1,48

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Frage nach der täglich aufgenommenen Alkoholmenge. Die Teilnehmer wurden zunächst gefragt, ob sie Alkohol trinken, und wenn ja, welche Menge an Bier, Wein und Schnaps sie täglich konsumieren. Dabei wurde für Bier ein halber Liter, für Wein 0,2 l und für Schnaps 0,02 l als Einheit angegeben. Danach wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt, eine die selten bis nie Alkohol zu sich nimmt, das heißt weniger als zwei Einheiten täglich und eine zweite Gruppe, die regelmäßig Alkohol trinkt, also mehr als zwei Einheiten pro Tag. Alle 92 Teilnehmer machten dabei eine Aussage zu ihrem Trinkverhalten, im Mittel trinken 36% regelmäßig und 64% unregelmäßig Alkohol. Bei den unterschiedlichen Gruppen des Krankheitsstatus scheinen nur die Patienten GERD bzw. Ösophagitis mit 62% regelmäßiger Alkohol zu trinken. Doch erreicht die Beziehung zwischen Alkoholkonsum und Krankheitsstatus keine Signifikanz ( $\chi^2$ -Test,  $p = 0,134$ ).

### 3.2.6 Begleiterkrankungen und Symptome

Die Patienten konnten Angaben zu auftretenden Begleiterkrankungen machen. Diese umfassten Ulcus bzw. Gastritis, Colitis ulcra bzw. M. Crohn, Asthma, chronische Bronchitis, lange Hustenperioden, Diabetes mellitus, Rheuma bzw. Arthritis, Lebererkrankung, Pankreatitis, Hypertonus und erhöhtes Cholesterin. Insgesamt gaben 40% aller Befragten an, an keinen Begleiterkrankungen zu leiden. Die restlichen 60% litten teilweise an mehreren Beschwerden, wodurch sich keine Tendenzen abzeichneten.

Bei der Angabe der auftretenden Symptome ergibt sich wieder ein relativ undifferenziertes Bild, da auch hier die Möglichkeit zu Mehrfachantworten gegeben war. Die Symptome erfassten Schluckstörungen, Völlegefühl, Kurzatmigkeit, Brustschmerz, Kloßgefühl im Hals, Husten, Würgen, Beschwerden im Oberbauch, Einatmen von Nahrungsresten, Heiserkeit, Asthma,



Aufstoßen, Durchfall, Übelkeit, Luftschlucken, Blähungen und Erbrechen. Auffällig war hier lediglich, dass 53% aller Befragten angaben unter Blähungen zu leiden.

Da ein besonderes Interesse am Vorkommen von saurem Reflux bestand, wurde das Auftreten von Sodbrennen aus dem Katalog der Symptome herausgenommen und gesondert betrachtet. Es zeigt sich, dass zwischen dem Auftreten von Sodbrennen und dem Krankheitsstatus ein hoch-signifikanter Zusammenhang besteht ( $\chi^2$ -Test,  $p \leq 0,001$ ). Insgesamt litten nach dem Fragebogen 61% der Patienten häufiger unter Sodbrennen (Tabelle 3-14). Bei den Patientengruppen mit EAC, ESCC und anderen Tumorerkrankungen gab die Mehrzahl an nicht unter Sodbrennen zu leiden. Wohingegen die Mehrzahl aus den Gruppen mit Reflux, GERD und Barrett-Ösophagus an Sodbrennen litt.

*Tabelle 3-14: Auftreten von Sodbrennen in Abhängigkeit zum Krankheitsstatus*

Status	Sodbrennen	
	nein	ja
Kontrolle	N	6
	%	100,0
Reflux	N	18
	%	94,7
GERD	N	6
	%	75,0
Barrett	N	1
	%	25,0
EAC	N	1
	%	12,5
ESCC	N	5
	%	33,3
sonst. CA	N	9
	%	50,0
Gastritis	N	4
	%	80,0
Mycosis	N	1
	%	100,0
Gesamt	N	51
	%	60,7

### 3.2.7 Bestimmung der HPB-freisetzenden DNA-Addukte

Insgesamt wurde 84 Patienten während der endoskopischen Untersuchung Mucosagewebe für die Studie entnommen, das entspricht 91% aller Teilnehmer. Von 81 Patienten wurde je eine Biopsie oral und aboral der Läsion erhalten. Bei fehlender Läsion wurden Biopsien von den entsprechenden Positionen nahe des Mageneingangs genommen. Von zwei Probanden wurde nur aborale Biopsien, von einem Proband nur eine orale Biopsie erhalten.

#### 3.2.7.1 DNA-Bestimmung

Nach Bestimmung des Feuchtgewichts der Biopsien wurde die DNA extrahiert. Die Quantifizierung des DNA-Gehalts erfolgte mittels Absorption bei 260 nm. Zusätzlich zu jedem Ansatz wurde eine Leerprobe aufarbeitet, die kein Gewebe enthielt, um mögliche Verunreinigungen abschätzen zu können. Abbildung 3-14 zeigt ein typisches UV-VIS-Spektrum einer Biopsie zwischen 200 und 500 nm im Vergleich zum Blindwert. Die Probe zeigte eine Absorption von 0,168 bei 260 nm; das entspricht einer DNA-Menge von 35,9 µg.

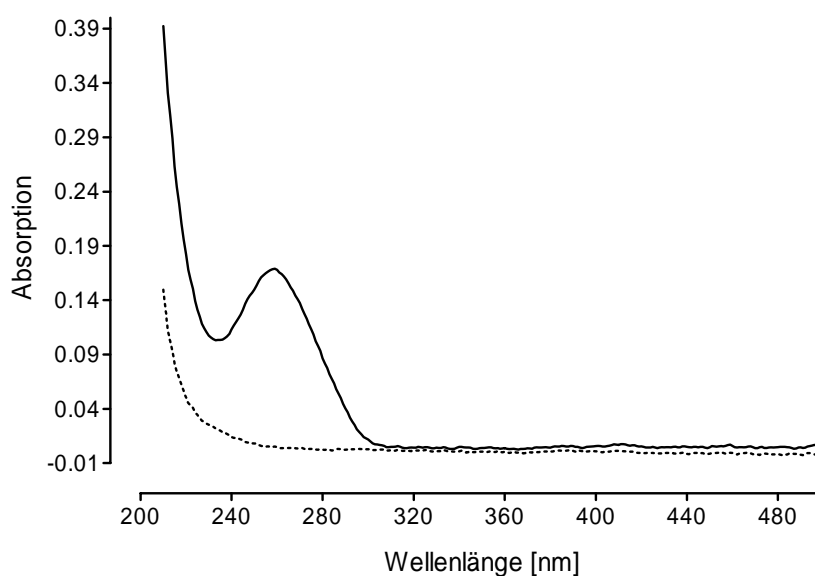


Abbildung 3-14: UV-VIS-Spektrum einer Biopsie der Ösophagasmucosa (durchgehende Linie) mit dem Absorptionsmaximum der DNA bei 260 nm im Vergleich zu einer Leerprobe (gestrichelte Linie)

Die Biopsien hatten ein mittleres Feuchtgewicht von  $5,8 \pm 2,5$  mg; nach der Extraktion wurden  $28,5 \pm 10,7$  µg DNA erhalten, entsprechend einem mittleren DNA-Gehalt von 0,5%.

#### 3.2.7.2 Bestimmung der DNA-Addukte

Die DNA wurde einer sauren Hydrolyse unterworfen, das abgespaltene HPB extrahiert und derivatisiert. Die Menge an HPB wurde am GC/MS bestimmt und quantifiziert. Abbildung 3-15

zeigt ein typisches Chromatogramm der Massenspur des Analyten in einem Blindwert, sowie einer Probe mit zusätzlicher Massenspur für den internen Standard.

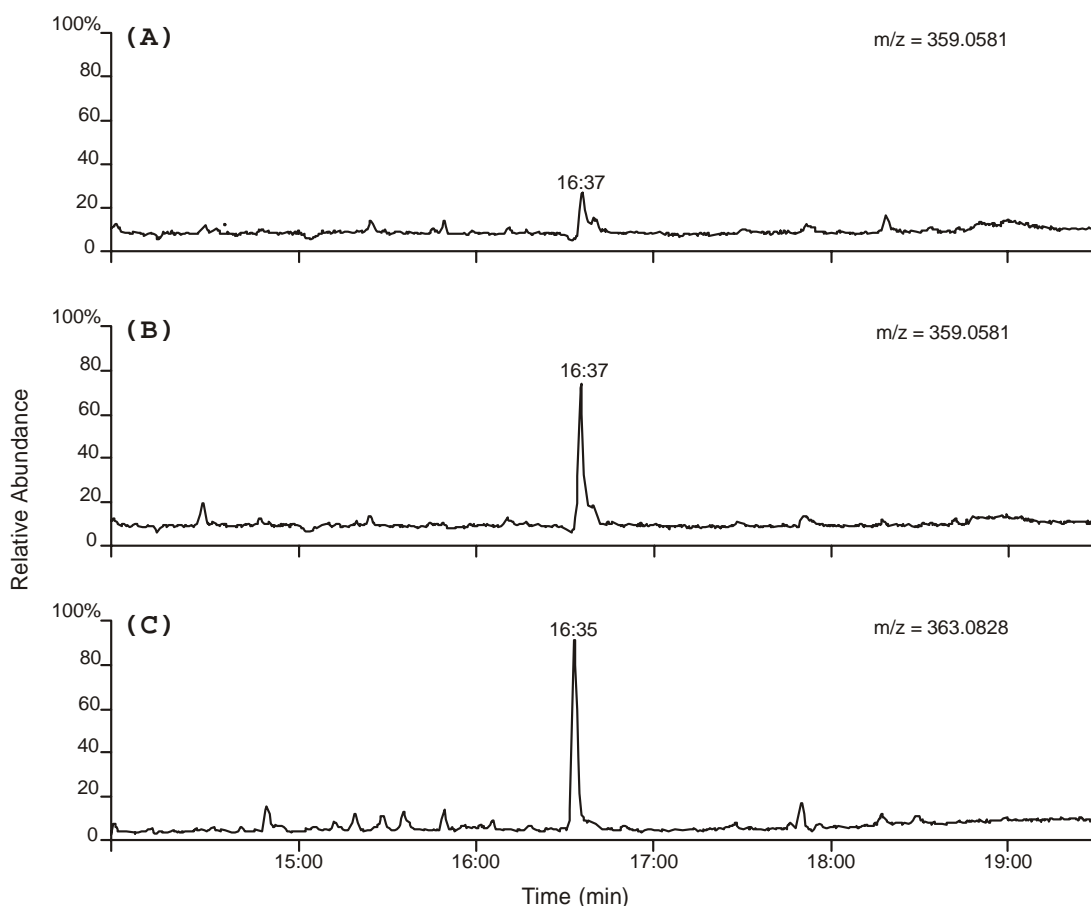


Abbildung 3-15: Typisches GC/MS-Chromatogramm. (A) Massenspur des Analyten einer Leerprobe, (B) Massenspur des HPB einer Biopsie, (C) Massenspur des internen Standards  $D_4$ -HPB derselben Probe

Mit Hilfe des internen Standards wurde für jede Probe der Gehalt an HPB berechnet. Der Validierung folgend konnten die Ergebnisse der Gewebeproben nach Nachweis- und Bestimmungsgrenze eingeordnet werden (Tabelle 3-15). Demnach lagen von den insgesamt 165 Proben 31 unter der Nachweisgrenze (4,6 fmol) und wurden daher als nicht detektierbar (n.d.) gewertet. 14 Proben lagen über der Nachweisgrenze, aber unter der Bestimmungsgrenze; somit wurde ihr Gehalt mit dem halben LOQ (13,9 fmol) angegeben. 120 Proben, also 73% aller erhaltenen Biopsien, lagen über der Bestimmungsgrenze und konnten ohne Probleme quantifiziert werden.

Tabelle 3-15: Einordnung der Ösophagusproben nach Nachweis- und Bestimmungsgrenze

	Gesamt	n.d.	nur qualitativ	quantitativ
oral	82	14	9	59
aboral	83	17	5	61
Gesamt	165	31	14	120

*n.d.*: nicht detektierbar

Nach Division der HPB-Gehalte durch die DNA-Menge ergaben sich für die oralen und aboralen Proben mittlere Adduktkonzentrationen von  $5,04 \pm 8,33$  und  $4,46 \pm 11,08$  pmol HPB/mg DNA (Abbildung 3-16). Der Mittelwert für alle 165 Proben betrug  $4,75 \pm 9,78$  pmol/mg. Nimmt man eine mittlere molare Masse von 330 g/mol für die DNA-Nukleotide an, dann entspricht diese Konzentration einer Belastung der Ösophagusschleimhaut mit  $1,57 \pm 3,23$  HPB-Addukten pro  $10^6$  Nukleotiden.

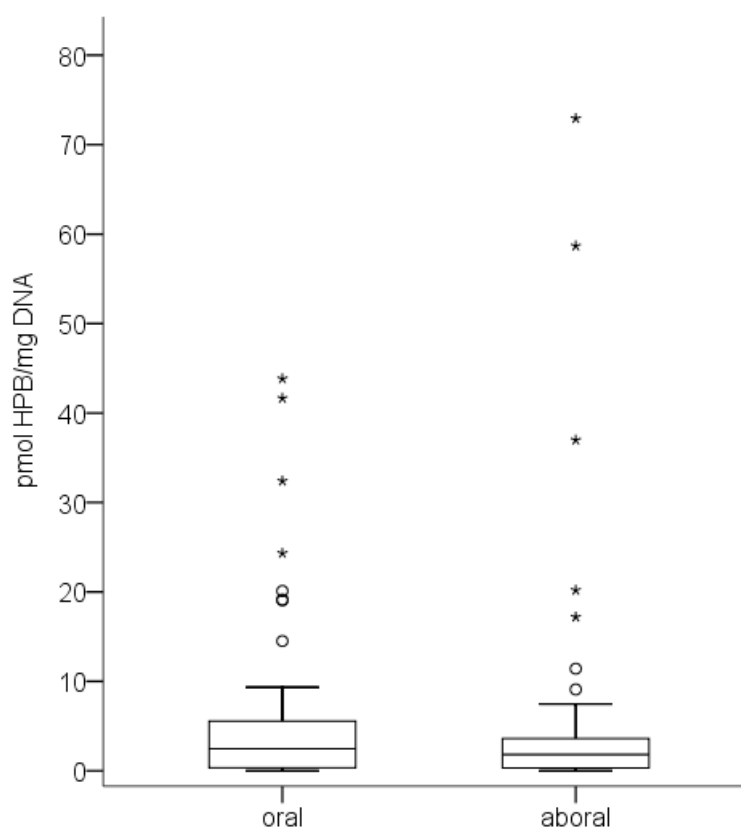


Abbildung 3-16: Adduktlevel der oralen und aboralen Ösophagusproben

Zwischen den Adduktkonzentrationen der gleichzeitig in oralen und aboralen Biopsien von 81 Probanden besteht eine hoch signifikante Korrelation (Abbildung 3-17). Trotz der großen Streuungen ist der Unterschied zwischen oralen und aboralen Werten im Wilcoxon Rang Test für gepaarte Daten noch schwach signifikant ( $p = 0,032$ ).

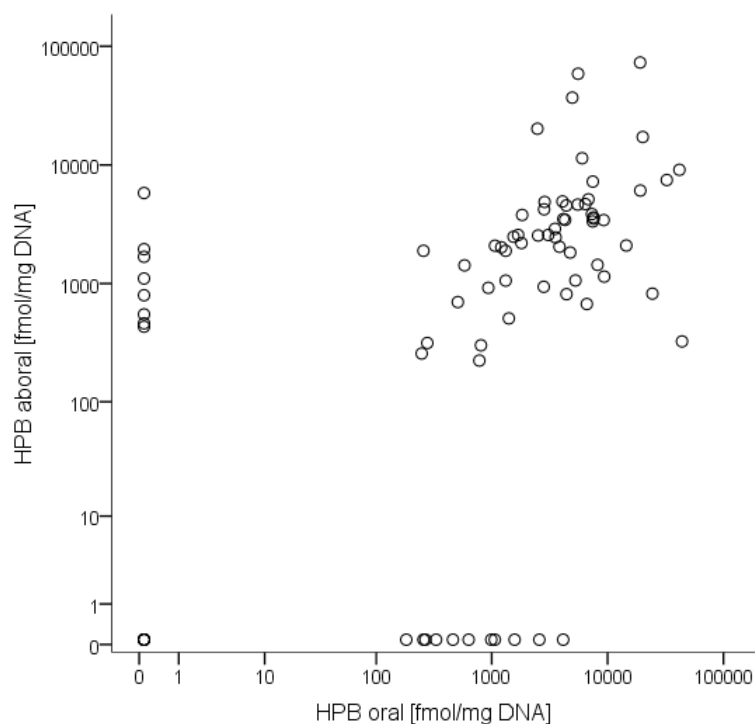


Abbildung 3-17: Korrelation zwischen den HPB-Addukten in oralen und aboralen Biopsien der Ösophagusschleimhaut (logarithmierte Darstellung)

### 3.2.8 Auswertung der DNA-Addukte

Es standen die Adduktlevel von 82 oralen und 83 aboralen Biopsien der distalen Ösophagusschleimhaut zur Verfügung.

Zunächst erfolgte die Einordnung nach dem Geschlecht der Patienten und nach dem im Fragebogen angegebenen Rauchstatus mit Angleichungen durch die Cotininkonzentration im Blutplasma (Tabelle 3-16). Zwar scheinen vor allem bei den weiblichen Probanden, die angaben seit längerer Zeit nicht mehr zu rauchen, sowohl die oralen als auch die aboralen HPB-Level erhöht zu sein, aber die Unterschiede erreichen keine Signifikanz (Abbildung 3-18). Daher wird im Weiteren, zur Unterscheidung der Rauchgewohnheiten nur noch der akute Rauchstatus angegeben (Tabelle 3-17).

Insgesamt zeigen sich bei beiden HPB-Adduktleveln keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Geschlecht und Rauchstatus.

Tabelle 3-16: DNA-Adduktlevel oraler und aboraler Proben in Abhängigkeit von Rauchstatus und Geschlecht

	HPB oral [pmol/mg DNA]			HPB aboral [pmol/mg DNA]		
	N	MW ± SD	Median	N	MW ± SD	Median
Gesamt	82	5,04 ± 8,33	2,50	83	4,45 ± 11,01	1,83
Nichtraucher	40	5,79 ± 9,04	2,85	40	2,58 ± 3,31	1,30
Raucher	29	4,74 ± 8,97	1,81	29	8,01 ± 17,85	0,56
Ex-Raucher	13	3,38 ± 3,23	2,51	14	2,39 ± 1,48	2,17
weiblich	43	4,15 ± 5,90	1,81	42	5,06 ± 14,15	1,06
Nichtraucher	23	4,06 ± 6,17	1,70	23	2,14 ± 3,67	0,92
Raucher	14	4,31 ± 6,53	1,51	13	11,44 ± 24,37	1,83
Ex-Raucher	6	4,11 ± 3,64	3,45	6	2,43 ± 1,86	2,58
männlich	39	6,01 ± 10,38	2,51	41	3,81 ± 6,53	2,09
Nichtraucher	17	8,13 ± 11,70	4,29	17	3,17 ± 2,76	2,57
Raucher	15	5,14 ± 11,00	1,83	16	5,23 ± 10,06	0,55
Ex-Raucher	7	2,75 ± 2,97	1,32	8	2,37 ± 1,27	2,17

Tabelle 3-17: Auswertung der oralen und aboralen HPB-freisetzenden DNA-Addukte nach dem akuten Rauchstatus und dem Geschlecht

	HPB oral [pmol/mg DNA]			HPB aboral [pmol/mg DNA]		
	N	MW ± SD	Median	N	MW ± SD	Median
Gesamt	82	5,04 ± 8,33	2,50	83	4,45 ± 11,01	1,83
Nichtraucher	53	5,20 ± 8,05	2,81	54	2,53 ± 2,94	1,92
Raucher	29	4,74 ± 8,97	1,81	29	8,01 ± 17,85	0,56
weiblich	43	4,15 ± 5,90	1,81	42	5,06 ± 14,15	1,06
Nichtraucher	29	4,07 ± 5,68	2,58	29	2,20 ± 3,35	1,06
Raucher	14	4,31 ± 6,53	1,51	13	11,44 ± 24,37	1,83
männlich	39	6,01 ± 10,38	2,51	41	3,81 ± 6,53	2,09
Nichtraucher	24	6,56 ± 10,18	3,30	25	2,91 ± 2,38	2,25
Raucher	15	5,14 ± 11,00	1,83	16	5,23 ± 10,06	0,55

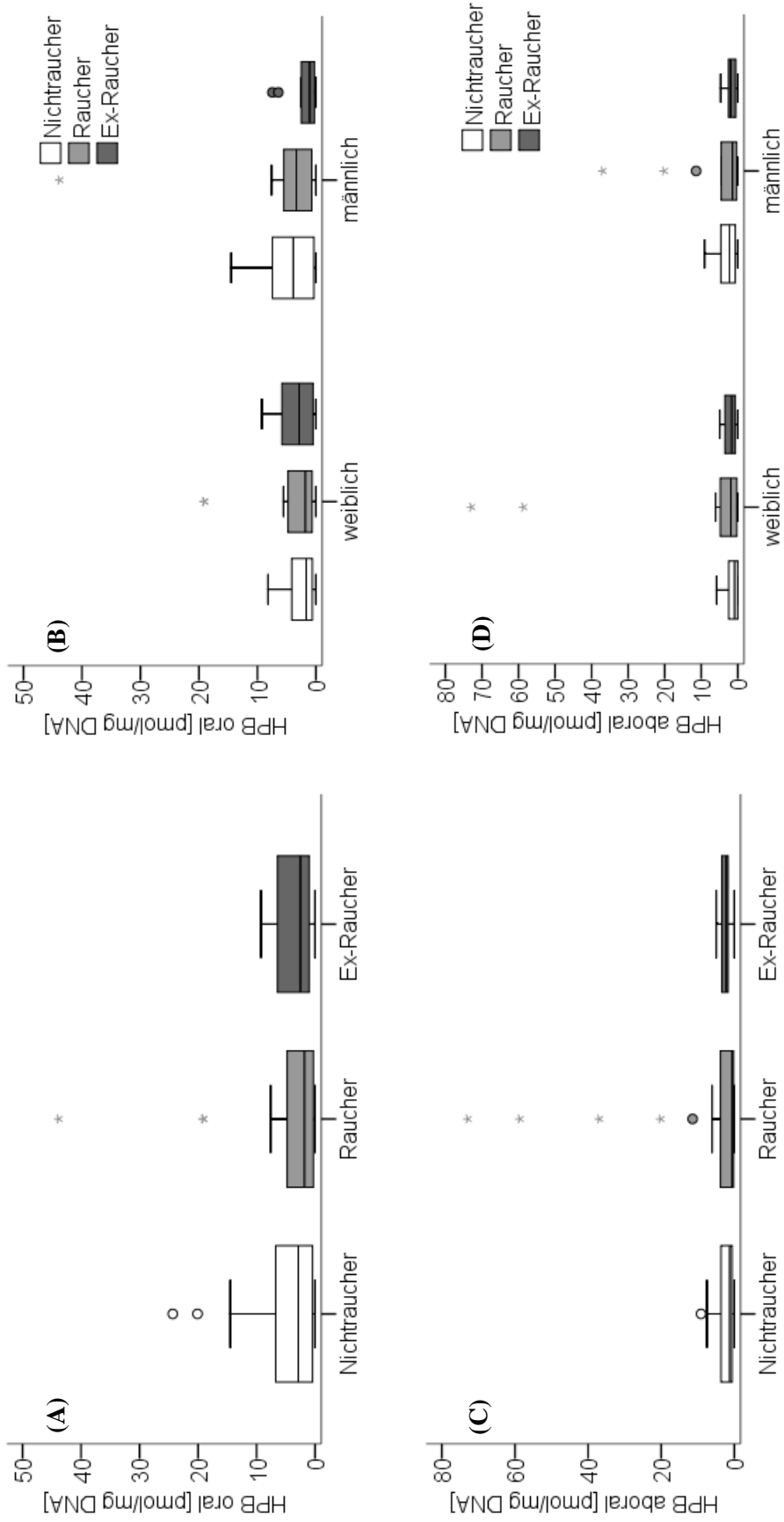


Abbildung 3-18: HPB-Adduktlevel in Abhängigkeit von Rauchstatus und Geschlecht. (A) HPB-Level oral nach Rauchstatus, (B) HPB-Level oral nach Rauchen und Geschlecht, (C) HPB-Level aboral nach Rauchstatus, (D) HPB-Level aboral nach Rauchen und Geschlecht

Tabelle 3-18 fasst die einzelnen Konzentrationen an HPB-freisetzenden DNA-Addukten in oralen und aboralen Proben in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus zusammen.

*Tabelle 3-18: Zusammenhang zwischen HPB-Addukten der Ösophagusschleimhaut und dem Krankheitsstatus*

	HPB oral [pmol/mg DNA]			HPB aboral [pmol/mg DNA]		
	N	MW ± SD	Median	N	MW ± SD	Median
Kontrolle	18	3,49 ± 4,52	2,82	18	2,27 ± 1,83	1,89
Reflux	5	3,75 ± 3,51	5,27	5	5,10 ± 4,67	5,81
GERD	17	5,54 ± 7,99	2,58	17	2,01 ± 2,14	1,15
Barrett	7	3,38 ± 3,13	3,08	7	2,04 ± 1,66	2,57
EAC	3	2,41 ± 3,50	0,81	4	1,52 ± 2,11	0,55
ESCC	6	4,10 ± 7,85	1,03	7	3,81 ± 5,97	2,09
sonst. CA	16	8,02 ± 14,76	1,45	16	2,60 ± 5,24	0,39
Gastritis	9	3,82 ± 3,42	3,02	8	13,36 ± 22,12	2,43
Mycosis	1	19,07	19,07	1	72,93	72,93

Betrachtet man nur die Patienten mit Reflux, GERD, Barrett-Ösophagus und EAC im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3-19 A, B), so zeigt die Gruppe mit Reflux einen erhöhten Adduktlevel gegenüber den anderen Untergruppen. Dies wird noch deutlicher bei Patienten ohne jegliche Rauchbelastung hinsichtlich des aboralen Adduktlevels (Abbildung 3-19 C), auch wenn keine statistische Signifikanz erreicht wird ( $p = 0,367$ ) (Tabelle 3-19).

*Tabelle 3-19: Aborale DNA-Addukte von Nichtrauchern in Abhängigkeit zum Krankheitsstatus in der Folge Reflux, GERD, Barrett, EAC im Vergleich zur Kontrolle*

	HPB aboral [pmol/mg DNA]		
	N	MW ± SD	Median
Kontrolle	12	2,21 ± 1,75	1,82
Reflux	3	4,70 ± 3,23	5,81
GERD	13	2,01 ± 2,17	1,15
Barrett	7	2,04 ± 1,66	2,57
EAC	1	4,68	4,68



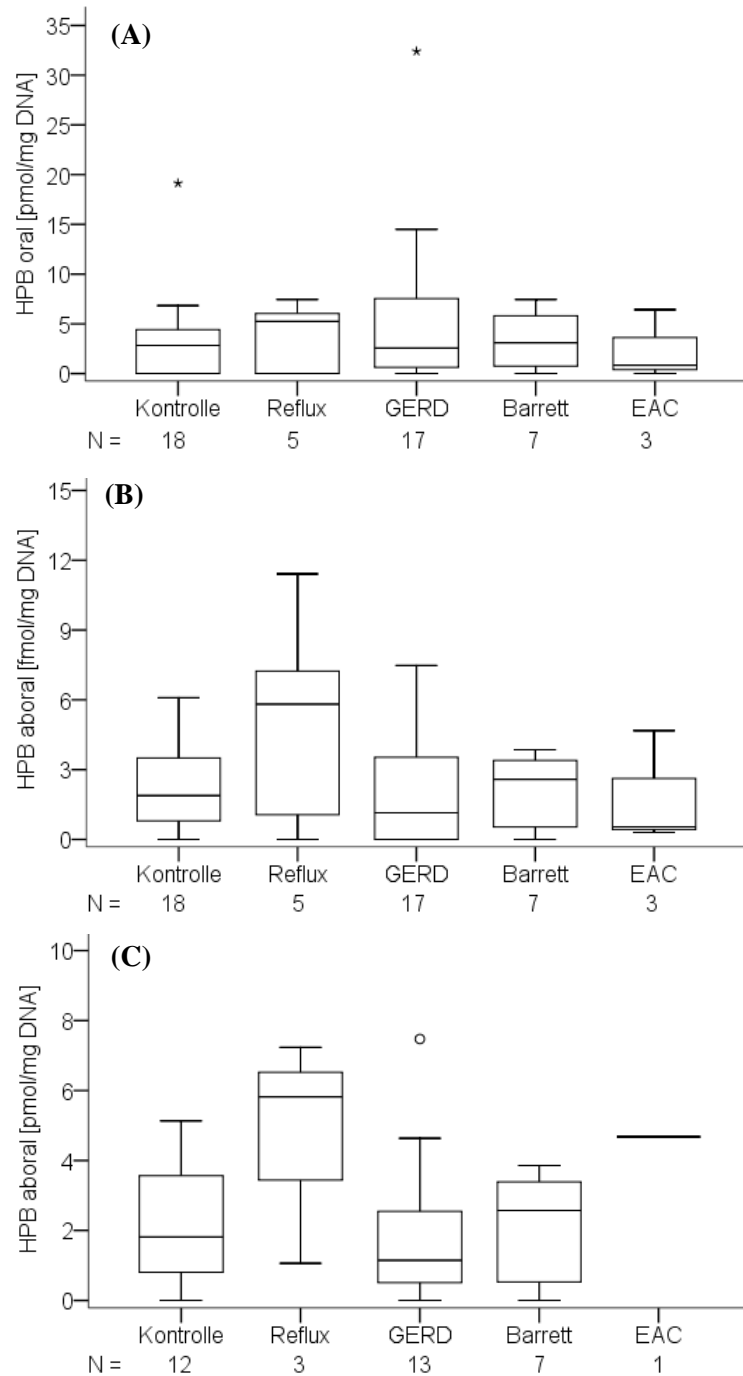


Abbildung 3-19: DNA-Addukte in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus in der Folge Reflux, GERD, Barrett, EAC im Vergleich zur Kontrolle: (A) orale HPB-Addukte und (B) aborale DNA-Addukte aller Patienten, (C) aborale DNA-Addukte nur von Nichtrauchern

Die Abbildung 3-20 zeigt die Korrelation der Adduktlevel zum BMI der Patienten je nach Rauchstatus. Keiner der dargestellten Zusammenhänge liefert signifikante Ergebnisse oder deutliche Tendenzen.

Auch hinsichtlich des Verzehrs von Zwischenmahlzeiten zeigt sich keine Abhängigkeit in Bezug auf die HPB-Adduktlevel, sowohl bei Rauchern, als auch bei Nichtrauchern (Tabelle 3-20).

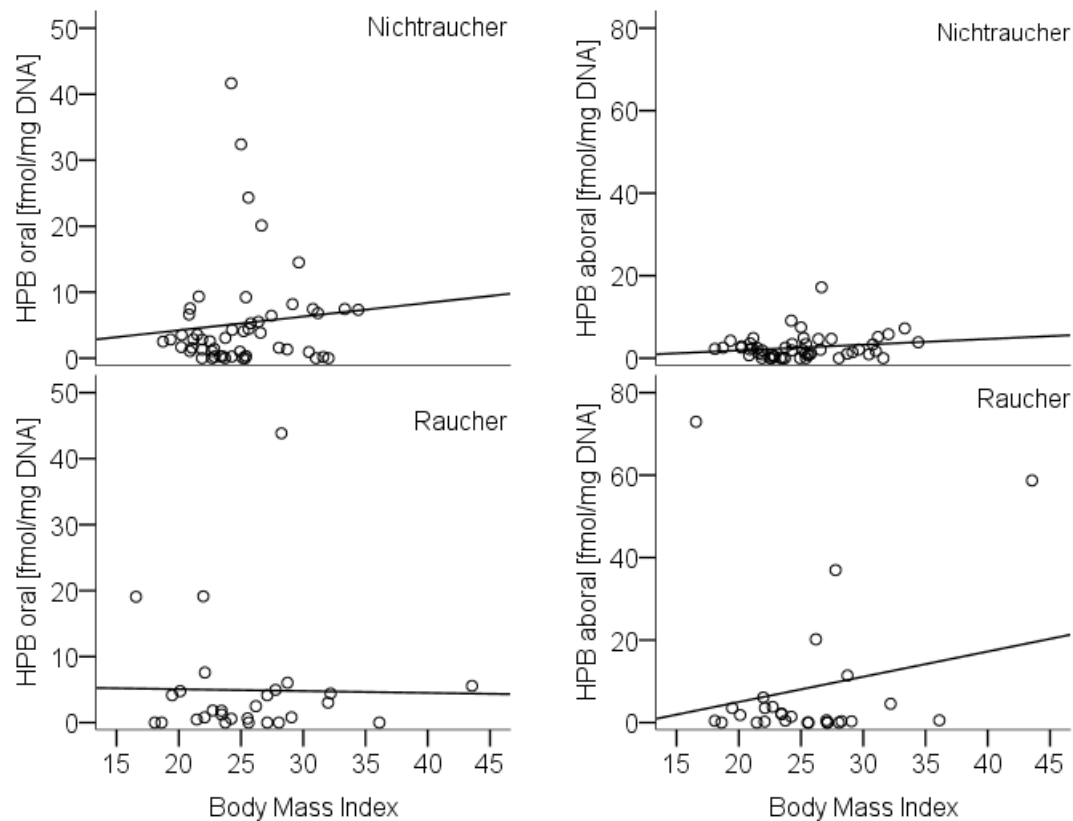


Abbildung 3-20: Korrelation der oralen und aboralen Adduktlevel zum BMI unter Berücksichtigung des akuten Rauchsstatus

Tabelle 3-20: DNA-Addukte von Ösophagsmucosa in Abhängigkeit vom Verzehr von Zwischenmahlzeiten

Zwischenmahlzeiten	HPB oral [pmol /mg DNA]			HPB aboral [pmol/mg DNA]		
	N	MW ± SD	Median	N	MW ± SD	Median
Ja	37	4,48 ± 7,82	2,48	38	4,17 ± 11,95	1,92
Nichtraucher	23	3,55 ± 3,70	2,58	24	2,04 ± 1,77	2,07
Raucher	14	5,99 ± 11,92	1,82	14	7,81 ± 19,44	1,62
Nein	42	5,79 ± 9,03	2,82	42	4,86 ± 10,62	1,50
Nichtraucher	27	7,02 ± 10,51	2,83	27	3,00 ± 3,73	1,89
Raucher	15	3,58 ± 5,08	0,78	15	8,20 ± 16,92	0,46

Differenziert man zwei Gruppen hinsichtlich des Alkoholkonsums (siehe Kap. 3.2.5), so zeigen sich bei den Patienten, die regelmäßig Alkohol zu sich nehmen, erhöhte Adduktlevel in der oralen Region (Tabelle 3-21). Dieser Effekt erreicht bei Nichtrauchern (Abbildung 3-21) statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ).

Tabelle 3-21: Abhängigkeit des oralen Adduktlevels vom Alkoholkonsum

Alkoholkonsum	HPB oral [pmol/mg DNA]		
	N	MW ± SD	Median
regelmäßig	28	7,62 ± 11,85	3,65
Nichtraucher	18	8,41 ± 11,20	4,97
Raucher	10	6,18 ± 13,46	1,23
unregelmäßig	54	3,70 ± 5,41	1,75
Nichtraucher	35	3,54 ± 5,30	1,69
Raucher	19	3,99 ± 5,72	1,81

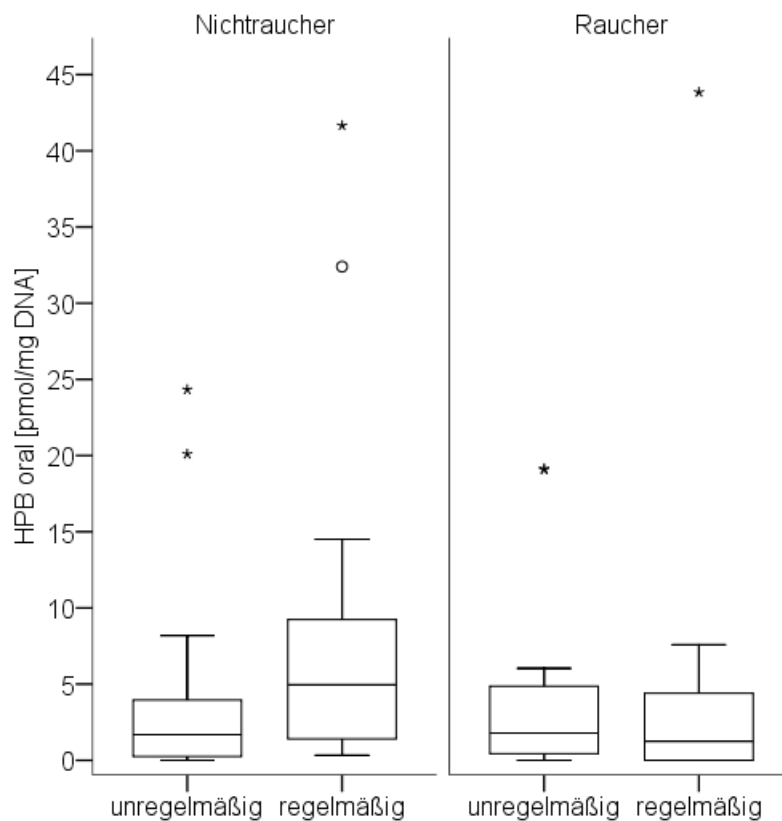


Abbildung 3-21: Vergleich der Adduktwerte der oralen Biopsien in Abhängigkeit zum Alkoholkonsum von Nichtrauchern und Rauchern (Nichtraucher:  $p = 0,013$ ; Raucher:  $p = 0,712$ )

Der Einfluss von Sodbrennen auf die Bildung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten (Tabelle 3-22, Abbildung 3-22) zeigt sich sowohl bei oralen als auch aboralen Biopsien in einer signifikanten Steigerung der Adduktlevel um nahezu das Dreifache (oral:  $p = 0,041$ ; aboral:  $p = 0,021$ ).

Tabelle 3-22: Adduktlevel der Ösophagusschleimhaut in Abhängigkeit zum Auftreten von Sodbrennen

Sodbrennen	HPB oral [pmol/mg DNA]			HPB aboral [pmol/mg DNA]		
	N	MW ± SD	Median	N	MW ± SD	Median
Ja	46	5,71 ± 7,09	3,68	46	6,77 ± 14,35	2,32
Nein	29	4,63 ± 10,75	1,07	31	1,56 ± 1,86	0,80

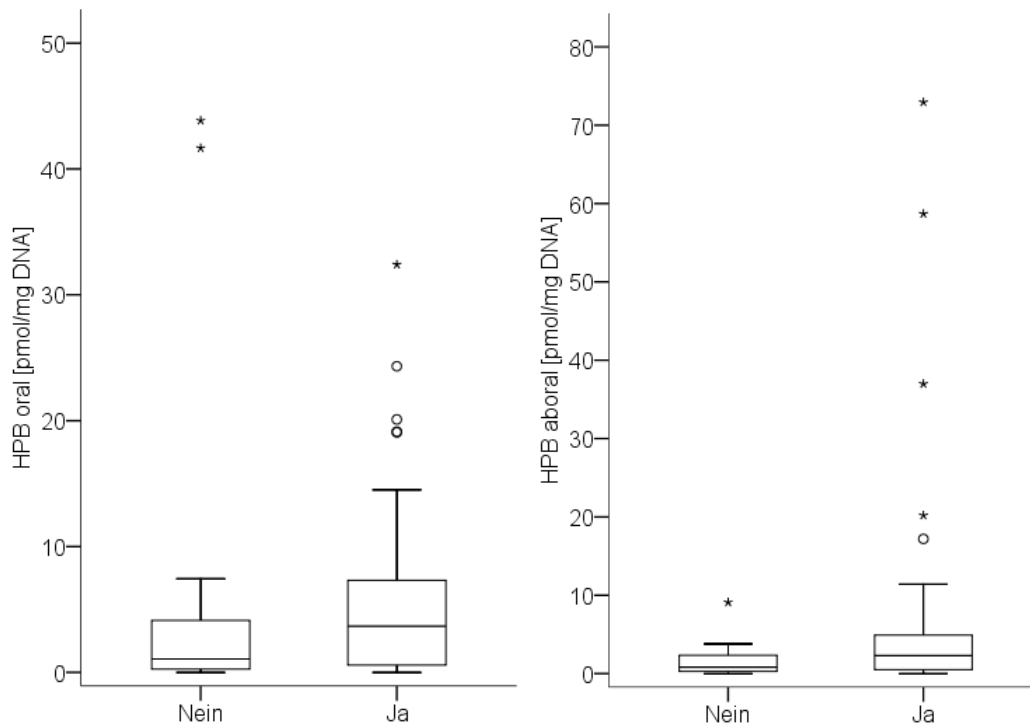


Abbildung 3-22: Adduktkonzentration von oraler (links) und aboraler (rechts) Mucosabiopsie in Abhängigkeit zum Auftreten von Sodbrennen

Die zwei Extremwerte der Adduktkonzentration in oralen Biopsien stammen von Patienten mit sonstigen Karzinomen, die kein Sodbrennen angaben. Ein Proband litt an einem Magenkarzinom, der andere an einem Larynxkarzinom. Nimmt man diese beiden Patienten aus der Auswertung, wird der Unterschied zwischen der Gruppe mit und der ohne Sodbrennen hoch signifikant ( $p \leq 0,01$ ).

Differenzierter fiel die Auswertung bei den weiteren Ernährungsgewohnheiten aus. Für eine explizite Multifaktoren- und Regressionsanalyse reicht die vorhandene Teilnehmerzahl nicht aus. Hier sollen nur einzelne interessante Faktoren betrachtet und analysiert werden.

In den oralen Biopsien von Patienten, die angaben häufiger scharf gewürzte Speisen zu sich zu nehmen, zeigt sich unabhängig vom Rauchstatus eine Tendenz zu höheren Adduktleveln (Tabelle 3-23). Die Zunahme der HPB-Addukte mit der Häufigkeit der Einnahme scharfer Speisen erreicht allerdings nicht Signifikanzniveau (Abbildung 3-23).

Tabelle 3-23: Abhängigkeit des oralen HPB-Adduktlevels vom Verzehr scharf gewürzter Speisen

Verzehr von scharfen Speisen	HPB oral [pmol/mg DNA]		
	N	MW $\pm$ SD	Median
nie	14	2,00 $\pm$ 1,60	1,36
Nichtraucher	6	2,63 $\pm$ 1,40	2,69
Raucher	8	1,56 $\pm$ 1,54	0,79
selten	31	5,08 $\pm$ 8,37	3,02
Nichtraucher	22	5,97 $\pm$ 9,79	3,18
Raucher	9	2,93 $\pm$ 2,06	3,02
gelegentlich	31	4,77 $\pm$ 7,25	1,57
Nichtraucher	20	4,67 $\pm$ 7,36	1,63
Raucher	11	4,94 $\pm$ 7,38	0,63
sehr häufig	6	13,28 $\pm$ 16,57	7,11
Nichtraucher	3	9,94 $\pm$ 9,40	8,18
Raucher	3	16,63 $\pm$ 23,76	6,03

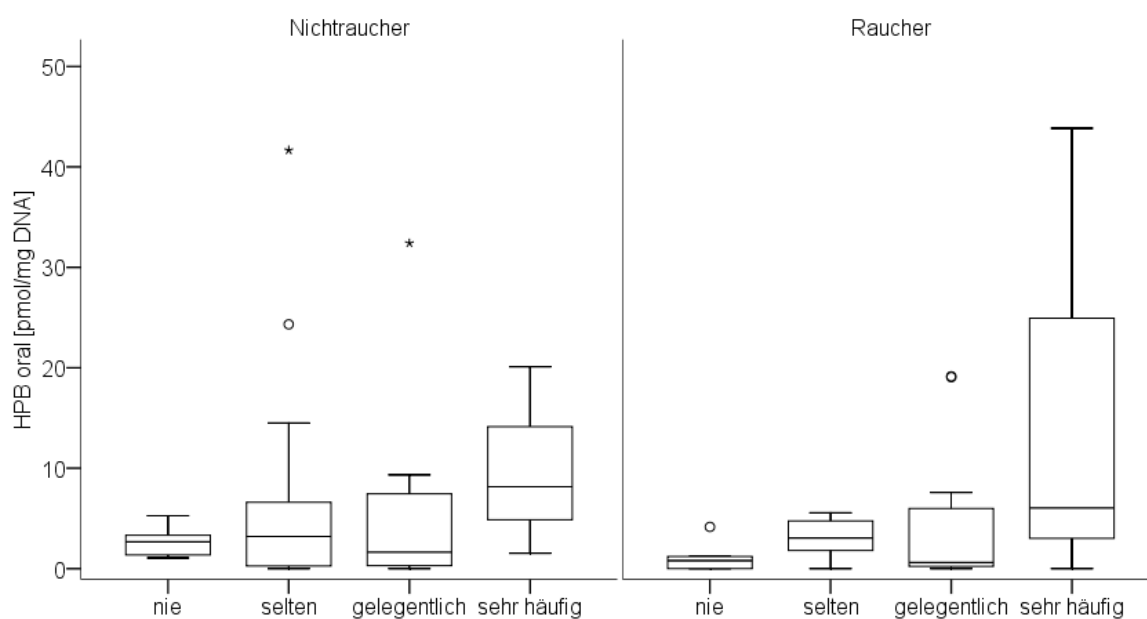


Abbildung 3-23: HPB-Addukte in oralen Biopsien von Rauchern und Nichtrauchern in Abhängigkeit vom Verzehr scharfer Speisen

Von Interesse war auch der Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Nüssen bzw. sonstigen Lebensmitteln, die Nüsse enthalten, und der Bildung von HPB-Addukten in der unteren Speiseröhre. Es zeigte sich bei den Adduktlevels in den oralen Biopsien eine leichte Zunahme je häufiger Nüsse und Nussprodukte verzehrt wurden, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Tabelle 3-24, Abbildung 3-24).

Tabelle 3-24: HPB-freisetzende DNA-Addukte in der distalen Speiseröhre in Abhängigkeit vom Verzehr von Nüssen und sonstigen nusshaltigen Lebensmitteln

Verzehr von Nüssen/Nussprodukten	HPB oral [pmol/mg DNA]		
	N	MW ± SD	Median
täglich	2	7,54 / 6,42	6,98
mehrmals die Woche	15	8,04 ± 12,29	2,83
selten	49	4,17 ± 6,08	2,58
nie	15	4,87 ± 10,50	1,57

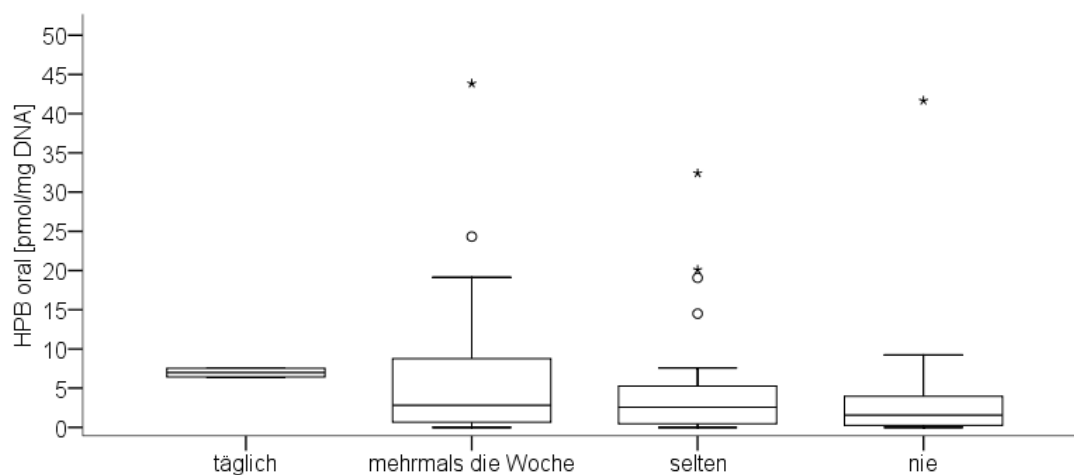


Abbildung 3-24: HPB-Addukte in oralen Biopsien in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Verzehrs von Nüssen und Nussprodukten

Hinsichtlich des Anteils von Milch und Milchprodukten in der Ernährung wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe gab an Milchprodukte täglich bzw. mehrmals die Woche zu sich zu nehmen, die andere Gruppe verzehrte Milch selten bis nie. Überraschender Weise hatten die wenigen Probanden, die kaum Milchprodukte verzehrten sowohl in den oralen als auch in den aboralen Biopsien erhöhte Adduktlevel (Tabelle 3-25). Bei den oralen Proben erreichte diese Differenz keine Signifikanz, bei den aboralen Biopsien war sie jedoch nahezu signifikant ( $p = 0,052$ ) (Abbildung 3-25).

Tabelle 3-25: Verzehr von Milchprodukten zum oralen und aboralen Adduktlevel

Verzehr von Milchprodukten	HPB oral [pmol/mg DNA]			HPB aboral [pmol/mg DNA]		
	N	MW ± SD	Median	N	MW ± SD	Median
täglich/mehrmals die Woche	61	4,34 ± 6,21	2,51	61	3,94 ± 9,11	1,44
selten/nie	4	13,16 ± 19,09	4,97	4	5,09 ± 2,92	4,59

Ähnlich wurde bei der Auswertung nach dem Verzehr von Schokolade verfahren. Zwischen Patienten die Schokolade täglich bzw. mehrmals die Woche zu sich nahmen (N = 35) und solchen, die selten bis nie Schokolade verzehrten (N = 47) bestand allerdings weder bei den oralen noch bei den aboralen Biopsien ein Unterschied der HPB-Adduktlevel (Abbildung 3-26).

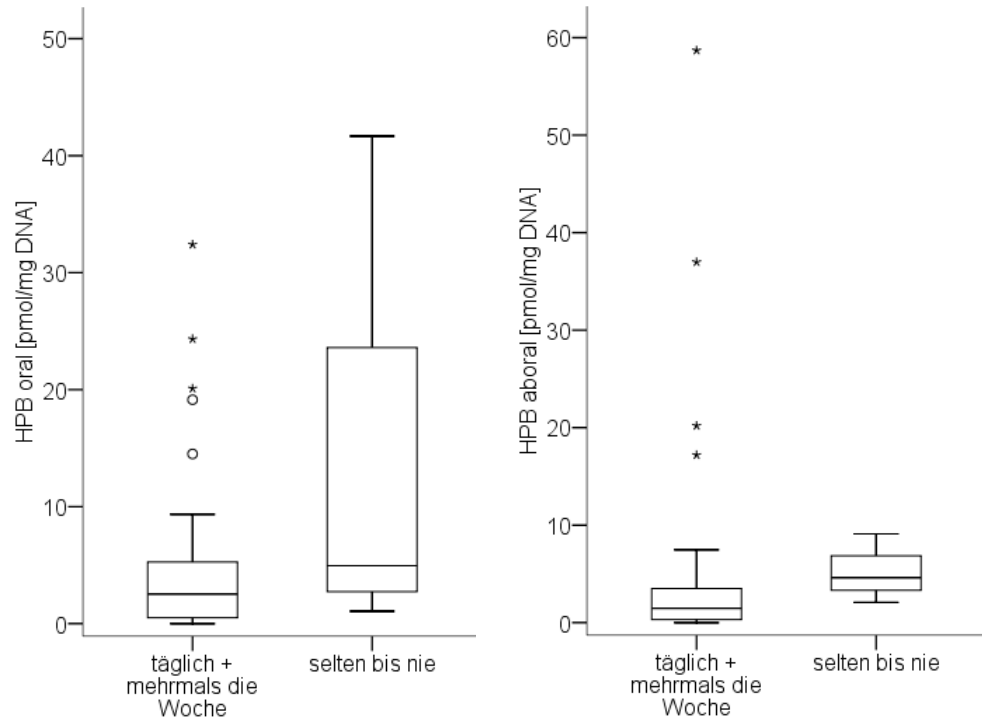


Abbildung 3-25: HPB-Addukte in oralen (links) und aboralen (rechts) Biopsien in Abhängigkeit vom Verzehr von Milch und Milchprodukten

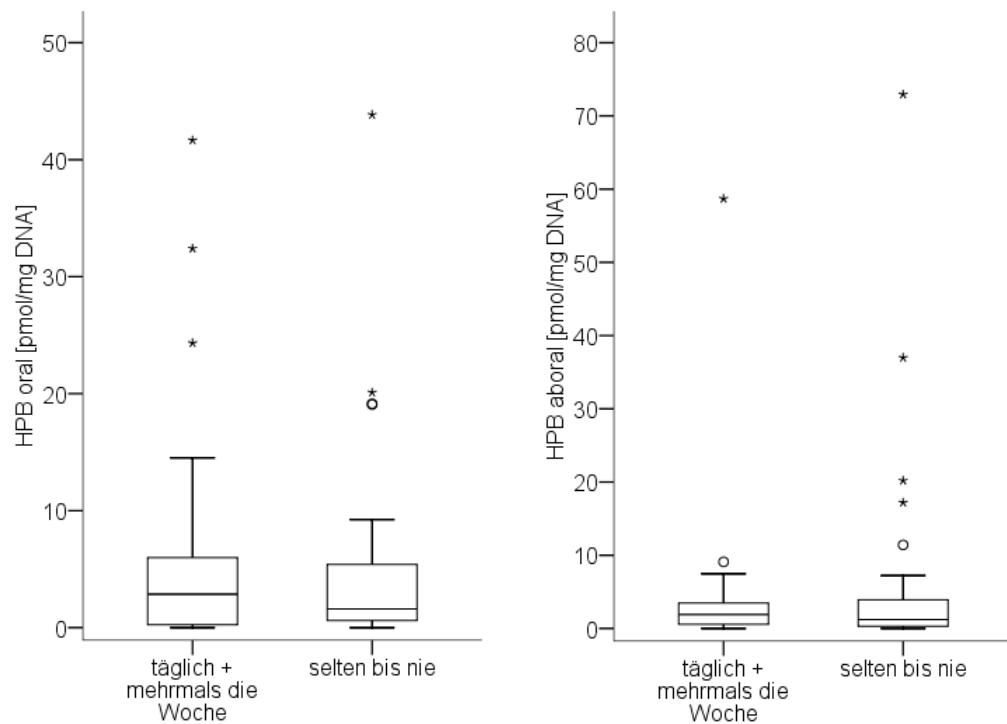


Abbildung 3-26: HPB-Addukte in oralen (links) und aboralen (rechts) Biopsien in Abhängigkeit vom Verzehr von Schokolade

### 3.2.9 Auswertung der Plasmakonzentrationen von Myosmin und Cotinin

Insgesamt konnten 84 Plasmaproben hinsichtlich ihrer Myosmin- und Cotininkonzentration ausgewertet werden. Dabei bestand keine signifikante Korrelation zwischen den Plasmakonzentration der beiden Nicotinoide (Spearman  $p = 0,258$ ; Abbildung 3-27).

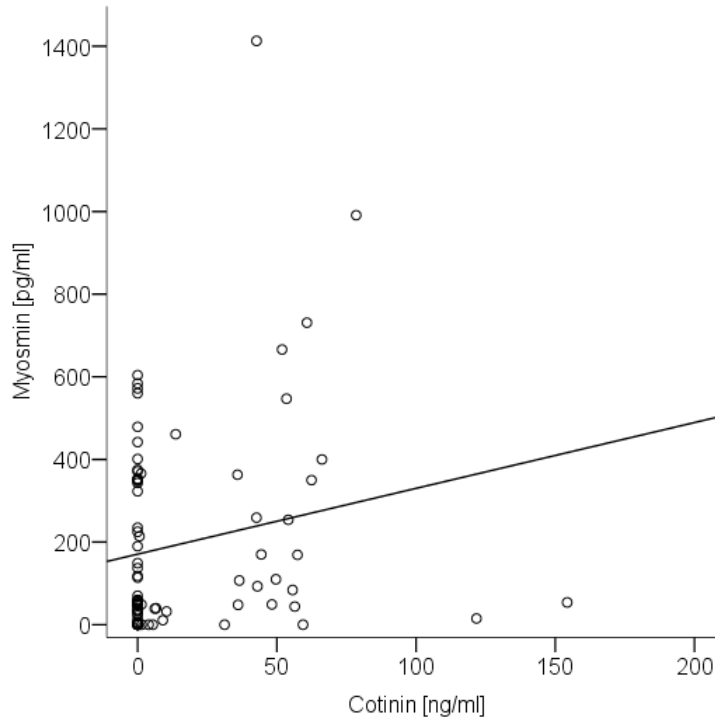


Abbildung 3-27: Graphische Darstellung der Korrelation der Plasmakonzentration von Myosmin und Cotinin

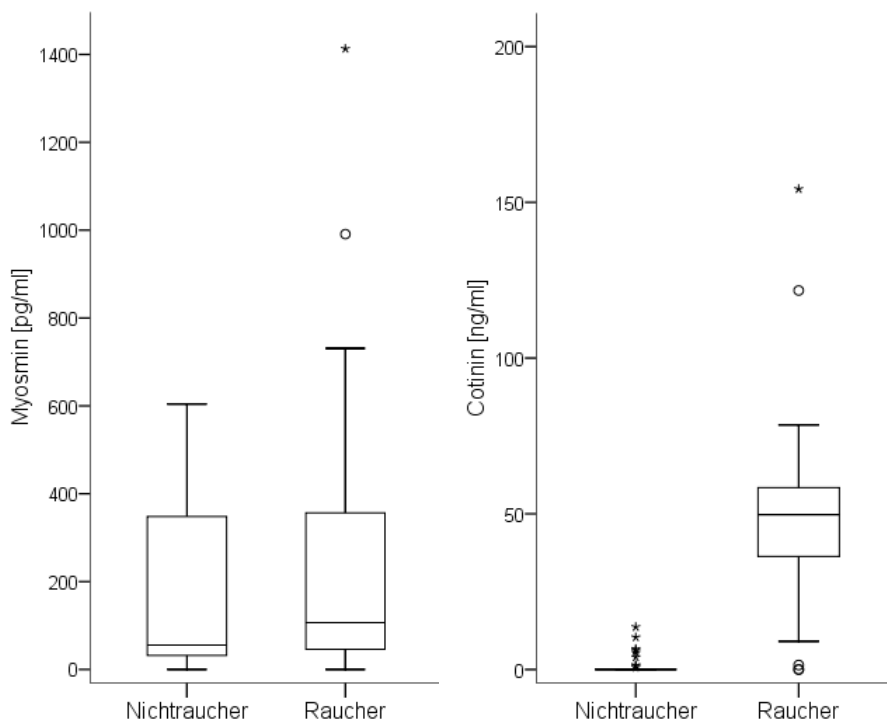


Abbildung 3-28: Vergleich der Myosmin- (links) und Cotininkonzentration (rechts) im Plasma von Rauchern und Nichtrauchern



Hinsichtlich des Krankheitsstatus unterliegen die Werte für Myosmin und Cotinin großen Schwankungen, es ist kein Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar (Tabelle 3-26).

*Tabelle 3-26: Auswertung der Plasmakonzentrationen von Myosmin und Cotinin hinsichtlich des Krankheits- und dem akuten Rauchstatus*

	Myosmin [pg/ml Plasma]			Cotinin [ng/ml Plasma]		
	N	MW ± SD	Median	N	MW ± SD	Median
Kontrolle	19	145 ± 187	48	19	15,21 ± 22,51	0,00
Nichtraucher	13	143 ± 157	48	13	0,90 ± 2,19	0,00
Raucher	6	148 ± 257	66	6	46,21 ± 11,25	47,45
Reflux	4	208 ± 265	90	4	12,76 ± 24,60	0,69
Nichtraucher	2	326 ± 392	326	2	0,69 ± 0,98	0,69
Raucher	2	90 ± 28	90	2	24,83 ± 35,11	24,83
GERD	20	287 ± 338	192	20	11,38 ± 21,71	0,00
Nichtraucher	16	208 ± 211	104	16	1,06 ± 2,98	0,00
Raucher	4	602 ± 579	474	4	52,65 ± 10,05	50,84
Barrett	8	261 ± 209	288	8	6,27 ± 12,86	0,00
Nichtraucher	7	246 ± 221	214	7	2,05 ± 5,13	0,00
Raucher	1	363	363	1	35,85	35,85
EAC	4	48 ± 45	44	4	47,70 ± 73,11	18,26
Nichtraucher	1	33	33	1	0,00	0,00
Raucher	3	54 ± 54	54	3	63,60 ± 80,63	36,52
ESCC	8	99 ± 119	52	8	0,00 ± 0,00	0,00
sonst. CA	11	168 ± 147	169	11	20,17 ± 27,37	1,23
Nichtraucher	7	117 ± 157	48	7	0,74 ± 1,49	0,00
Raucher	4	258 ± 74	256	4	54,17 ± 8,39	55,77
Gastritis	9	178 ± 329	15	9	34,61 ± 43,92	9,05
Nichtraucher	3	124 ± 214	0	3	0,00 ± 0,00	0,00
Raucher	6	205 ± 390	30	6	51,92 ± 44,81	50,42
Mycosis	1	731	731	1	60,79	60,79
Gesamt	84	197 ± 251	65	84	16,70 ± 29,57	0,00
Nichtraucher	57	168 ± 187	56	57	0,87 ± 2,61	0,00
Raucher	27	259 ± 345	107	27	50,12 ± 32,68	49,65

Vergleicht man jedoch die Plasmakonzentrationen von Rauchern und Nichtrauchern, so zeigen sich deutlichere Unterschiede. Obwohl der Median der Myosminkonzentration bei Rauchern fast doppelt so hoch ist wie bei Nichtrauchern, erreichen die Unterschiede kein Signifikanz-

niveau. Im Gegensatz dazu ist der Unterschied in den Cotininkonzentrationen von Rauchern und Nichtrauchern hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ) (Abbildung 3-28).

Der Einfluss von Alkohol auf die Myosminkonzentration wurde wie bei den DNA-Addukten in den beiden Gruppen mit regelmäßigem bzw. seltenem Alkoholkonsum untersucht (Tabelle 3-27). Patienten mit häufigerem Alkoholkonsum haben signifikant höhere Myosminkonzentrationen als die Gruppe mit geringem Konsum ( $p \leq 0,01$ ) (Abbildung 3-29). Bei den Rauchern schwächt sich der Unterschied ab und ist nicht mehr signifikant, bei den Nichtrauchern bleibt jedoch ein signifikanter Unterschied bestehen ( $p \leq 0,05$ ).

Tabelle 3-27: Abhängigkeit der Myosminkonzentration von Alkoholkonsum und Rauchstatus

Alkoholkonsum	Myosmin [pg/ml Plasma]		
	N	MW $\pm$ SD	Median
unregelmäßig	53	139 $\pm$ 183	49
Nichtraucher	36	124 $\pm$ 160	48
Raucher	17	172 $\pm$ 227	84
regelmäßig	31	297 $\pm$ 315	254
Nichtraucher	21	244 $\pm$ 209	225
Raucher	10	408 $\pm$ 462	256

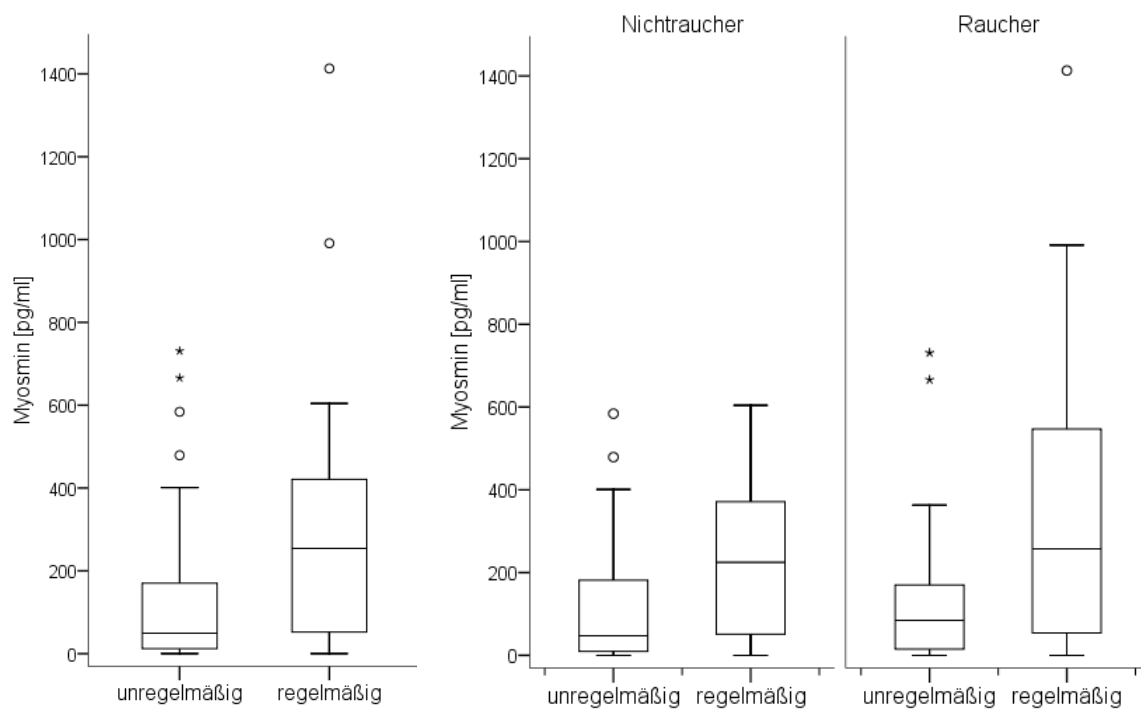


Abbildung 3-29: Myosminkonzentration bei regelmäßigen und unregelmäßigen Alkoholkonsumern, im Gesamten (links) und nach der Rauchgewohnheit getrennt (rechts)

Betrachtet man den Einfluss des Verzehrs von scharf gewürzten Speisen auf die Myosminkonzentration, so zeigt sich eine Zunahme von der Gruppe, die angab nie gewürzte Speisen zu sich

zu nehmen, bis zu der, die gelegentlich scharfes Essen zu sich nimmt. Bei jenen, die häufig scharf essen, nahm die Myosminkonzentration allerdings wieder ab und war signifikant niedriger als bei den Gruppen mit seltenem ( $p \leq 0,001$ ) und gelegentlichen ( $p \leq 0,05$ ) Verzehr scharfer Speisen (Abbildung 3-30, Tabellen 3-28 und 3-29). Auch der Unterschied zwischen Patienten, die nie bzw. gelegentlich scharf gewürzte Speisen zu sich nahmen, war statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

Tabelle 3-28: Abhängigkeit der Myosminkonzentration vom Verzehr scharf gewürzter Speisen

	Myosmin [pg/ml Plasma]		
	N	MW $\pm$ SD	Median
nie	12	96 $\pm$ 144	30
selten	33	152 $\pm$ 156	93
gelegentlich	34	300 $\pm$ 327	204
sehr häufig	5	43 $\pm$ 47	37

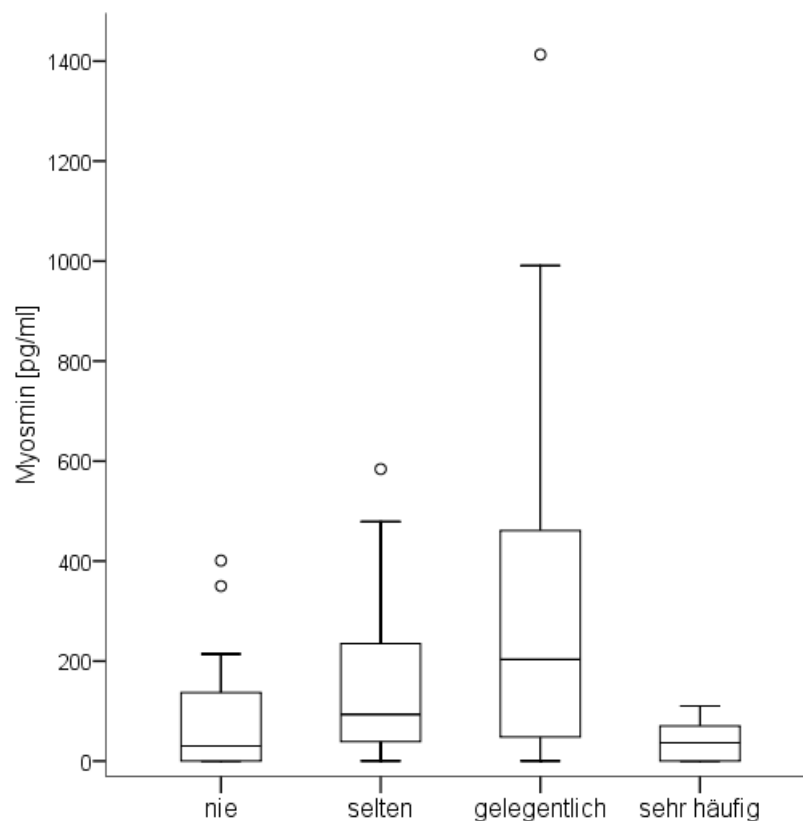


Abbildung 3-30: Vergleich der Myosminkonzentration in Abhängigkeit zum Verzehr scharfer Speisen

Tabelle 3-29: Signifikanzniveaus für die Myosminkonzentration bezogen auf den Verzehr scharfen Essens nach statistischer Analyse (Kruskal-Wallis  $p \leq 0,05$ ) und Tamahane-Test

	selten	gelegentlich	sehr häufig
nie	0,853	<b>0,032</b>	0,858
selten		0,119	<b>0,029</b>
gelegentlich			<b>0,001</b>

Hinsichtlich der Abhängigkeit der Myosminkonzentration vom Verzehr von Nussprodukten ist das Bild weniger differenziert. Zwischen den einzelnen Gruppen zeigen sich wenige Unterschiede bezogen auf die Myosminkonzentration im Plasma der Patienten (Abbildung 3-31).

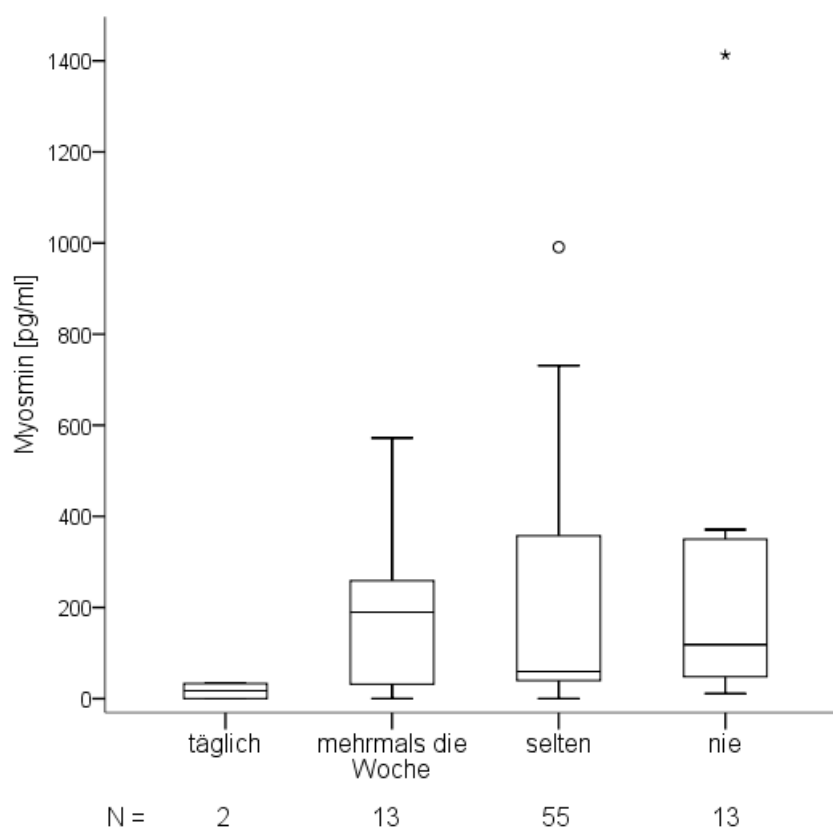


Abbildung 3-31: Myosminkonzentration in Abhängigkeit vom Verzehr von Nüssen und anderen nusshaltigen Lebensmitteln

Bei der Untersuchung des Einflusses von Milch auf Myosmin im Plasma zeigte sich, dass die Patienten, die angaben täglich bis mehrmals pro Woche Milchprodukte zu sich zu nehmen, eine signifikant niedrigere Myosminkonzentration im Plasma aufwiesen, als diejenigen, die nur selten bis gar keine Milch verzehrten ( $p \leq 0,05$ ) (Abbildung 3-32). Dabei lag der Median der Gruppe mit häufigem Milchkonsum um ein sechsfaches höher als der Median der Gruppe mit geringem Verzehr von Milchprodukten (Tabelle 3-30).

Tabelle 3-30: Myosminkonzentration in Abhängigkeit vom Milchkonsum

	Myosmin [pg/ml Plasma]		
	N	MW $\pm$ SD	Median
taglich + mehrmals die Woche	58	159 $\pm$ 205	50
selten + nie	5	513 $\pm$ 539	323

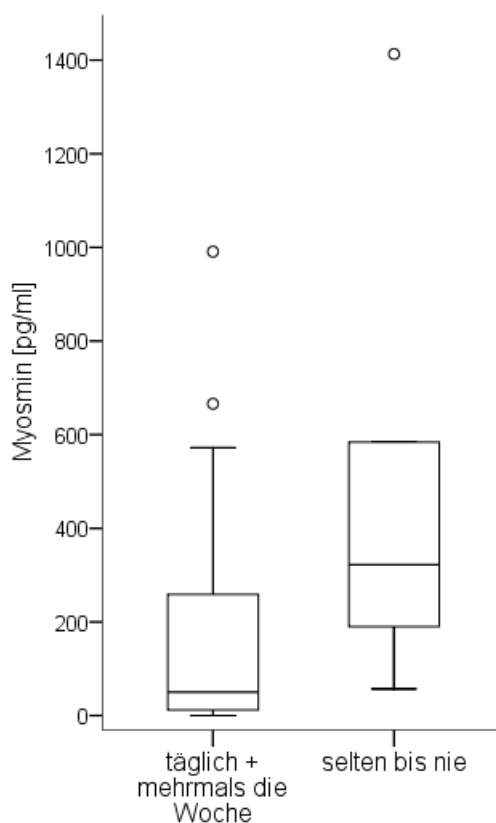


Abbildung 3-32: Vergleich der Myosminkonzentration im Plasma nach dem Milchkonsum

Tabelle 3-31: Myosminkonzentration in Abhängigkeit vom Schokoladenkonsum

Schokoladenkonsum	Myosmin [pg/ml Plasma]		
	N	MW $\pm$ SD	Median
taglich + mehrmals die Woche	34	165 $\pm$ 170	104
Nichtraucher	25	181 $\pm$ 180	118
Raucher	9	120 $\pm$ 137	84
selten + nie	50	219 $\pm$ 293	58
Nichtraucher	32	158 $\pm$ 195	51
Raucher	18	329 $\pm$ 398	140

Betrachtet man den Verzehr von Schokolade, so fällt auf, dass nur die Nichtraucher die erwartete Tendenz zu höheren Myosminwerten in der Gruppe mit häufigerem Konsum zeigt, jedoch ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,803$ ). Bei den Rauchern kehrt sich das Verhältnis um, aber auch diese Unterschiede erreichen nicht Signifikanzniveau ( $p = 0,176$ ) (Abbildung 3-33; Tabelle 3-31).

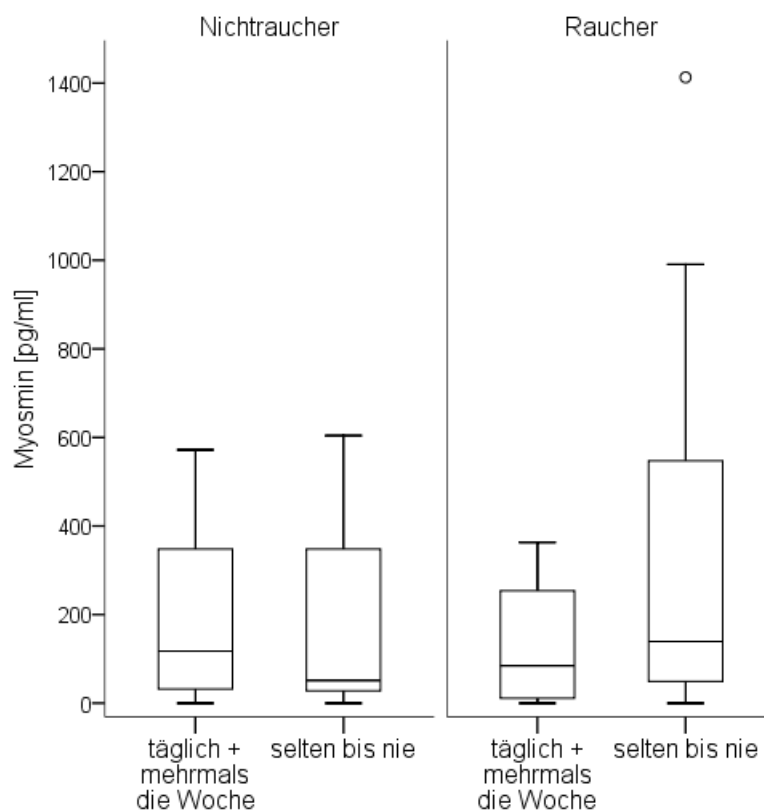


Abbildung 3-33: Abhängigkeit der Myosminkonzentration vom unterschiedlich häufigen Verzehr von Schokolade bei Rauchern und Nichtrauchern

### 3.2.10 Vergleich zwischen den Plasmakonzentrationen und den DNA-Addukten

Zu untersuchen ist, ob eine Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von Myosmin und den HPB-Addukten der Speiseröhre besteht.

Abbildung 3-34 zeigt, dass keine Korrelation für orale und aborale Biopsien zur Myosminkonzentration der teilnehmenden Probanden besteht. Betrachtet man Raucher und Nichtraucher getrennt so ergibt sich ebenfalls nur eine schwach ausgeprägte Korrelation (Abbildung 3-35); dies ist auch bei der Trennung nach dem Auftreten von Sodbrennen der Fall (Abbildung 3-36).

Bei der Untersuchung der Beziehung der Addukte zur Cotininkonzentration im Plasma der Patienten ergeben sich keine signifikanten Korrelationen oder andere Auffälligkeiten.

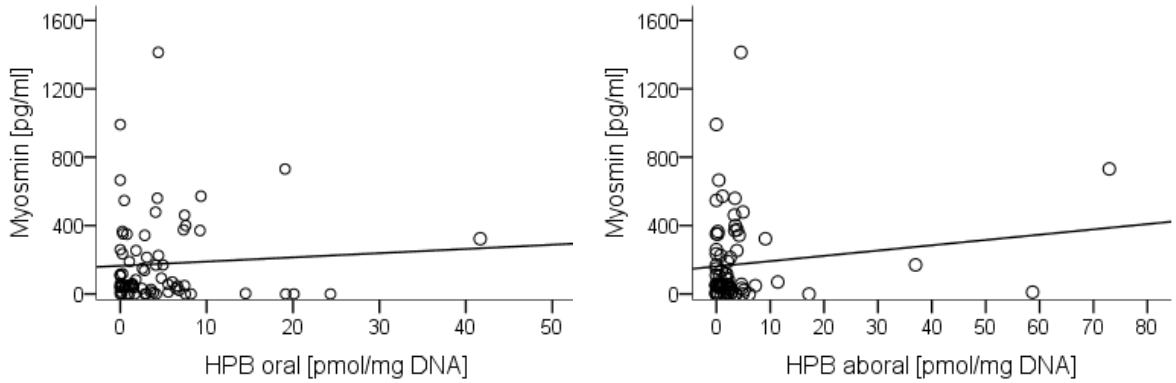


Abbildung 3-34: Korrelation zwischen der Myosminkonzentration und den oralen (links) und aboralen (rechts) DNA-Addukten

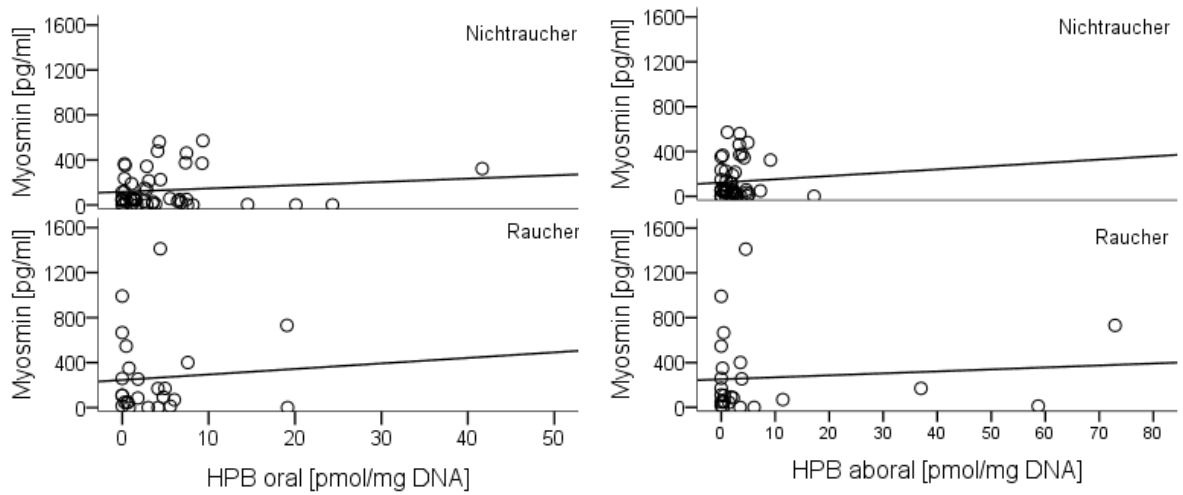


Abbildung 3-35: Korrelation zwischen der Myosminkonzentration und den oralen (links) und aboralen (rechts) DNA-Addukten von Rauchern und Nichtrauchern

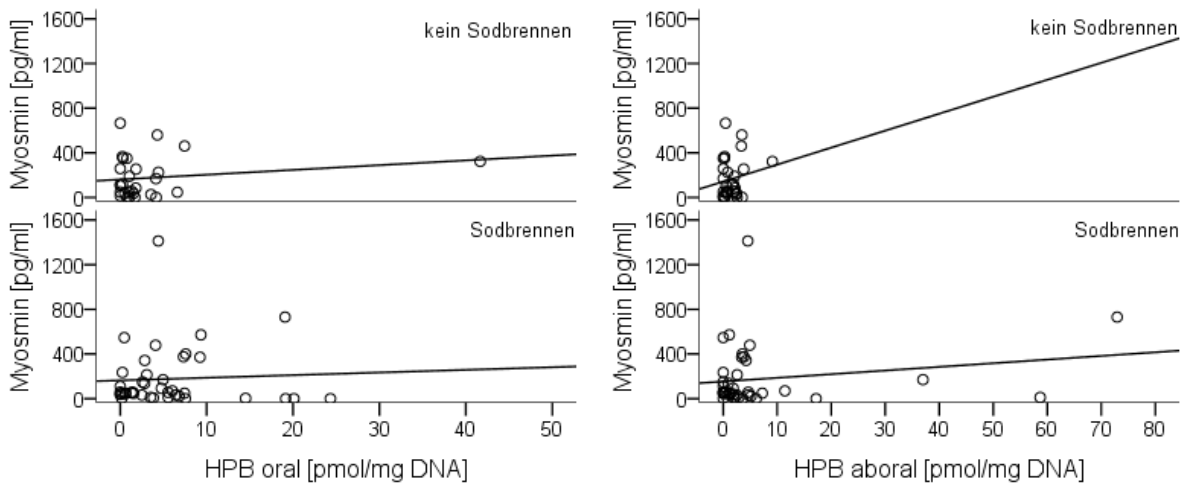


Abbildung 3-36: Korrelation zwischen der Myosminkonzentration und den oralen (links) und aboralen (rechts) DNA-Addukten bei Patienten mit und ohne Sodbrennen

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodenentwicklung

#### 4.1.1 Bestimmung der HPB-Addukte

Bei der Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten konnte auf einige bereits veröffentlichte Methoden zurückgegriffen werden. *Foiles et al.* [104] beschreibt eine Methode zur Bestimmung der HPB-Addukte aus Lungengewebe von Rauchern und Nichtrauchern. Dabei wird die DNA nach Gewebemogenisierung mit Chloroform/Iso-pentanol extrahiert und in Ethanol wieder gefällt. Die Konzentration wird ebenfalls photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Hydrolyse der Addukte erfolgte in einem Milliliter Wasser, dem konzentrierte Salzsäure zugegeben wurde, damit die Endkonzentration 0,8 mol/l HCl entsprach. Nach drei Stunden bei 80 °C wurde das Hydrolysat zweimal mit Dichlormethan gereinigt, anschließend mit 1 mol/l NaOH neutralisiert, der interne Standard [4,4-D<sub>2</sub>]-HPB zugesetzt und anschließend zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Das HPB wurde dann in Dichlormethan mit einer TMA-Lösung in Hexan und PFBC derivatisiert. Das HPB-Derivat wurde mittels HPLC nach der Vorschrift von *Carmella et al.* [103] gereinigt, bevor es per GC/MS mit negativchemischer Ionisation quantifiziert wurde. Die Wiederfindung für HPB nach der Hydrolyse wird für diese Methode mit 22% angegeben [126]. Trotz Einsatz von mindestens ein bis zwei Gramm Lungengewebe konnten wegen der großen Blindwerte nur wenige Proben positiv vermessen werden.

*Boysen et al.* [106] verwendeten einen kommerziellen DNA-Kit zur Extraktion der DNA, ansonsten folgte die Adduktbestimmung prinzipiell der Methode nach *Foiles et al.* [104]. Bestimmt wurden die Adduktlevel in Leber und Lunge von NNK-behandelten Ratten. Für die Hydrolyse wurde im Mittel etwa 0,1 mg DNA eingesetzt. Der Blindwert der gesamten Methode betrug  $23,6 \pm 6,6$  fmol/Probe, die Wiederfindung bezogen auf den internen Standard D<sub>2</sub>-HPB lag bei  $20,1 \pm 13,6\%$ .

*Hölzle und Schlöbe* [83,112] verbesserten Hintergrundbelastung und Wiederfindung maßgeblich, vor allem durch Verzicht auf den HPLC-Reinigungsschritt nach der Derivatisierung und durch Reduzierung des Überschusses an Derivatisierungsreagenzien. Sie konnten HPB nicht nur in der Lunge, sondern auch in den Schleimhäuten des Ösophagus und der Cardia von Rauchern und Nichtrauchern zuverlässig bestimmen. Dabei lag das Feuchtgewicht der Gewebeproben bei mindestens 0,3 g, die Wiederfindung für das HPB betrug  $82 \pm 17\%$ .

Alle beschriebenen Methoden verwendeten Quadrupol-Geräte zur Quantifizierung des HPB nach Hydrolyse und Derivatisierung. Durch Einsatz eines hochauflösenden Sektorfeldmassenspektrometers sollte die Nachweisempfindlichkeit für das HPB-Addukt wesentlich gesteigert



werden, damit auch kleinere Gewebemengen; z.B. von Schleimhautbiopsien des Ösophagus; für die Bestimmung ausreichen. Messungen mit Standardlösungen von PFBC-derivatisiertem HPB ergaben eine Empfindlichkeitssteigerung um mehr als das 20fache. Waren für das Erkennen eines Peaks im Quadrupolgerät 1-2 pg HPB nötig, erkannte das Sektorfeldgerät zuverlässig auch noch 50 fg des Analyten. Ein weiterer denkbarer Vorteil, ein verbessertes Ausblenden der Hintergrundbelastung aufgrund der gesteigerten Spezifität durch die höhere Massenauflösung, bestätigte sich allerdings nicht. Unter Anwendung der von *Hölzle et al.* [83] etablierten Methode traten erhebliche Blindwerte in den einzelnen Proben auf. Daher war es vorrangiges Ziel das Protokoll dahingehend zu verändern, das Auftreten der Blindwerte zu minimieren. Zunächst wurden alle Lösungen und Reagenzien frisch vor der Analyse hergestellt, damit mögliche Verunreinigungen durch falsche Lagerung ausgeschlossen werden konnten. Ließ man die TMA-Lösung vor der Extraktion mit Hexan für zehn Minuten bei Raumtemperatur stehen, konnte der Blindwert erheblich reduziert werden. Es stellte sich heraus, dass dadurch die Bildung von TMA aus TMA×HCl vollständiger ablief und damit bei der Extraktion ins organische Lösungsmittel die Phasen besser getrennt werden konnten. Weiterhin wurde nicht wie in den vorherigen Arbeiten PFBC direkt zugesetzt, sondern aus TMA und PFBC eine Vormischung hergestellt, die den in Dichlormethan gelösten Proben zugegeben wurde. Damit konnte sichergestellt werden, dass in jedem Gläschen beide für die Derivatisierung notwendigen Lösungen gleichmäßig zugesetzt wurden. Alles in allem entsprach der Blindwert hier 0,5 pg (3 fmol) HPB pro Probe. *Boysen et al.* [106] gab als Blindwert 23,6 fmol, *Hölzle et al.* [83] 10,1 fmol an. Berücksichtigt man die schlechtere Wiederfindung von 45% mit der vorliegenden Methode im Vergleich zu jener von *Hölzle et al.* [83], die bei 82% liegt, dann minimiert sich die absolute Hintergrundbelastung zusätzlich, weil ja der Blindwert unabhängig von der schlechteren Wiederfindung auftritt. Die schlechtere Wiederfindung ist wahrscheinlich auf den Ersatz des „Vacuum-Concentrator“ durch eine Stickstoff-Abblasevorrichtung beim Einengen zurückzuführen. Beim Erhitzen auf 50 °C kam es zu erheblichen Verlusten, so dass in der Folge die Proben bei Raumtemperatur eingeengt wurden um die Verluste zu reduzieren. Diese Verluste stehen einer deutlich erhöhten Hintergrundbelastung beim Verwenden des „Vacuum-Concentrators“ gegenüber.

Auch die hier ermittelten analytischen Grenzen liegen im selben Bereich der Arbeit nach *Hölzle et al.* [83], allerdings wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Validierung nach DIN-Norm durchgeführt und nicht wie in vorangegangenen Arbeiten darauf verzichtet, um mehr Proben qualitativ und quantitativ analysieren zu können.

### 4.1.2 Bestimmung der Plasmakonzentrationen

Im Arbeitskreis lagen zu Beginn bereits zwei Arbeiten zur Myosminbestimmung mittels GC/MS vor, die eine beinhaltete die Quantifizierung von Myosmin in Lebensmitteln [69,127], die andere die Bestimmung in Muttermilch, Plasma und Speichel [117,128].

Bei der Detektion in Lebensmitteln nach *Tyroller et al.* [69] wird die Probe zunächst zerkleinert, mit Schwefelsäure angesäuert und über Nacht gerührt. Dann folgen zahlreiche Zentrifugations-, Filtrations- und Neutralisationsschritte, bis das Myosmin mittels C<sub>18</sub>-Festphase extrahiert und im Anschluss mit Chloroform eluiert wird. Die Quantifizierung erfolgt mittels GC/MS und internem Standard D<sub>4</sub>-Myosmin.

*Maier* [128] entwickelte diese Methode weiter um Myosmin auch in Muttermilch bestimmen zu können. Die Probe wird ebenfalls mit Schwefelsäure angesäuert und über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wird die Fettphase mittels zwei Flüssig-Flüssig-Extraktionen mit Hexan/Diethylether und einer C<sub>18</sub>-Festphase extrahiert. Durch Aufgabe der wässrigen Phase auf eine Oasis-HLB-Festphase wurde das Myosmin zurückgehalten und anschließend mit Methanol extrahiert. Zur weiteren Aufreinigung erfolgten eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan und eine Überführung in Hexan. Auch hier erfolgte die Quantifizierung mittels GC/MS und internem Standard D<sub>4</sub>-Myosmin.

Beide Methoden beinhalten umfassende und zeitaufwändige Reinigungsschritte vor der eigentlichen Festphasenextraktion. Daher wurde nach weiteren spezifischen Methoden für die Bestimmung von Tabakalkaloiden im Plasma gesucht. *Moyer et al.* [122] verwendeten eine Aufarbeitung, die eine Extraktion mit einer Mischpolymer-Festphase enthielt. Damit konnten sie Nicotin, Cotinin, Anabasin und weitere Nicotinoide in Serum und Urin mittels LC/MS nachweisen und bestimmen. Da hier nur ein GC/MS zur Verfügung stand, musste die Methode noch entsprechend angepasst werden. Dazu wurden nach Elution von der Säule die Analyten wie bei *Maier et al.* [128] mit Dichlormethan extrahiert und vor der instrumentellen Quantifizierung in Hexan überführt.

Die Validierung der Methode ergab eine Nachweisgrenze für Myosmin von 1,2 und für Cotinin von 50 pg/ml Plasma, eine Bestimmungsgrenze für Myosmin von 3,6 und für Cotinin von 160 pg/ml Plasma, dabei betrug die Wiederfindung 92,6% für Myosmin und 91,1% für Cotinin.

*Tyroller et al.* [69] erreichten eine Wiederfindung von 75,1%, allerdings wurde diese mit <sup>3</sup>H-markiertem Myosmin bestimmt, wodurch etwaige GC/MS-Schwankungen nicht mit einbezogen sind. Die Nachweisgrenze wurde dabei mit 15 pg „on column“ angegeben, im Vergleich dazu beträgt hier die Nachweisgrenze 0,12 pg „on column“ bezogen auf zwei Milliliter eingesetztes Plasma. *Maier* [128] erreichte eine Nachweisgrenze für Myosmin von 0,15 ng/ml und eine Bestimmungsgrenze von 0,2 ng/ml bzw. für Cotinin 0,3 und 0,5 ng/ml. Die Wiederfindung

betrug für Myosmin 94% und für Cotinin 72% im Plasma. Bei *Moyer*. [122] beträgt die Bestimmungsgrenze für Cotinin 2 µg/l, also 2 pg/ml, mit einer Wiederfindungsrate von 69%.

## 4.2 HPB-freisetzende DNA-Addukte

*Foiles et al.* [104] bestimmten als erste die Adduktlevel in Lungengewebe von Rauchern und Nichtrauchern. Wegen der hohen Blindwerte und der geringen Wiederfindungsraten konnte allerdings nur in einem von acht Nichtrauchern HPB nachgewiesen werden. Ein quantitativer Vergleich mit den Werten bei den Rauchern war deshalb nicht möglich. In 7 von 9 Lungenproben von Rauchern lagen die Adduktkonzentrationen über der Nachweisgrenze, es ergab sich eine mittlere Belastung von  $11 \pm 16$  fmol HPB/mg DNA. Im bronchialen Gewebe waren nur 2 von 4 Raucherproben ( $16 \pm 18$  fmol HPB/mg DNA) und 1 von 3 Nichtraucherproben messbar. Weitere Ergebnisse zu HPB-Addukten beim Menschen wurden von dieser Arbeitsgruppe seither nicht mehr vorgelegt. Lediglich bei Ratten wurden mit weitgehend gleicher Methode die Addukte nach hoher Belastung mit NNK über das Trinkwasser in Leber und Lunge gemessen [106]. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Addukte durch gleichzeitige Gabe von Phenethylisothiocyanat (PEITC) in der Lunge, aber nicht in der Leber. In zahlreichen Tierversuchen hatte sich PEITC als wirksames Chemopräventivum gegen den Lungenkrebs durch NNK erwiesen [129].

Mit derselben GC/MS-Methode konnten in Bauchspeicheldrüsengewebe keine HPB-freisetzenden Addukte gefunden werden [130].

Mit der deutlich verbesserten Analysetechnik konnten *Hölzle et al.* [83] HPB-Addukte in Lungengewebe von Lungenkrebspatienten bei 21 von 21 Rauchern und bei 8 von 11 Nichtrauchern bestimmen. Die Adduktwerte lagen bei Rauchern ( $404 \pm 258$  fmol/mg DNA) siebenfach über denen von Nichtrauchern ( $59 \pm 56$  fmol/mg). Berechnet man diese Werte wie beim  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling als Addukte pro gesamte Nukleotide, dann haben Raucher ca. 135 HPB-Addukte pro  $10^9$  Nukleotide und Nichtraucher 20/ $10^9$  Nukleotide. Die Belastung ist damit bei Rauchern in der gleichen Größenordnung wie die durch  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling in Lungengewebe bestimmten Werte von  $110 \pm 69/10^9$  Nukleotide und doppelt so hoch wie die immunchemisch bestimmten DNA-Addukte von PAH mit  $62 \pm 51/10^9$  Nukleotide [131]. Bei der Untersuchung von Lungenproben akut Verstorbener ohne Tumorerkrankung durch *Schlöbe et al.* [112] ergab sich für die Raucher eine geringere Belastung mit HPB-Addukten, 30/ $10^9$  Nukleotide, der Unterschied zu den Nichtrauchern, 20/ $10^9$  Nukleotide, war nicht mehr signifikant.

*Schlöbe et al.* [112] quantifizierten HPB-Addukte außer in der Lunge auch noch in Schleimhautproben von Speiseröhre und Cardia. Beide Proben wurden in der Nähe des Mageneingangs genommen. In der Speiseröhre lagen die mittleren Adduktlevel bei  $133 \pm 160$  und in der Cardia

bei  $108 \pm 102$  fmol HPB/mg DNA. Sie waren noch höher als die Adduktwerte in der Lunge ( $72 \pm 104$  fmol/mg DNA) und zeigten keinerlei Abhängigkeit vom Rauchstatus. Während die Adduktlevel in Ösophagus und Cardia sehr gut korrelierten, gab es keine Korrelation mit den Adduktleveln in der Lunge.

Die Ergebnisse von *Schlöbe et al.* [112] waren Anlass für die vorliegende Arbeit. In den Biopsien der Speiseröhre war die mittlere Adduktkonzentration mit  $4,75$  pmol/mg DNA 35fach höher als in den Schleimhautproben akut Verstorbenen. Geht man davon aus, dass die Addukte in der obersten Epithelschicht der Schleimhaut am höchsten sind, dann könnte dieser große Unterschied in den Adduktkonzentrationen daran liegen, dass bei der Gewinnung von Biopsien ein geringerer Anteil tieferer Gewebeabschnitte erfasst wird, als beim Abpräparieren größerer Schleimhautareale von den Gewebeproben, die in der Sektion entnommen wurden. Ein höherer Anteil von DNA aus submucosalen Schichten und glatter Muskulatur würde dann durch den höheren Anteil geringer belasteter DNA die Adduktwerte sozusagen verdünnen. Im Gegensatz zu der Untersuchung von *Schlöbe et al.* [112] wurden hier nicht unterschiedlich gealterte Proben von Sektionen, sondern nur frische Proben im Rahmen der Endoskopie von Patienten untersucht. Es wäre denkbar, dass nach dem Tod die Reparatur der DNA noch weiter läuft, aber keine neuen Addukte mehr gebildet werden. Die Ergebnisse von *Schlöbe et al.* [112] geben allerdings darauf keinen Hinweis. Wurde der Ösophagus erst später als ein Tag nach dem Tod entnommen, waren die Adduktlevel im Mittel sogar fast doppelt so hoch, der Unterschied,  $182 \pm 231$  (N = 26) gegenüber  $111 \pm 110$  (N = 56), war allerdings nicht signifikant.

Auch im Ösophagus wurden Addukte mit  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling bestimmt. Insgesamt sind die Adduktwerte um zwei Größenordnungen niedriger als der Level der HPB-Addukte in der vorliegenden Arbeit [132-134]. Es zeigen sich große Unterschiede hinsichtlich Lokalisation entlang der Speiseröhre und des Krankheitsbildes (Abbildung 4-2). Darauf wird im Kapitel 4.4. noch näher eingegangen.

Im Vergleich zum  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling kann mit der GC/MS-Bestimmung nach saurer Hydrolyse der Ausgangspunkt der DNA-Veränderung, hier der Angriff des pyridyloxobutylierenden reaktiven Agens, genau bestimmt werden. Bei der Hydrolyse geht aber die Information über die Bindungsstelle an der DNA-Base und die Position innerhalb der DNA verloren. Nach schonenderer thermischer DNA-Spaltung bleibt dagegen das Addukt an der DNA-Base gebunden. Danach können die einzelnen Addukte mittels LC/MS bestimmt werden. Im Falle der TSNA wurden zunächst die Addukte *in vitro* durch Inkubation O-acetylierter Vorstufen der reaktiven  $\alpha$ -Hydroxylierungsprodukte erzeugt und mit synthetischen Standards verglichen [135-139]. Schließlich gelang es eine Reihe von POB-Addukten auch in Lunge, Leber und Ösophagus von TSNA-behandelten Ratten nachzuweisen, die alle bei der sauren Hydrolyse HPB abspalten [98,101,140]. In der Abbildung 4-1 werden beispielhaft die Ergebnisse nach 10-wöchiger Gabe

von NNK, (S)-NNAL und (S)-NNN gezeigt. Das Addukt, dem die stärkste Mutagenität und Kanzerogenität zugesprochen wird, O<sup>6</sup>-POB-Guanosin [100,141], konnte nur in der Lunge nachgewiesen werden und macht nur einen sehr geringen Anteil an allen HPB-abspaltenden Addukten aus. Hinzu kommen noch POB-Addukte der (R)-Isomeren von NNAL und NNN, die jedoch in der Natur in geringerem Maß vorkommen. Nur 25% des NNN im Tabak liegt in der (R)-Form vor [142] und aus NNK entsteht in Humangewebe überwiegend (S)-NNAL [143]. Ein weiteres HPB-abspaltendes DNA-Addukt, der in Abbildung 4-2 gezeigte POB-Phosphotriester, wurde von einer schwedischen Arbeitsgruppe entdeckt und in der Leber von NNK-behandelten Mäusen nachgewiesen [144]. Über das Vorkommen dieser spezifischen Addukte in der DNA von Humanproben liegen noch keine Ergebnisse vor.

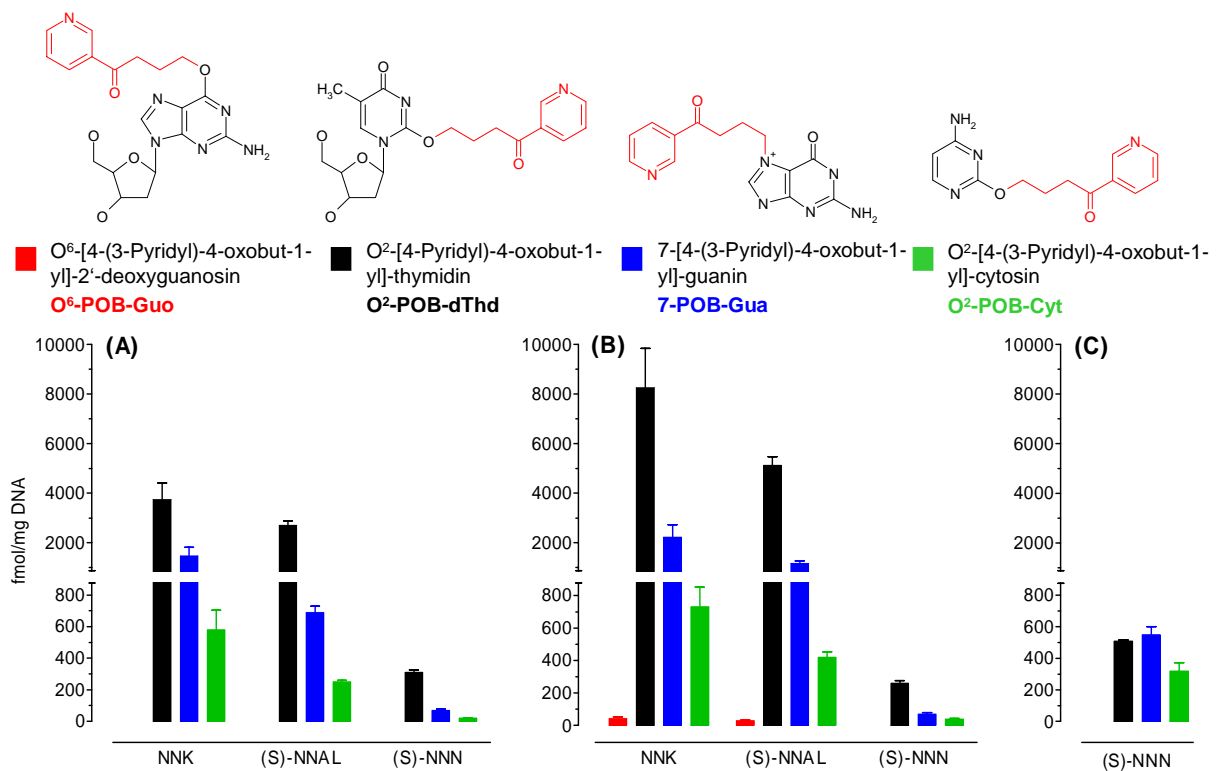


Abbildung 4-1: POB-DNA-Addukte in Leber (A) und Lunge (B) von Fischer F344 Ratten, die über 10 Wochen 10 ppm NNK, (S)-NNAL oder (S)-NNN über das Trinkwasser erhalten hatten. In den NNN-behandelten Ratten wurden die Addukte zusätzlich im Ösophagus (C) bestimmt. Die Addukte O<sup>6</sup>-POB-Guo und O<sup>2</sup>-POB-dThd sind bei der abschließenden thermalen Hydrolyse unter sauren Bedingungen stabil und behalten den Zuckerrest, die beiden anderen Addukte spalten diesen oder das HPB ab. Die Verluste wurden mit Hilfe von deuterierten Standards korrigiert [98,101].

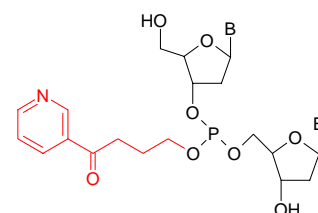


Abbildung 4-2: Struktur der POB-Phosphotriester [144].

### 4.3 Plasmakonzentration von Nicotinoiden

Um die Rauchbelastung der Probanden in einer Studie zuverlässig abschätzen zu können, reicht es meist nicht aus sich allein auf die selbst gemachten Angaben in einem Fragebogen zu stützen [125,145]. Nicotin hat aufgrund seines überwiegend auf Tabakprodukte beschränkten Vorkommens eine hohe Spezifität für die Belastung der Menschen durch das Rauchen und den Genuss rauchloser Tabakwaren [92]. Wegen seiner kurzen Halbwertszeit von nur 2 h ist aber Nicotin selbst wenig geeignet um die Rauchbelastung wider zu spiegeln. Cotinin, der Hauptmetabolit des Nicotins, besitzt mit  $t_{1/2} = 16$  h eine wesentlich längere Halbwertszeit und wird deshalb zur Bestimmung der akuten Rauchbelastung am häufigsten herangezogen. In der Praxis wird Cotinin meist in Serum/Plasma, Speichel oder Urin bestimmt. In der Klinik sind Plasma und Urin gleichermaßen geeignet, da Blut- und Urinproben routinemäßig von den Patienten gewonnen werden.

Die mittlere Cotininkonzentration im Plasma liegt bei Rauchern in den meisten Studien über 200 ng/ml, die Nichtraucherwerte liegen im Mittel häufig unter 5 ng/ml Plasma. Zur Unterscheidung von Rauchern wird in der Regel ein cut-off Wert von <15 ng/ml verwendet, weil diese Konzentration selbst durch extreme Passivrauchbelastung bei Nichtrauchern nicht überschritten wird [125]. Der viel diskutierte Beitrag von Nicotin aus Lebensmitteln [146] spielt selbst gegenüber der Passivrauchbelastung nur eine untergeordnete Rolle [147,148].

Auch in der vorliegenden Arbeit ist der Unterschied in der Plasmakonzentration von Cotinin zwischen Rauchern und Nichtrauchern hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ), allerdings liegt der mittlere Cotininwert bei den Rauchern mit  $50 \pm 33$  ng/ml relativ niedrig. Dies ist sicher nicht alleine dadurch bedingt, dass den Patienten die Blutprobe am Morgen in nüchternem Zustand entnommen wurde. Der letzte Tabakkonsum muss entweder länger zurückliegen oder in der Kliniksituation mit den dort vorherrschenden Rauchverböten stark eingeschränkt gewesen sein. Die Abbildung 4-3 zeigt, dass bei den Rauchern, der selbst angegebene tägliche Zigarettenkonsum nicht mit den Cotininwerten im Plasma korreliert (Spearman  $r = 0,073$ ; n.s.). Zur Veranschaulichung des Zusammenhangs wird in der Abbildung auch die Gerade der linearen Regression gezeigt, die aber wegen der fehlenden Normalverteilung der Daten nicht zur Berechnung der Korrelation herangezogen werden darf. Das Bild zeigt deutlich, dass die Patienten ihr Rauchverhalten ganz offensichtlich sehr individuell verändert haben. Der mit 158 ng Cotinin/ml Plasma höchste Wert aller Patienten wurde im Übrigen bei einem Raucher gemessen, der sich selbst als Nichtraucher bezeichnete. Dieses Ergebnis belegt eindrucksvoll, dass speziell unter Klinikbedingungen das selbst berichtete Rauchverhalten nur wenig über den akuten Rauchstatus aussagt.

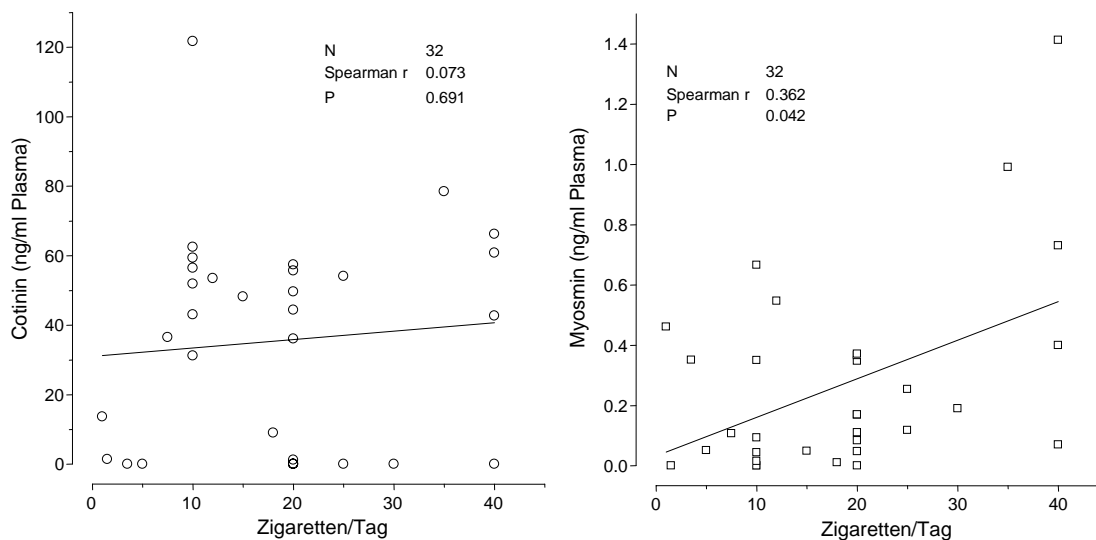


Abbildung 4-3: Korrelation zwischen selbst berichtetem Rauchverhalten und den Plasmakonzentrationen von Cotinin (links) und Myosmin (rechts)

Für Myosmin gibt es noch keine Angaben zur Halbwertszeit beim Menschen, Studien an Ratten zeigen allerdings eine schnelle Metabolisierung des Myosmins [78,79]. Nach oraler Gabe von radioaktiv markiertem Myosmin schieden Ratten zwei Drittel der Radioaktivität innerhalb der ersten 6 Stunden über den Urin aus. Nach i.v. Verabreichung und Messung der Radioaktivität in Ganzkörperschnitten durch Autoradiographie ergaben sich für alle Gewebe Halbwertszeiten von ca. einer Stunde. Dies entspricht exakt den Werten, die für Nicotin ebenfalls an Ratten erhalten wurden [149]. Daher muss beim Menschen für Myosmin von einer ähnlich kurzen Halbwertszeit wie für Nicotin ausgegangen werden. Große tageszeitliche Schwankungen wurden in zwei Dissertationen aus der eigenen Arbeitsgruppe für Plasma bzw. Speichel beschrieben [121,128]. Die hier gefundene große Streubreite der Myosminkonzentrationen zwischen Werten unter der Nachweisgrenze und 1,4 ng/ml Plasma ist deshalb nicht verwunderlich, zumal den Patienten das Blut am Morgen vor der Nahrungsaufnahme abgenommen wurde, die letzte Nahrungsaufnahme als einer der hauptsächlichen Myosminquellen neben dem Rauchen, also unterschiedlich lange zurücklag. Wegen dieser unbefriedigenden Sachlage wurde nach geeigneteren Methoden gesucht, mit denen die Myosminbelastung über einen längeren Zeitpunkt abgeschätzt werden kann. In den Metabolismusstudien an Ratten wurde nur ein für Myosmin spezifischer Metabolit im Urin gefunden, das 3-Hydroxymyosmin, welches weniger als 3% zur gesamten Radioaktivität im Urin beitrug [78]. Unverändertes Myosmin erschien nicht im Rattenurin. Ergebnisse beim Menschen liegen noch nicht vor. Ein Hauptproblem des Biomonitorings von Substanzen im Urin, die selbst oder deren Metaboliten nur geringfügig zu der Gesamtausscheidung beitragen ist, dass selbst kleine Schwankungen im prozentualen Anteil eine große Auswirkung auf die Schätzwerte für die Aufnahme dieser Substanzen haben. Die autoradiographische Studie mit Myosmin ergab den Hinweis auf eine weitere Möglichkeit, auch eine längerfristige Belastung

zu erfassen, denn Myosmin reichert sich wie Nicotin, Cotinin und andere leicht basische Substanzen im Melanin der Haare an [79,125,150]. Der Nachteil bei den Haaren ist aber die Abhängigkeit vom Melaniningehalt [151]. Dementsprechend hatten z.B. Kinder von Afroamerikanern mit naturgemäß dunkler Haarfarbe bei gleicher Passivrauchbelastung deutlich höhere Cotinin-konzentrationen in den Haaren als Kinder von Weißen, die häufig eine hellere Haarfarbe haben [152]. Eine gute Alternative zu den Haaren bieten die keratinhaltigen Nägel. Es hat sich gezeigt, dass auch hier basische Substanzen eingelagert werden [118-120,153-155]. Gegenüber Fingernägeln haben die Fußnägel als Langzeitmarker bei Rauchern den Vorteil, dass die Kontamination von außen keine Rolle spielt. Bei einer Wachstumsrate der Fußnägel von ca. 1 cm in 9-12 Monaten [156] bieten Abschnitte von 1-2 mm die Möglichkeit, die mittlere Belastung durch Nicotinoide über einen Zeitraum von mehr als einem Monat zu erfassen. Erste Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass dies auch für Myosmin gilt [121]. Die Myosminkonzentration in den Fußnägel war bei Rauchern etwa dreimal so hoch wie bei Nichtrauchern. Trotz dieser Abhängigkeit vom Rauchen erstaunt es, dass eine schwache, jedoch signifikante Korrelation zwischen den Myosminkonzentrationen im Plasma und der selbst berichteten Anzahl pro Tag gerauchter Zigaretten (Spearman  $r = 0,362$ ,  $p < 0.05$ ) besteht (Abbildung 4-3), obwohl sich für das viel stärker vom Rauchen abhängige Cotinin keine Abhängigkeit vom Tabakkonsum gezeigt hat. Unabhängig vom Rauchstatus war die Myosminkonzentration im Plasma auch signifikant bei den Patienten erhöht, die angaben regelmäßig Alkohol zu trinken (Abbildung 3-29). Für diese unerwarteten Ergebnisse kann keine plausible Erklärung angeboten werden.

#### **4.4 Einflussfaktoren für DNA-Addukte in der Speiseröhre**

Das Adenokarzinom des Ösophagus gewinnt in den Ländern der westlichen Zivilisation zunehmend an Bedeutung [22,27]. Seine Entstehung steht in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten eines Barrett-Ösophagus, einer intestinalen Metaplasie des normalen Plattenepithels. Der Barrett-Ösophagus entsteht durch chronischen Reflux von saurem Magensaft in die unteren Bereiche der Speiseröhre. Allerdings entwickeln von den Patienten mit einem Barrett-Ösophagus pro Jahr nur etwa 1-2% ein Karzinom [157]. Die hierfür verantwortlichen Risikofaktoren sind noch weitgehend unklar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob das Auftreten von HPB-bspaltenden DNA-Addukten einen Einfluss auf die Entwicklung des EAC hat und ob das Auftreten dieser Addukte im direkten Zusammenhang mit der Myosminaufnahme durch die Nahrung steht. Diese Addukte wurden mit den in Tierversuchen durch das tabakspezifische Nitrosamin NNN erzeugten Ösophagustumoren in Verbindung gebracht [96]. Das Humanbiomonitoring hat allerdings für die HPB-Addukte weder am Hämoglobin noch an der DNA der Lunge die erwartete Spezifität für das Rauchen gezeigt [83,103-105,107,108,158]. Bei



Autopsien gewonnene Schleimhautproben des unteren Ösophagus und der Cardia waren die erstaunlich hohen Konzentrationen HPB abspaltender DNA-Addukte gänzlich unabhängig von der akuten Rauchbelastung [112]. Dies wurde in der vorliegenden Studie bestätigt, denn auch in den noch höher belasteten Biopsien der Ösophagusschleimhaut gab es keine Abhängigkeit der HPB-Addukte vom Rauchstatus (Tabellen 3-16 und 3-17). Auch wenn die Patienten relativ niedrige Cotininwerte im Plasma hatten, die wahrscheinlich auf die Kliniksituation zurückgeführt werden können, müsste sich eine Abhängigkeit vom Rauchen angesichts einer Erneuerungszeit des Epithels von ca. 2 Wochen [159] auch noch nach einigen Tagen Abstinenz oder Einschränkung des Rauchens zeigen.

Bei der Suche nach anderen Quellen für die HPB-Addukte wurde man auf das Myosmin aufmerksam, weil es auch unabhängig vom Tabakgenuss über die Nahrung aufgenommen wird [68,69,160]. *Zwickenpfluget al.* [113] konnte zeigen, dass Myosmin im sauren Milieu durch Nitrosierung in geringem Masse zu NNN, hauptsächlich aber über eine reaktive Zwischenstufe zu HPB abgebaut wird. Dies wurde in einer weiteren Arbeit bestätigt, in der unter nitrosierenden Bedingungen auch eine kovalente Bindung von radioaktivem Myosmin an Kalbs-thymus-DNA *in vitro* gezeigt werden konnte [114]. Durch Peroxidation kann Myosmin in reaktive Species umgewandelt werden, die mit Wasser zu HPB abreagieren [116]. *Vogt et al.* [76] zeigten schließlich, dass die zuvor bereits festgestellte genotoxische Wirkung von Myosmin [75] in humanen EAC-Zelllinien pH-abhängig ist und durch Zusatz von Wasserstoffperoxid oder eines Peroxynitritdonors gesteigert werden kann. Auch spricht die gesteigerte Nitrosierungsrate im Bereich des unteren Ösophagus [44] und das Vorliegen von Myosmin im Speichel in Konzentrationen von 0,2 bis 2,33 ng/ml bei Nichtrauchern und 0,45 bis 10,86 ng/ml Speichel bei Rauchern für die gesteigerte Bildung dieser Addukte [121]. Eine Abhängigkeit der HPB-Addukte von den Myosminkonzentrationen im Nüchternplasma konnte allerdings nicht gezeigt werden (Abbildungen 3-34 bis 3-36). Aufgrund der wahrscheinlich sehr kurzen Halbwertszeit von Myosmin beim Menschen (siehe Kapitel 4.3) kann jedoch von der Bestimmung der Myosminkonzentration im Plasma nicht auf die Gesamtbelastung der Patienten zurück geschlossen werden. In künftigen Untersuchungen sollten Langzeitmarker wie die Konzentration in den Fußnägeln zur Abschätzung der Myosminbelastung herangezogen werden [121].

Geht man trotzdem davon aus, dass die HPB-Addukte auch von der Myosminbelastung abhängen, dann sollten Patienten mit einem wahrnehmbaren Reflux, der sich als Sodbrennen äußert, höhere Adduktlevel in der Ösophagusschleimhaut aufweisen. Die Arbeiten der Gruppe von *McCull* haben die Bedeutung der endogenen Nitrosierung gerade im Übergangsbereich vom Ösophagus zum Magen eindrucksvoll belegt. Erstaunlicherweise wird dieser Prozess durch die

Ascorbinsäure noch gefördert [44,161-163]. Tatsächlich zeigt sich trotz der hohen Streuung in den Werten eine signifikante Erhöhung der HPB-Addukte (Abbildung 3-22 und Tabelle 3-22).

Bei der Differenzierung der Adduktwerte nach dem Krankheitsstatus ist diese vom Symptom Sodbrennen abhängige Erhöhung nur noch bei Patienten mit Refluxösophagitis und GERD erkennbar (Abbildung 4-4). Sie ist bei den oral von der Läsion genommenen Biopsien deutlicher ausgeprägt. Einschränkend muss zu diesen Ergebnissen angemerkt werden, dass auch die Hälfte der Kontrollen angaben, unter Sodbrennen zu leiden. Die von Hölzle [164] bei vier Patienten mit EAC gesehene leichte Erhöhung der HPB-Addukte konnte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Die Abbildung demonstriert den bereits diskutierten Unterschied in den Adduktleveln von Biopsien im Vergleich zu Gewebeproben, die einen größeren Anteil von Submucosa enthalten haben. Obwohl mit dem  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling eine große Anzahl von nicht näher charakterisierten Addukten erfasst werden, sind die von der finnischen Arbeitsgruppe von Salo [132-134] berichteten Konzentrationen der DNA-Addukte in Biopsien/Gewebeproben des Ösophagus um drei Größenordnungen geringer als die HPB-Addukte. Auffallend sind hier die relativ deutlichen Unterschiede der Adduktlevel im distalen Ösophagus in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus und die erheblich höheren Werte im unteren Ösophagus bei den Barrett-Patienten.

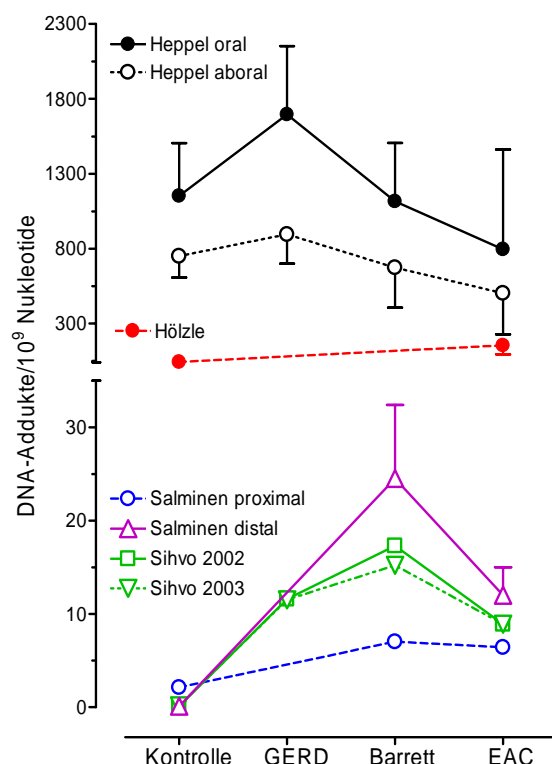


Abbildung 4-4: Abhängigkeit von DNA-Addukten in der Ösophagusmucosa vom Krankheitsstatus. Die Werte von Heppel und Hölzle [164] beziehen sich auf HPB-Addukte, die restlichen Werte auf nicht näher charakterisierte Addukte, die mit  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling bestimmt wurden [132-134]. Die Werte von "Salminen proximal" entstammen dem oberen Drittel des Ösophagus, alle übrigen Werte von magennahen Abschnitten. Bei den Werten von Heppel wurden die Ergebnisse für Patienten mit Reflux und GERD zusammengefasst.

Die HPB-Addukte zeigten keine Abhängigkeit vom Geschlecht. Das Risiko für das EAC ist aber deutlich höher für Männer als für Frauen, wobei die Gründe hierfür weitgehend unbekannt sind [21,23,165,166]. In Ratten mit einem operativ erzeugten chronischen gastroduodenalen Reflux erhöhte die Gabe von Eisen signifikant die Spontanrate von Tumoren im unteren Ösophagus [167]. Frauen haben aufgrund der Monatsblutungen häufig einen niedrigeren Eisenspiegel als Männer. Es ist aber zweifelhaft, ob dieser relativ geringe Unterschied im Eisenstatus den großen Unterschied in der Inzidenz des EAC erklären kann. Auch wären die ethnischen Unterschiede, nämlich das deutlich höhere Risiko bei Amerikanern europäischer als afrikanischer Herkunft damit nicht erklärbar [23,165,166]. Auch die Inzidenz der Refluxkrankheit ist zwischen Männern und Frauen nicht sehr unterschiedlich [168]. Es wird allerdings diskutiert, dass ein nicht symptomatischer Reflux bei übergewichtigen Männern mit ihrer von Frauen verschiedenen Fettverteilung, die so genannte Apfelform, deutlich häufiger sein könnte. Der relativ schwache Einfluss des BMI auf das EAC-Risiko wird jedenfalls deutlich stärker, wenn man zusätzlich den Bauchumfang oder noch besser das Verhältnis von Bauch-zu-Hüftumfang (waist-to-hip ratio) berücksichtigt [169]. In der vorliegenden Arbeit wurde nur der BMI bestimmt, der bei den Refluxpatienten signifikant erhöht war (Abbildung 3-9). Bei den HPB-Addukten zeigte sich nur eine Tendenz zur Erhöhung (Abbildung 3-19), aber keine signifikante Korrelation zwischen BMI und HPB-Addukten (Abbildung 3-20) wie bei den von *Schlöbe et al.* [112] untersuchten Proben der unteren Speiseröhre akut Verstorbener.

Der für viele Krebserkrankungen gesehene Schutzeffekt einer gemüse- und obstreichen Ernährung, wird auch für das EAC und den Barrett-Ösophagus gesehen [170-173]. Aufgrund der zu geringen Anzahl von Patienten mit diesem Krankheitsbild (N = 12) konnte kein Einfluss auf die HPB-Addukte gesehen werden. Für andere diskutierte Risikofaktoren der Ernährung zeigten sich nur tendenzielle Effekte. Der häufige Verzehr scharfer Speisen führt zu einer Erhöhung (Abbildung 3-23). Auch der Konsum von nusshaltigen Lebensmitteln, der in anderem Zusammenhang eher als Schutzeffekt vor Tumorerkrankungen gesehen wird [174], war mit einem Anstieg der HPB-Addukte verbunden (Abbildung 3-24). Sollte sich dies in einer größeren Studie bestätigen lassen, würde angesichts des Vorkommens von Myosmin in Nüssen [68], die Hypothese unterstützt, dass eine Myosminbelastung zur Bildung von HPB-Addukten beiträgt [114]. Allerdings müsste dann auch die Myosminaufnahme mit dem Nussverzehr korrelieren. Dies kann, wie oben diskutiert, nur mit einem Langzeitmarker wie den Zehennägeln bestimmt werden. Die Plasmakonzentration der nüchternen Patienten lieferte hier keine verwertbaren Ergebnisse. Wenngleich die Milch in der Studie von *Tyroller et al.* [69] relativ hohe Myosminkonzentrationen aufwies, waren bei den Patienten, die einen häufigeren Verzehr von Milchprodukten angaben, die HPB-Addukte erniedrigt (Abbildung 3-25).

Obwohl der Alkoholkonsum für das EAC im Gegensatz zum ESCC eine untergeordnete Rolle spielt [13,27], waren die HPB-Addukte bei den Nichtrauchern, die regelmäßig Alkohol tranken, signifikant erhöht (Abbildung 3-21). Dies könnte mit der durch Ethanol gesteigerten Resorption von Fremdstoffen in der Schleimhaut zusammenhängen [175,176]. Allerdings waren die HPB-Addukte bei den Rauchern vom Alkoholkonsum nicht beeinflusst. Dagegen war die Myosminkonzentration im Plasma unabhängig vom Rauchstatus signifikant erhöht (Abbildung 3-29).

Auch wenn noch viele Fragen offen bleiben, liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit doch wichtige Erkenntnisse zum besseren Verständnis der Pathogenese des EAC. Die generell hohen Konzentrationen HPB-absplattender DNA-Addukte in der Schleimhaut des unteren Ösophagus sind von der Säurebelastung abhängig. Die Adduktlevel sind im akut entzündeten Epithel am höchsten, also vor der Metaplasie, die im Barrett-Ösophagus die Schleimhaut vor der Säure schützt. Vom Rauchstatus sind die Addukte dagegen völlig unabhängig. Dies unterstützt unsere Hypothese, dass unter nitrosierenden und peroxidierenden Bedingungen das Myosmin als weitgehend vom Rauchen unabhängige Quelle von HPB-Addukten eine wichtige Rolle in der Initiation der Kanzerogenese des EAC spielt. Im Gegensatz zu den kürzlich entdeckten DNA-Addukten von Gallensäuren [50] braucht es für die Bildung der HPB-Addukte keinen duodenalen Reflux. Für die Promotion und Progression der initialen DNA-Schädigung in den Zellen sind sicherlich andere Faktoren entscheidend. Für die zweifellos bedeutsamen Einflussfaktoren Ernährung und Geschlecht, liefert die vorliegende Arbeit keine Erklärung. Ob Unterschiede in der Myosminbelastung vorliegen oder nur die Myosminaktivierung unter Refluxbedingungen erhöht ist, kann ebenfalls nicht aus den Ergebnissen abgeleitet werden. Hierzu bedarf es der Bestimmung eines Langzeitmarkers für die Myosminbelastung, für die die Konzentration in den Zehennägeln in Frage kommt. Auch wäre es erforderlich, eine höhere Anzahl von Barrett- und EAC-Patienten zu untersuchen um die hier gefundenen Tendenzen abzusichern. Die geplante Akquisition etwa gleich großer Gruppen aus der Sequenz Reflux – GERD – Barrett – EAC war aber wegen des Weggangs unseres klinischen Kooperationspartners im zeitlichen Rahmen der Dissertationsarbeit nicht mehr zu realisieren.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Batzler WU Giersiepen K Hentschel S (2008) Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. Berlin. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 6. überarbeitete Auflage.
2. Becker N (2006) Epidemiologie bösartiger Neubildungen. in: Praxis der Viszeralchirurgie; Ch. 4, pp 35-48; eds: Siewert JR Rothmund M Schumpelick V; 2. Auflage Berlin, Heidelberg, Springer Verlag
3. Marquardt H Schäfer SG (2004) Lehrbuch der Toxikologie. 2; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsges.mbH
4. Esaka Y Inagaki S Goto M (2003) Separation procedures capable of revealing DNA adducts. *J.Chromatogr.B* 797:321-329
5. Poirier MC (2004) Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nature Rev.Cancer* 4:630-637
6. Hanahan D Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
7. Schärer OD (2003) Chemistry and biology of DNA repair. *Angew.Chem.Int.Ed.* 42:2946-2974
8. Posner MC Forastiere AA Minton TA (2005) Cancer of the Esophagus. in: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*; Ch. 7, pp 861-909; eds: DeVita VT Hellman S Rosenberg SA; Philadelphia, Lippincott & Wilkins
9. Anon (2008) Tumorregister München. <http://www.tumorregister-muenchen.de/>
10. Stoner GD Gupta A (2001) Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 22:1737-1746
11. Ribeiro U Posner MC Safatle-Ribeiro AV Reynolds JC (1996) Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br.J.Surg.* 83:1174-1185
12. Freedman ND Abnet CC Leitzmann MF Mouw T Subar AF Hollenbeck AR Schatzkin A (2007) A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *Am.J.Epidemiol.* 165:1424-1433
13. Zambon P Talamini R La Vecchia C Dal Maso L Negri E Tognazzo S Simonato L Franceschi S (2000) Smoking, type of alcoholic beverage and squamous-cell oesophageal cancer in northern Italy. *Int.J.Cancer* 86:144-149
14. Sjødahl K Lu Y Nilsen TIL Ye W Hveem K Vatten L Lagergren J (2007) Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int.J.Cancer* 120:128-132
15. Rehm J Patra J Popova S (2007) Alcohol drinking cessation and its effect on esophageal and head and neck cancers: A pooled analysis. *Int.J.Cancer* 121:1132-1137
16. Stein HJ Feith M Siewert JR (2000) Cancer of the esophagogastric junction. *Surg. Oncol.* 9:35-41

17. Kuwano H Watanabe M Sadanaga N Ikebe M Mori M Sugimachi K (1993) Squamous epithelial dysplasia associated with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Lett.* 72:141-147
18. Stoner GD Wang L-S Chen T (2007) Chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 224:337-349
19. Shimizu M Ban S Odze RD (2007) Squamous dysplasia and other precursor lesions related to esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterol.Clin.N.A.* 36:797-811
20. Pera M Manterola C Vidal O Grande L (2005) Epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *J.Surg.Oncol.* 92:151-159
21. van Blankenstein M Looman CWN Siersema PD Kuipers EJ Coebergh JWW (2007) Trends in the incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and cardia in the Netherlands 1989-2003. *Br.J.Cancer* 96:1767-1771
22. Bollschweiler E Wolfgarten E Gutschow C Hölscher AH (2001) Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer* 92:549-555
23. Devesa SS Blot WJ Fraumeni JF (1998) Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 83:2049-2053
24. Anon (2008) Accessible Version of the SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005/accessible\\_contents.html](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/accessible_contents.html)
25. Bollschweiler E Hölscher AH (2001) Aktuelle Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms in Deutschland. *Onkologie* 24:180-184
26. Wong A Fitzgerald RC (2005) Epidemiologic risk factors for Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Clin.Gastroenterol.Hepatol.* 3:1-10
27. Mayne ST Navarro SA (2002) Diet, obesity and reflux in the etiology of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in humans. *J.Nutr.* 132:3467S-3470S
28. Hampel H Abraham NS El Serag HB (2005) Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann.Intern.Med.* 143:199-211
29. Veugelers PJ Porter GA Guernsey DL Casson AG (2006) Obesity and lifestyle risk factors for gastroesophageal reflux disease, Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Dis.Esophagus* 19:321-328
30. van Sandick JW van Lanschot JJB Kuiken BW Tytgat GNJ Offerhaus GJA Obertop H (1998) Impact of endoscopic biopsy surveillance of Barrett's oesophagus on pathological stage and clinical outcome of Barrett's carcinoma. *Gut* 43:216-222
31. Lenglinger J Ringhofer C Eisler M Devyatko E Cosentini E Wrba F Zacherl J Riegler M (2006) Diagnosis of gastroesophageal reflux disease (GERD). *Eur.Surg.* 38:227-243
32. Boeckxstaens GEE (2007) Review article: the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 26:149-160
33. Kauer WKH Stein HJ Dittler HJ Siewert JR (2005) Barrett's Ösophagus. Verhältnis zwischen Ausmaß der intestinalen Metaplasie, Funktion des unteren Ösophagus-sphinkters und Säure- bzw. Gallereflux. *Chirurg* 76:258-262

34. Olliver JR Hardie LJ Gong Y Dexter S Chalmers D Harris KM Wild CP (2005) Risk factors, DNA damage, and disease progression in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 14:620-625
35. Bonino JA Sharma P (2005) Barrett's esophagus. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 21:461-465
36. Lagarde SM ten Kate FJW Richel DJ Offerhaus GJA van Lanschot JJB (2007) Molecular prognostic factors in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann.Surg.Oncol.* 14:977-991
37. Fitzgerald RC (2006) Molecular basis of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 55:1810-1818
38. Bani-Hani K Martin IG Hardie LJ Mapstone N Briggs JA Forman D Wild CP (2000) Prospective study of cyclin D1 overexpression in barret's esophagus: association with increased risk of adenocarcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* 92:1316-1321
39. Jankowski JA McMenemin R Yu C Hopwood D Wormsley KG (2008) Proliferating cell nuclear antigen in oesophageal diseases; correlation with transforming growth factor alpha expression. *Gut* 33:587-591
40. Kyrgidis A Kountouras J Zavos C Chatzopoulos D (2005) New molecular concepts of barrett's esophagus: clinical implications and biomarkers. *J.Surg.Res.* 125:189-212
41. Morris CD Armstrong GR Bigley G Green H Attwood SEA (2001) Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Am.J. Gastroenterol.* 96:990-996
42. Vaninetti NM Geldenhuys L Porter GA Risch H Hainaut P Guernsey DL Casson AG (2008) Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and p53 mutations in the molecular pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Mol. Carcinogenesis* 47:275-285
43. Goetz ME Luch A (2008) Reactive species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett.* 266:73-83
44. Winter JW Paterson S Scobie G Wirz A Preston T McColl KEL (2007) *N*-nitrosamine generation from ingested nitrate via nitric oxide in subjects with and without gastroesophageal reflux. *Gastroenterology* 133:164-174
45. Dvorak K Fass R Dekel R Payne CM Chavarria M Dvorakova B Bernstein H Bernstein C Garewal H (2006) Esophageal acid exposure at pH  $\leq$ 2 is more common in barrett's esophagus patients and is associated with oxidative stress. *Dis.Esophagus* 19:366-372
46. Dvorak K Payne CM Chavarria M Ramsey L Dvorakova B Bernstein H Holubec H Sampliner RE Guy N Condon A Bernstein C Green SB Prasad A Garewal HS (2007) Bile acids in combination with low pH induce oxidative stress and oxidative DNA damage: relevance to the pathogenesis of Barrett's oesophagus. *Gut* 56:763-771
47. Fang M Lew E Klein M Sebo T Su YY Goyal R (2004) DNA abnormalities as marker of risk for progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma: image cytometric DNA analysis in formalin-fixed tissues. *Am.J.Gastroenterol.* 99:1887-1894
48. Olliver JR Wild CP Sahay P Dexter S Hardie LJ (2003) Chromoendoscopy with methylene blue and associated DNA damage in Barrett's oesophagus. *Lancet* 362:373-374

49. Inayama M Hashimoto N Tokoro T Shiozaki H (2007) Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and esophageal cancer. *Hepato-Gastroenterol.* 54:761-765
50. Terasaki M Totsuka Y Nishimura K Mukaisho K-I Chen K-H Hattori T Takamura-Enya T Sugimura T Wakabayashi K (2008) Detection of endogenous DNA adducts, *O*<sup>6</sup>-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine and 3-ethanesulfonic acid-2'-deoxycytidine, in the rat stomach after duodenal reflux. *Cancer Sci.* 99:1741-1746
51. Belitz H-D Grosch W (1992) *Lehrbuch der Lebensmittelchenie.* Berlin, Heidelberg, New York, Springer
52. Hecht SS Hoffmann D (1988) Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* 9:875-884
53. Brunneemann KD Prokopczyk B Djordjevic MV Hoffmann D (1996) Formation and analysis of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Crit.Rev.Toxicol.* 26:121-137
54. Brunneemann KD Hoffmann D (1991) Analytical studies on tobacco-specific *N*-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. *Crit.Rev.Toxicol.* 21:235-240
55. Schick SF Glantz S (2007) Concentrations of the carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in sidestream cigarette smoke increase after release into indoor air: results from unpublished tobacco industry research. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 16:1547-1553
56. Brandänge S Rodriguez B (1983) Ring chain tautomerism of myosmine. *Acta Chem. Scand.Ser.B* 37:643-644
57. Zoltewicz JA Bloom LB Kem WR (1989) Quantitative determination of the ring-chain hydrolysis equilibrium constant for anabaseine and related tobacco alkaloids. *J.Org. Chem.* 54:4462-4468
58. Burton HR Dye NK Bush LP (1992) Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue .1. Tobacco-specific nitrosamines, nitrate, nitrite, and alkaloids. *J.Agric.Food Chem.* 40:1050-1055
59. Schumacher JN (1984) Flavor composition of Maryland tobacco. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 12:271-278
60. Leete E (1984) The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic-pathway in *Nicotiana tabacum*. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 12:113-116
61. Sakuma H Kusama M Yamaguchi K Matsuki T Sugawara S (1984) The distribution of cigarette smoke components between mainstream and sidestream smoke. II. Bases. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 12:199-209
62. Jenkins RA Palausky MA Counts RW Guerin MR Dindal AB Bayne CK (1996) Determination of personal exposure of non-smokers to environmental tobacco smoke in the United States. *Lung Cancer* 14:S195-S213
63. Smalberger TM Rall GJH de Waal HL (1968) Carica papaya alkaloids. *Tydskr.Natuurwet.* 8:156-157



64. WHO Regional Office for the Western Pacific (1998) Medical plants in the south Pacific. Information on 102 Commonly Used Medicinal Plants in the South Pacific. WHO Regional Publications, Western Pacific Series 19
65. Halim AF Collins RP Berigari MS (1971) Alkaloids produced by *Cestrum nocturnum* and *Cestrum diurnum*. *Planta Med.* 20:44-49
66. Luanratana O Griffin WJ (1982) Alkaloids of *Duboisia hopwoodii*. *Phytochemistry* 21:449-451
67. Watson PL Luanratana O Griffin WJ (1983) The ethnopharmacology of pituri. *J.Ethnopharmacol.* 8:303-311
68. Zwickenpflug W Meger M Richter E (1998) Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. *J.Agric. Food Chem.* 46:2703-2706
69. Tyroller S Zwickenpflug W Richter E (2002) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables and milk. *J.Agric.Food Chem.* 50:4909-4915
70. Hayes JR Steele RH (1989) A review of the literature pertaining to the toxicology of myosmine. *Premier Chem.* 1:12-35
71. Werle E Schivelbein H (1961) Tabellen zur Toxikologie, Pharmakologie und Chemie von Inhaltsstoffen des Tabaks und des Tabakrauchs. 1. Mitteilung. *Arzneimittelforsch.* 11:1011-1016
72. Ambrose AM DeEds F (1946) Some comparative observations on (-)-nicotine and myosmine. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 63:423-424
73. Riveles K Iv M Arey J Talbot P (2003) Pyridines in cigarette smoke inhibit hamster oviductal functioning in picomolar doses. *Reprod.Toxicol.* 17:191-202
74. Riebe M Westphal K Fortnagel P (1982) Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. *Mutat.Res.* 101:39-43
75. Kleinsasser NH Wallner BC Harréus UA Zwickenpflug W Richter E (2003) Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. *Toxicology* 192:171-177
76. Vogt S Fuchs K Richter E (2006) Genotoxic effects of myosmine in a human esophageal adenocarcinoma cell line. *Toxicology* 222:71-79
77. Havla JB Hill CE Abdel-Rahman SZ Richter E (2008) Evaluation of the mutagenic effects of myosmine in human lymphocytes using the *HPRT* gene mutation assay. *Food Chem.Toxicol.* accepted
78. Zwickenpflug W Tyroller S Richter E (2005) Metabolism of myosmine in Wistar rats. *Drug Metab.Dispos.* 33:1648-1656
79. Glas S Tyroller S Zwickenpflug W Steiner K Kiefer G Richter E (2007) Tissue distribution and excretion of myosmine after i.v. administration to Long-Evans rats using quantitative whole-body autoradiography. *Arch.Toxicol.* 81:151-161

80. Swenberg JA Fryar-Tita E Jeong Y-C Boysen G Starr T Walker VE Albertini RJ (2008) Biomarkers in toxicology and risk assessment: informing critical dose-response relationships. *Chem.Res.Toxicol.* 21:253-265
81. Angerer J Ewers U Wilhelm M (2007) Human biomonitoring: state of the art. *Int.J.Hyg. Environ.Health* 210:201-228
82. Györfy E Anna L Kovács K Rudnai P Schoket B (2008) Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adduct. *Mutagenesis* 23:1-18
83. 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
84. Turesky RJ Vouros P (2004) Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts in vitro and in vivo. *J.Chromatogr.B* 802:155-166
85. Phillips DH Castegnaro M (1999) Standardization and validation of DNA adduct post-labelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 14:301-315
86. Collins AR Dobson VL Dusinská M Kennedy G Stetina R (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat.Res.* 375:183-193
87. Matissek G Steiner G (2006) *Lebensmittelanalytik*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag
88. Anon (2006) DFG, ed. *The use of gas chromatography-mass spectrometry in biological monitoring*. Weinheim, Wiley VCH
89. Budzikiewicz H Schäfer M (2005) *Massenspektrometrie - Eine Einführung*. Weinheim, Wiley-VCH
90. Rychlik M (2002) *Stabilisotopenverdünnungsanalyse in der Lebensmittelanalytik - Neuentwicklungen und Einsatz in der Lebensmittelchemie*. Toxikologie und Ernährungswissenschaft Technische Universität München
91. Hatsukami DK Benowitz NL Rennard S Oncken C Hecht SS (2006) Biomarkers to assess the utility of potential reduced exposure tobacco products. *Nicotine Tob.Res.* 8:600-622
92. Scherer G Richter E (1997) Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): a critical reappraisal. *Hum.Exp.Toxicol.* 16:449-459
93. Hukkanen J Jacob P Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol.Rev.* 57:79-115
94. Brandt HCA Watson WP (2003) Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds. *Ann.Occup.Hyg.* 47:349-378
95. IARC (2007) *Smokeless tobacco and tobacco-specific nitrosamines*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Vol. 89. IARC, Lyon, France
96. Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem.Res.Toxicol.* 11:559-603

97. Upadhyaya P Kalscheuer S Hochalter JB Villalta PW Hecht SS (2008) Quantitation of pyridylhydroxybutyl-DNA adducts in liver and lung of F-344 rats treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of its metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chem.Res.Toxicol.* 21:1468-1476
98. 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
99. Hecht SS (2008) Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. *Chem.Res.Toxicol.* 21:160-171
100. Pauly GT Peterson LA Moschel RC (2002) Mutagenesis by *O*<sup>6</sup>-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine in *Escherichia coli* and human cells. *Chem.Res.Toxicol.* 15:165-169
101. 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
102. Kutzer C Branner B Zwicklenpflug W Richter E (1997) Simultaneous solid-phase extraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of hemoglobin adducts from tobacco-specific nitrosamines and aromatic amines. *J.Chromatogr.Sci.* 35:1-6
103. 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 non-smokers. *Cancer Res.* 50:5438-5445
104. Foiles PG Akerkar SA Carmella SG Kagan M Stoner GD Resau JH Hecht SS (1991) Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine DNA-adducts in smokers and nonsmokers. *Chem.Res.Toxicol.* 4:364-368
105. 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
106. Boysen G Kenney PMJ Upadhyaya P Wang M Hecht SS (2003) Effects of benzyl isothiocyanate and 2-phenethyl isothiocyanate on benzo[*a*]pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone metabolism in F-344 rats. *Carcinogenesis* 24:517-525
107. Falter B Kutzer C Richter E (1994) Biomonitoring of hemoglobin adducts: aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin.Investig.* 72:364-371
108. Branner B Kutzer C Zwicklenpflug W Scherer G Heller WD Richter E (1998) Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and nonsmoking women. *Biomarkers* 3:35-47
109. Hecht SS Carmella SG Murphy SE Akerkar S Brunnemann KD Hoffmann D (1993) A tobacco-specific lung carcinogen in the urine of men exposed to cigarette smoke. *N.Engl.J.Med.* 329:1543-1546
110. Carmella SG Han S Fristad A Yang Y Hecht SS (2003) Analysis of total 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in human urine. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 12:1257-1261

111. Meger M Meger-Kossien I Riedel K Scherer G (2000) Biomonitoring of environmental tobacco smoke (ETS)-related exposure to 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Biomarkers* 5:33-45
112. Schlöbe D Hölzle D Hatz D von Meyer L Tricker AR Richter E (2008) 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in lung, lower esophagus and cardia of sudden death victims. *Toxicology* 245:154-161
113. Zwickenspflug W (2000) *N*-nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (*N*-nitrosornicotine). *J.Agric.Food Chem.* 48:392-394
114. Wilp J Zwickenspflug W Richter E (2002) Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem.Toxicol.* 40:1223-1228
115. Hecht SS Han S Kenney PM Wang M Lindgren B Wang Y Lao Y Hochalter JB Upadhyaya P (2007) Investigation of the reaction of myosmine with sodium nitrite in vitro and in rats. *Chem.Res.Toxicol.* 20:543-549
116. Zwickenspflug W Tyroller S (2006) Reaction of the tobacco alkaloid myosmine with hydrogen peroxide. *Chem.Res.Toxicol.* 19:150-155
117. Maier M Schulze A Richter E (2005) Biomonitoring of myosmine in human milk and saliva. *Toxicol.Lett.* 158:S201-S202
118. Al-Delaimy WK Mahoney GN Speizer FE Willett WC (2002) Toenail nicotine levels as a biomarker of tobacco smoke exposure. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11:1400-1404
119. Stepanov I Feuer R Jensen J Hatsukami D Hecht SS (2006) Mass spectrometric quantitation of nicotine, cotinine, and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in human toenails. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 15:2378-2383
120. Stepanov I Hecht SS (2008) Detection and quantitation of *N*'-nitrosornicotine in human toenails by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 17:945-948
121. Schütte-Borkovec K (2008) Vorkommen und Toxikokinetik von Myosmin in Abhängigkeit von Rauchen und Ernährung. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
122. Moyer TP Charlson JR Enger RJ Dale LC Ebbert JO Schroeder DR Hurt RD (2002) Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles. *Clin.Chem.* 48:1460-1471
123. Duffield AM Budzikiewicz H Djerassi C (1965) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXII. A study of the fragmentation process of some tobacco alkaloids. *J.Am.Chem.Soc.* 87:2926-2932
124. Glenn DF Edwards WB (1978) Synthesis and mass-spectrometry of some structurally related nicotinoids. *J.Org.Chem.* 43:2860-2870
125. Tricker AR (2006) Biomarkers derived from nicotine and its metabolites: a review. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 22:147-175

126. Blömeke B Greenblatt MJ Doan VD Bowman ED Murphy SE Chen CC Kato S Shields PG (1996) Distribution of 7-alkyl-2'-deoxyguanosine adduct levels in human lung. *Carcinogenesis* 17:741-748
127. Tyroller S (2004) Untersuchungen zu Vorkommen und Metabolismus von Myosmin und chemopräventive Effekte von verschiedenen Tabakalkaloiden und tabakspezifischen Nitrosaminen auf den Stoffwechsel von *N*'-Nitrosornikotin. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU
128. Maier M (2005) Biomonitoring der Myosminbelastung des Menschen in Muttermilch, Speichel und Plasma. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU
129. Hecht SS (2000) Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab.Rev.* 32:395-411
130. Prokopczyk B Leder G Trushin N Cunningham AJ Akerkar S Pittman B Ramadani M Straeter J Beger HG Henne-Bruns D El Bayoumy K (2005) 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone, an indicator for 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA damage, is not detected in human pancreatic tissue. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 14:540-541
131. Györfly E Anna L Györi Z Segesdi J Minárovits J Soltész I Kostic S Csekeö A Poirier MC Schoket B (2004) DNA adducts in tumour, normal peripheral lung and bronchus, and peripheral blood lymphocytes from smoking and non-smoking lung cancer patients: correlations between tissues and detection by <sup>32</sup>P-postlabelling and immunoassay. *Carcinogenesis* 25:1201-1209
132. Salminen JT Rämö OJ Ahotupa MO Färkkilä M Salo JA (2002) Increased DNA adducts in Barrett's esophagus and reflux-related esophageal malignancies. *Ann.Med.* 34:565-570
133. Sihvo EIT Salminen JT Rantanen TK Rämö OJ Ahotupa M Färkkilä M Auvinen MI Salo JA (2002) Oxidative stress has a role in malignant transformation in Barrett's oesophagus. *Int.J.Cancer* 102:551-555
134. Sihvo EIT Ruhtula T Auvinen MI Koivistoinen A Harjula AL Salo JA (2003) Simultaneous progression of oxidative stress and angiogenesis in malignant transformation of Barrett esophagus. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 126:1952-1957
135. Wang L Spratt TE Liu X-K Hecht SS Pegg AE Peterson LA (1997) Pyridyloxobutyl adduct *O*<sup>6</sup>-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine is present in 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone treated DNA and is a substrate of *O*<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Chem.Res.Toxicol.* 10:562-567
136. Upadhyaya P Sturla SJ Tretyakova N Ziegel R Villalta PW Wang MY Hecht SS (2003) Identification of adducts produced by the reaction of 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol with deoxyguanosine and DNA. *Chem.Res.Toxicol.* 16:180-190
137. Wang M Cheng G Sturla SJ Shi Y McIntee EJ Villalta PW Upadhyaya P Hecht SS (2003) Identification of adducts formed by pyridyloxobutylation of deoxyguanosine and DNA by 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a chemically activated form of tobacco specific carcinogens. *Chem.Res.Toxicol.* 16:616-626

138. Hecht SS Villalta PW Sturla SJ Cheng G Yu N Upadhyaya P Wang M (2004) Identification of O<sup>2</sup>-substituted pyrimidine adducts formed in reactions of 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol with DNA. *Chem.Res.Toxicol.* 17:588-597
139. Sturla SJ Scott J Lao Y Hecht SS Villalta PW (2005) Mass spectrometric analysis of relative levels of pyridyloxobutylation adducts formed in the reaction of DNA with a chemically activated form of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Chem.Res.Toxicol.* 18:1048-1055
140. Lao Y Villalta PW Sturla SJ Wang M Hecht SS (2006) Quantitation of pyridyloxobutyl DNA adducts of tobacco-specific nitrosamines in rat tissue DNA by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Chem.Res.Toxicol.* 19:674-682
141. Mijal RS Loktionova NA Vu CC Pegg AE Peterson LA (2005) O<sup>6</sup>-Pyridyloxobutyl-guanine adducts contribute to the mutagenic properties of pyridyloxobutylating agents. *Chem.Res.Toxicol.* 18:1619-1625
142. Carmella SG McIntee EJ Chen M Hecht SS (2000) Enantiomeric composition of N'-nitrosornicotine and N'-nitrosoanatabine in tobacco. *Carcinogenesis* 21:839-843
143. Upadhyaya P Carmella SG Guengerich FP Hecht SS (2000) Formation and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol enantiomers *in vitro* in mouse, rat and human tissues. *Carcinogenesis* 21:1233-1238
144. 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
145. George L Granath F Johansson ALV Cnattingius S (2006) Self-reported nicotine exposure and plasma levels of cotinine in early and late pregnancy. *Acta Obstet.Gynecol.Scand.* 85:1331-1337
146. Domino EF Hornbach E Demana T (1993) The nicotine content of common vegetables. *N.Engl.J.Med.* 329:437
147. Scherer G Doolittle DJ Ruppert T Meger-Kossien I Riedel K Tricker AR Adlkofer F (1996) Urinary mutagenicity and thioethers in nonsmokers: role of environmental tobacco smoke (ETS) and diet. *Mutat.Res.* 368:195-204
148. Siegmund B Leyden DE Zikulnig E Leitner E Murkovic M Pfannhauser W Reif H (2001) The contribution of dietary nicotine and dietary cotinine to salivary cotinine levels as a nicotine biomarker. *Food Chem.* 74:259-265
149. Kyerematen GA Taylor LH deBéthizy JD Vesell ES (1988) Pharmacokinetics of nicotine and 12 metabolites in the rat. Application of a new radiometric high performance liquid chromatography assay. *Drug Metab.Dispos.* 16:125-129
150. Sachs H (1997) History of hair analysis. *Forensic Sci.Int.* 84:7-16
151. Gerstenberg B Schepers G Voncken P Völkel H (1995) Nicotine and cotinine accumulation in pigmented and unpigmented rat hair. *Drug Metab.Dispos.* 23:143-148
152. Richter E Wilson S Kahn RS Lanphear BP (2007) Differences in cotinine in tobacco-exposed children. *Chest* 132:1716-1717

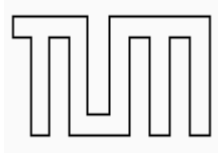
153. Al-Delaimy WK Willett WC (2008) Measurement of tobacco smoke exposure: comparison of toenail nicotine biomarkers and self-reports. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 17:1255-1261
154. Al-Delaimy WK Stampfer MJ Manson JE Willett WC (2008) Toenail nicotine levels as predictors of coronary heart disease among women. *Am.J.Epidemiol.* 167:1342-1348
155. Stepanov I Hecht SS Lindgren B Jacob P Wilson M Benowitz NL (2007) Relationship of human toenail nicotine, cotinine, and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol to levels of these biomarkers in plasma and urine. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 16:1382-1386
156. Palmeri A Pichini S Pacifici R Zuccaro P Lopez A (2000) Drugs in nails: physiology, pharmacokinetics and forensic toxicology. *Clin.Pharmacokinet.* 38:95-110
157. Spechler SJ (2002) Clinical practice. Barrett's Esophagus. *N.Engl.J.Med.* 346:836-842
158. Richter E Schäffler G Malone A Schulze J (1992) Tobacco-specific nitrosamines - metabolism and biological monitoring of exposure to tobacco. *Clin.Investig.* 70:290-294
159. Bell B Almy TP Lipkin M (1967) Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. 3. Cell renewal in esophagus, stomach, and jejunum of a patient with treated pernicious anemia. *J.Natl.Cancer Inst.* 38:615-628
160. Chiu C-W Liang H-H Huang H-Y (2007) Analyses of alkaloids in different products by NACE-MS. *Electrophoresis* 28:4220-4226
161. Combet E Paterson S Iijima K Winter J Mullen W Crozier A Preston T McColl KEL (2007) Fat transforms ascorbic acid from inhibiting to promoting acid catalysed *N*-nitrosation. *Gut* 56:1678-1684
162. Iijima K Grant J McElroy K Fyfe V Preston T McColl KEL (2003) Novel mechanism of nitrosative stress from dietary nitrate with relevance to gastro-oesophageal junction cancers. *Carcinogenesis* 24:1951-1960
163. Suzuki H Iijima K Scobie G Fyfe V McColl KEL (2005) Nitrate and nitrosative chemistry within Barrett's oesophagus during acid reflux. *Gut* 54:1527-1535
164. Hölzle D (2003) Bestimmung von DNA-Addukten tabakspezifischer Nitrosamine in Abhängigkeit von Rauchstatus und Ernährung. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
165. Kubo A Corley DA (2006) Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 15:872-878
166. Brown LM Devesa SS Chow W-H (2008) Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age. *J.Natl.Cancer Inst.* 100:1184-1187
167. Chen X Yang G-Y Ding WY Bondoc F Curtis SK Yang CS (1999) An esophago-gastroduodenal anastomosis model for esophageal adenocarcinogenesis in rats and enhancement by iron overload. *Carcinogenesis* 20:1801-1807
168. Lagergren J (2006) Controversies surrounding body mass, reflux, and risk of oesophageal adenocarcinoma. *Lancet Oncol.* 7:347-349

169. Edelstein ZR Farrow DC Bronner MP Rosen SN Vaughan TL (2007) Central adiposity and risk of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 133:403-411
170. Terry P Lagergren J Hansen H Wolk A Nyrén O (2001) Fruit and vegetable consumption in the prevention of oesophageal and cardia cancers. *Eur.J.Cancer Prev.* 10:365-369
171. Chen H Ward MH Graubard BI Heineman EF Markin RM Potischman NA Russell RB Weisenburger DD Tucker KL (2002) Dietary patterns and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Am.J.Clin.Nutr.* 75:137-144
172. Wolfgarten E Rosendahl U Nowroth T Leers J Metzger R Hölscher AH Bollschweiler E (2001) Coincidence of nutritional habits and esophageal cancer in Germany. *Onkologie* 24:546-551
173. Kubo A Levin TR Block G Rumore GJ Quesenberry CP Buffler P Corley DA (2008) Dietary patterns and the risk of Barrett's esophagus. *Am.J.Epidemiol.* 167:839-846
174. Anon (2007) Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. AICR, Washington DC.
175. Squier CA Cox P Hall BK (1986) Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J.Oral Pathol.* 15:276-279
176. Du X Squier CA Kremer MJ Wertz PW (2000) Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J.Oral Pathol.Med.* 29:80-85



## 6 Anhang

### Fragebogen



## II. Medizinische Klinik und Poliklinik



### (Gastroenterologie)

(Univ.-Prof. Dr. med. Roland Schmid)

#### Einverständniserklärung

Klinische Studie zum Zusammenhang zwischen Ernährungsgewohnheiten und Speiseröhrenkrebs<sup>1</sup>

**Ich erkläre mich einverstanden, dass eine Blutprobe von mir, sowie eine Gewebeprobe des während der Operation/ Endoskopie gewonnenen Materials aus der Speiseröhre für wissenschaftliche Zwecke verwendet wird.**

**Ich stimme der Erfassung, Verwertung, Weitergabe und Aufbewahrung meiner Daten gemäß den Datenschutzbestimmungen für wissenschaftliche Zwecke zu.**

**Ich wurde informiert, dass die Teilnahme an der Studie freiwillig ist und ich diese jederzeit ohne Angabe von Gründen beenden kann.**

---

**Patient**

---

**Aufklärender Arzt**

---

<sup>1</sup> Der offizielle Titel des Forschungsprojektes (in Fachsprache) lautet „Bestimmung von DNA-Addukten durch diätetisch zugeführtes Myosmin und tabakspezifische Nitrosamine in verschiedenen Stadien des ösophagealen Karzinoms“ bzw. englisch „Determination of a common DNA adduct from dietary myosmine and tobacco-specific nitrosamines in different stages of esophageal carcinoma“

## Fragebogen:

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Größe:..... Gewicht:..... Verlust in kg:..... in..... Monaten

**Familienstand:**.....

**Kinder:**.....

### Soziokulturelle Faktoren:

Höchster Schul- bzw. Hochschulabschluss: .....

Höchster berufsbildender Abschluss: .....

Momentan ausgeübter Beruf: .....

Wöchentliche Arbeitsbelastung in Stunden: .....

Umzüge in den letzten 10 Jahren: .....

### Ernährung:

#### Welche Ihrer Hauptmahlzeiten nehmen Sie regelmäßig ein?

Frühstück                       Mittagessen                       Abendessen

Anmerkung:.....

**Nehmen Sie häufige Zwischenmahlzeiten ein?**     Ja                                       Nein

#### Essen Sie gerne scharf gewürzte Speisen?

Nie     Selten     Gelegentlich     Sehr häufig

**Wie heiß essen Sie Ihre Speisen?**  Sehr heiß (direkt vom Herd)  Warm  Lauwarm/Kalt

**Wie schnell essen Sie?**  Hastig („Schlingen“)     Normal     Sehr bewusst und langsam

**Wie häufig essen Sie Fleisch?**  Täglich     Mehrmals pro Woche     Selten     Nie

#### Wie häufig essen Sie geräucherte Nahrungsmittel?

Täglich                       Mehrmals pro Woche                       Selten                       Nie

**Wie häufig essen Sie Wurst?**  Täglich  Mehrmals pro Woche  Selten  Nie

**Wie häufig essen Sie Fisch?**  Täglich  Mehrmals pro Woche  Selten  Nie

**Essen Sie regelmäßig Obst/Gemüse/Salat?**

Täglich  Mehrmals pro Woche  Selten  Nie

**Essen Sie regelmäßig Schokolade?**  Täglich  Mehrmals pro Woche  Selten  Nie

**Essen Sie regelmäßig Bonbons/Gummibärchen etc.?**

Täglich  Mehrmals pro Woche  Selten  Nie

**Essen Sie regelmäßig Nüsse?**  Täglich  Mehrmals pro Woche  Selten  Nie

**Essen Sie regelmäßig Kuchen/Torten?**  Täglich  Mehrmals pro Woche  Selten  Nie

**Essen/Trinken Sie regelmäßig Milchprodukte/Milch?**

Täglich  Mehrmals pro Woche  Selten  Nie

**Welche Küche bevorzugen Sie?**

Mediterrane  Hausmannskost  Vollwert-  Vegetarische Küche  Fast Food

**Welche Brotsorte bevorzugen Sie?**  Weißbrot  Schwarzbrot  Vollkornbrot

**Getränke:**

Gesamte Trinkmenge/Tag: .....l/Tag

**Was trinken Sie hauptsächlich?**  Mineralwasser  Saft  Cola/Limonade  Tee  
 Sonstiges

**Wie viele Tassen Kaffee/Schwarzen Tee/Grünen Tee trinken Sie täglich?**

.....Tassen Kaffee, .....Tassen Schwarzen Tee,.....Tassen Grünen Tee

**Alkohol:**  ja  nein  Ex-Alkoholabusus: seit wann?.....

Bier ..... 0,5 l Gläser / Tag seit wann?.....

Wein ..... 0,2 l Gläser / Tag seit wann?.....

Schnaps ..... 2 cl Gläser / Tag seit wann?.....

Anmerkung:.....

**Rauchen:**  ja  nein  Ex-Nikotinabusus: seit wann?.....

Zigaretten .....Stück /Tag über wie viel  
Jahre:.....

Zigarre .....Stück /Tag über wie viel  
Jahre:.....

Pfeife .....Stück /Tag über wie viel  
Jahre:.....

Raucht – abgesehen von Ihnen – jemand in Ihrem Haushalt/Arbeitsplatz?.....

Anmerkung:.....

**Medikamente:** ..... von ..... bis

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**Hatten Sie früher schon Tumorerkrankungen? Wann?.....**

Wenn ja, Therapie: .....

**Familienanamnese**.....

**Begleiterkrankungen:**

Hatten Sie im Laufe Ihres Lebens folgende Erkrankungen:

Ulcus/Gastritis

Colitis ulcerosa/M. Crohn

Asthma

Chron. Bronchitis

lange Hustenperioden

Diabetes mellitus

Rheuma/Arthritis

Lebererkrankungen

Pancreatitis

Hypertonus

erhöhtes Cholesterin

sonstige:

**Vor-Operationen:**

Diagnose: ..... Datum: ..... Art: .....  
 Wo:.....

Diagnose: ..... Datum: ..... Art: .....  
 Wo:.....

Diagnose: ..... Datum: ..... Art: .....  
 Wo:.....

**Symptome:**

Sodbrennen: O ja      O nein      seit wie viel Jahren?.....  
 O ständig      O sehr oft      O oft      O selten

Schluckstörung:	O ja	O nein	Heiserkeit:	O ja	O nein
Völlegefühl:	O ja	O nein	Asthma:	O ja	O nein
Kurzatmigkeit:	O ja	O nein	Aufstoßen:	O ja	O nein
Brustschmerz:	O ja	O nein	Durchfall:	O ja	O nein
Kloßgefühl im Hals :	O ja	O nein	Übelkeit:	O ja	O nein
Husten:	O ja	O nein	Luftschlucken:	O ja	O nein
Schmerzhaftes Schlucken	O ja	O nein	Blähungen:	O ja	O nein
Verstopfung:	O ja	O nein	Erbrechen:	O ja	O nein
Hochwürgen unverdauter Speise:	O ja	O nein			
Beschwerden im Oberbauch:	O ja	O nein			
Einatmen von Nahrungsresten (Aspiration):	O ja	O nein			

Andere: .....  
 .....

Tabelle A-1: Demographische und gesundheitsbezogene Daten (BMI: Body-Mass-Index)

Nr.	Alter [a]	Geschlecht	Größe [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Schulabschluss	Krankheit	Sodbrennen
7	66	männlich	178	89,5	28,25	Studium	sonst. CA	nein
8	70	weiblich	160	60,0	23,44	Mittlere Reife	sonst. CA	
9	65	weiblich	161	83,0	32,02	Mittlere Reife	Reflux	ja
10	60	weiblich	160	66,0	25,78	Hochschulreife	Reflux	ja
11	50	männlich	178	83,0	26,20	sonstiger	sonst. CA	ja
12	45	weiblich	168	67,0	23,74	Hochschulreife	sonst. CA	ja
13	75	weiblich	157	58,0	23,53	Hauptschule	sonst. CA	ja
14	28	weiblich	168	51,0	18,07	Studium	Kontrolle	nein
15	40	männlich	187	75,0	21,45	Studium	GERD	ja
16	40	männlich	175	70,0	22,86		sonst. CA	nein
17	43	weiblich	170	65,0	22,49		GERD	ja
18	49	männlich	175	83,0	27,10		Gastritis	
19	42	männlich	175	57,0	18,61	Hauptschule	sonst. CA	nein
20	22	männlich	173	76,0	25,39	Hochschulreife	GERD	nein
21	68	weiblich	159	59,0	23,34	Hochschulreife	GERD	ja
22	47	weiblich	154	69,0	29,09	Mittlere Reife	Kontrolle	nein
23	65	männlich	170	60,0	20,76		GERD	ja
24	50	männlich					Barrett	ja
25	37	männlich	184	104,0	30,72	Studium	Reflux	ja
26	69	weiblich	162	54,0	20,58		ESCC	nein
27	61	männlich	174	75,0	24,77	Hochschulreife	GERD	
28	28	männlich	182	105,0	31,70	Hochschulreife	GERD	ja
29	80	männlich	170	66,0	22,84		GERD	ja
30	70	männlich	171	90,0	30,78	Studium	Barrett	nein
31	58	weiblich	164	52,0	19,33	Mittlere Reife	Kontrolle	ja
32	55	männlich	178	70,0	22,09		GERD	ja
33	48	männlich	173	103,0	34,41	Hauptschule	Barrett	ja
34	72	männlich	176	75,0	24,21		sonst. CA	nein
35	55	weiblich	153	59,0	25,20	Studium	Kontrolle	ja
36	78	weiblich	160	65,0	25,39	Studium	Gastritis	ja
37	58	männlich	186	84,0	24,28		Barrett	nein
38	59	männlich	184	109,0	32,20		GERD	ja
39	37	männlich	180	70,0	21,60	Studium	GERD	ja
40	46	weiblich	169	82,0	28,71	Studium	Barrett	ja
41	53	weiblich	163	56,0	21,08	Mittlere Reife	Kontrolle	nein
42	52	männlich	170	70,0	24,22	Hauptschule	Gastritis	ja
43	25	männlich	165	51,0	18,73	Hauptschule	GERD	ja
44	74	weiblich	170	88,0	30,45	Studium	GERD	
45	52	männlich	172	80,0	27,04	Hochschulreife	EAC	nein
46	20	männlich	175	67,0	21,88		sonst. CA	nein
47	45	männlich	177	68,5	21,86	sonstiger	Barrett	ja
48	59	weiblich	170	72,0	24,91	Mittlere Reife	ESCC	nein
49	45	männlich	176	56,0	18,08	sonstiger	ESCC	nein
50	48	männlich	175	83,0	27,10	Hauptschule	sonst. CA	nein
51	62	weiblich	162	53,0	20,20		ESCC	nein
52	47	weiblich	164	56,0	20,82	Studium	Kontrolle	nein

Forts. Tabelle A-1: Demographische und gesundheitsbezogene Daten

Nr.	Alter [a]	Geschlecht	Größe [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Schulabschluss	Krankheit	Sodbrennen
53	73	weiblich	164	61,0	22,68	Hauptschule	Kontrolle	nein
54	58	männlich	172	85,0	28,73	Hauptschule	Reflux	ja
55	41	männlich	182	92,0	27,77	Hauptschule	Gastritis	ja
56	43	männlich	180	81,0	25,00	Hochschulreife	GERD	ja
57	62	männlich	173	79,0	26,40	Hauptschule	GERD	ja
58	57	weiblich	172	49,0	16,56	Hauptschule	Mycosis	ja
59	56	männlich	180	108,0	33,33	Studium	Reflux	ja
60	60	weiblich	150	98,0	43,56	Mittlere Reife	Gastritis	ja
61	50	weiblich	163	85,0	32,00		Gastritis	
62	21	weiblich	170	74,0	25,61	Mittlere Reife	Gastritis	nein
63	60	männlich	187	83,0	23,74	Studium	Barrett	ja
64	22	männlich	182	67,0	20,23	Hochschulreife	Kontrolle	ja
65	31	weiblich	160	68,0	26,56	sonstiger	GERD	ja
66	71	weiblich	160	55,0	21,48		sonst. CA	nein
67	78	weiblich	172	62,6	21,16	sonstiger	Gastritis	
68	73	weiblich	163	68,0	25,59	Hauptschule	sonst. CA	ja
69	24	weiblich	165	53,0	19,47	Hauptschule	Kontrolle	nein
70	63	männlich	176	85,0	27,44	Studium	EAC	ja
71	66	weiblich	168	59,0	20,90	Hochschulreife	GERD	ja
72	61	männlich	168	88,0	31,18	Hauptschule	Kontrolle	ja
73	60	weiblich	168	62,0	21,97	Hochschulreife	Kontrolle	ja
74	66	weiblich	170	77,0	26,64		ESCC	ja
75	46	weiblich	155	70,0	29,14	Studium	Gastritis	
76	61	weiblich	163	63,0	23,71		Kontrolle	
77	71	weiblich	160	58,0	22,66		sonst. CA	nein
78	64	weiblich	158	55,1	22,07	sonstiger	sonst. CA	nein
79	71	männlich	175	77,0	25,14	Hochschulreife	Kontrolle	ja
80	50	männlich	173	68,0	22,72	Hauptschule	sonst. CA	nein
81	28	weiblich	164	63,0	23,42	Mittlere Reife	Kontrolle	nein
82	48	weiblich	162	67,0	25,53	Hochschulreife	GERD	ja
83	68	weiblich	164	85,0	31,60	Mittlere Reife	Barrett	ja
84	26	weiblich	175	95,0	31,02	Mittlere Reife	Kontrolle	nein
85	47	männlich	170	66,0	22,84	Studium	GERD	ja
86	68	männlich					ESCC	nein
87	48	männlich	186	97,0	28,04	Studium	Reflux	ja
88	75	weiblich	158	70,0	28,04		sonst. CA	ja
89	45	weiblich				sonstiger	Kontrolle	ja
90	63	männlich	180	117,0	36,11	Hauptschule	EAC	nein
91	59	männlich	181	83,0	25,34	Studium	GERD	ja
92	41	weiblich	177	63,0	20,11	Studium	Kontrolle	ja
93	28	männlich	190	107,0	29,64	Mittlere Reife	GERD	ja
94	75	männlich	176	90,0	29,05		EAC	nein
95	37	weiblich	170	74,0	25,61	Mittlere Reife	Kontrolle	nein
96	67	weiblich	160	56,0	21,87	Hauptschule	Kontrolle	ja
97	54	männlich	168	68,5	24,27		ESCC	nein
98	59	männlich	175	64,0	20,90		ESCC	nein

Tabelle A-2: Ernährungs- und Trinkgewohnheiten (TV: Trinkvolumen; ZM: Zwischenmahlzeiten)

Nr.	ZM	Verzehrge- schwindigkeit	tägl. TV [L]	scharfes Essen	[Tassen/Tag]			Alkohol
					Kaffee	Tee schwarz	Tee grün	
7	ja	normal	1,0	häufig	2,0	2,0	0,0	regelmäßig
8	ja	normal	2,5	nie	4,0	0,0	3,0	unregelmäßig
9	ja	langsam	3,5	gelegentlich	0,0	3,5	1,0	unregelmäßig
10	nein	normal	1,75	nie	2,0	0,0	0,0	unregelmäßig
11	ja	normal	3,0	gelegentlich	1,0	1,0	0,0	unregelmäßig
12	nein	normal	1,0	nie	0,0	0,0	0,0	unregelmäßig
13	ja	normal	1,5	gelegentlich				unregelmäßig
14	nein	normal	1,0	gelegentlich	1,0	2,0	0,0	unregelmäßig
15	nein	hastig	2,0	gelegentlich	6,0	0,0	0,0	regelmäßig
16	ja	langsam	2,0	selten	1,0	2,5	0,0	unregelmäßig
17	ja	normal	0,75	gelegentlich	1,0	0,0	0,0	unregelmäßig
18	nein	normal	3,0	gelegentlich	3,0	0,0	0,0	regelmäßig
19	ja	langsam	2,5	gelegentlich	0,0	2,0	0,0	regelmäßig
20	ja	hastig	1,5	gelegentlich	0,0	0,0	0,0	regelmäßig
21	nein	normal	2,0	selten	2,0	0,0	0,0	unregelmäßig
22	ja	normal	1,75	selten				unregelmäßig
23	ja	normal	1,5	nie	0,0	0,0	0,0	unregelmäßig
24	nein	langsam	2,0	gelegentlich	3,5	0,0	0,0	unregelmäßig
25	nein	normal	3,0	gelegentlich	1,0	0,0	0,0	regelmäßig
26	ja	hastig	1,0	gelegentlich	5,0	0,0	0,0	unregelmäßig
27	nein	normal	1,25	gelegentlich	0,0	5,5	0,0	regelmäßig
28	nein	normal	1,5	selten	1,5	1,0	0,0	unregelmäßig
29	ja	normal	3,0	gelegentlich	1,0	0,0	0,0	regelmäßig
30	nein	langsam	2,0	gelegentlich	0,0	5,0	0,0	regelmäßig
31	nein	langsam	2,0	selten	2,0	0,0	0,0	regelmäßig
32	nein	normal	1,5	gelegentlich	1,5	0,0	0,0	regelmäßig
33	nein	normal	1,75	selten	1,0	0,0	0,0	unregelmäßig
34	nein	langsam	2,0	selten				regelmäßig
35	ja	normal	3,0	selten	2,0	3,0	0,0	unregelmäßig
36	nein	hastig	1,0	gelegentlich	4,0	0,0	0,0	regelmäßig
37	ja	normal	2,0	gelegentlich	0,0	3,0	0,0	regelmäßig
38	nein	normal	2,0	gelegentlich	2,0	0,0	0,0	regelmäßig
39	ja	normal	2,0	gelegentlich	0,0	0,0	3,0	regelmäßig
40	nein	langsam	1,0	nie	2,0	0,0	0,0	unregelmäßig
41	ja	hastig	1,5	häufig	2,0	0,0	2,0	regelmäßig
42	ja	normal	1,0	gelegentlich	1,0	0,0	1,0	unregelmäßig
43	ja	hastig	1,0	nie	0,0	0,0	2,0	unregelmäßig
44		normal	2,0	selten	1,0	2,5	0,0	unregelmäßig
45	ja	normal	1,5	gelegentlich	1,0	0,0	0,0	regelmäßig
46	nein	normal	2,0	gelegentlich	4,0	0,0	0,0	unregelmäßig
47	ja	normal	2,75	selten	5,0	0,0	0,0	unregelmäßig
48	nein	langsam	1,75	gelegentlich	1,0	0,0	6,0	regelmäßig
49	ja	langsam	3,5	gelegentlich	2,0	2,0	0,0	regelmäßig
50	nein	normal	1,0	selten	3,0	0,0	0,0	unregelmäßig
51	ja	normal	2,0	gelegentlich	2,0	0,0	0,0	unregelmäßig
52	ja	hastig	2,0	selten	3,5	0,0	0,0	unregelmäßig



Forts. Tabelle A-2: Ernährungs- und Trinkgewohnheiten

Nr.	ZM	Verzehrge- schwindigkeit	tägl. TV [L]	scharfes Essen	[Tassen/Tag]			Alkohol
					Kaffee	Tee schwarz	Tee grün	
53	nein	normal	2,0	gelegentlich	2,0	0,0	0,0	unregelmäßig
54	nein	normal	2,25	häufig	4,5	0,0	0,0	unregelmäßig
55	nein	normal	2,5	selten	4,0	0,0	0,0	unregelmäßig
56	nein	normal	1,75	gelegentlich	3,0	0,0	0,0	regelmäßig
57	nein	normal	4,0	selten				regelmäßig
58	ja	langsam	1,0	gelegentlich				unregelmäßig
59	nein	hastig	4,0	gelegentlich	0,0	3,0	0,0	unregelmäßig
60	nein	normal	1,0	selten	3,0	0,0	0,0	unregelmäßig
61	ja	normal	1,0	selten	1,5	1,0	1,5	regelmäßig
62	ja	normal	2,0	nie	1,0	0,0	0,0	unregelmäßig
63	nein	normal	1,5	nie	0,0	0,0	0,0	unregelmäßig
64	ja	normal	3,0	selten	0,0	1,0	0,0	unregelmäßig
65	ja	hastig		selten	0,0	0,0	1,0	unregelmäßig
66	ja	normal	2,0	nie	1,0	0,0	1,0	unregelmäßig
67		normal	2,25	nie	0,0	4,0	4,0	unregelmäßig
68	nein	normal	2,0	selten	2,5	0,0	0,0	unregelmäßig
69	ja	normal	1,5	nie	0,0	0,0	0,0	unregelmäßig
70	ja	normal	2,0	gelegentlich	3,0	0,0	0,0	regelmäßig
71	nein	normal	2,25	gelegentlich	1,0	0,0	0,0	regelmäßig
72	ja	normal	2,5	selten	2,0	0,0	0,0	unregelmäßig
73	nein	langsam	3,5	gelegentlich	0,0	4,5	0,0	unregelmäßig
74	nein	hastig	2,0	häufig	4,0	0,0	4,5	unregelmäßig
75	ja	normal	1,25	häufig	0,0	0,0	5,0	unregelmäßig
76	ja	normal	1,75	gelegentlich	3,0	0,0	0,0	unregelmäßig
77	nein	langsam		nie				unregelmäßig
78	nein	langsam	2,25	nie	2,0	2,0	0,0	unregelmäßig
79	nein	normal	1,0	selten	1,0	1,0	0,0	unregelmäßig
80	ja	normal	2,0	selten	4,0	0,0	0,0	regelmäßig
81	ja	normal	3,0	selten	4,0	0,0	0,0	unregelmäßig
82	nein	normal	2,0	gelegentlich	2,0	0,0	0,0	regelmäßig
83	nein	normal	1,0	selten	3,0	0,0	0,0	unregelmäßig
84	ja	normal	2,5	gelegentlich	2,0	0,0	0,0	unregelmäßig
85	ja	normal	2,0	nie	3,0	0,0	0,0	regelmäßig
86		normal	1,5	gelegentlich				regelmäßig
87	nein	normal	2,0	häufig	2,0	0,0	10,0	regelmäßig
88	nein	normal	1,5	gelegentlich	2,0	0,0	0,0	unregelmäßig
89	ja	normal	1,5	selten	3,0	0,0	0,0	unregelmäßig
90	nein	normal	2,5	selten	0,0	0,0	2,0	unregelmäßig
91	nein	normal	3,5	selten	1,0	0,0	0,0	unregelmäßig
92	ja	normal	4,0	selten	0,0	0,0	0,0	unregelmäßig
93	ja	hastig	2,0	selten	0,0	0,0	0,0	regelmäßig
94	ja	normal	2,0	nie	1,5	0,0	0,0	unregelmäßig
95	nein	normal	3,0	selten	2,0	0,0	0,0	regelmäßig
96	nein	normal	2,0	selten	2,0	0,0	1,0	unregelmäßig
97	nein	langsam	1,0	selten	4,0	0,0	0,0	unregelmäßig
98	nein	hastig	2,5	selten				regelmäßig

Tabelle A-3: Spezielle Bestandteile der Ernährung (m.W.: mehrmals die Woche)

Nr.	Fleisch	Wurst	Geräucher-tes	Fisch	Obst/Gemüse	Süßwaren	Schoko- lade	Nüsse	Milch
7	selten	m.W.	m.W.	selten	täglich	selten	selten	m.W.	selten
8	selten	selten	selten	m.W.	m.W.	nie	m.W.	nie	täglich
9	m.W.	m.W.	selten	selten	täglich	nie	m.W.	m.W.	täglich
10	m.W.	selten	selten	m.W.	täglich	selten	selten	selten	m.W.
11	täglich	m.W.	täglich	selten	täglich	selten	selten	nie	m.W.
12	täglich	täglich	m.W.	selten	selten	nie	m.W.	nie	täglich
13	m.W.	selten	selten	m.W.	m.W.	nie	m.W.	nie	täglich
14	m.W.	m.W.	selten	selten	m.W.	selten	selten	selten	täglich
15	selten	selten	selten	selten	m.W.	selten	selten	selten	m.W.
16	selten	selten	nie	m.W.	täglich	nie	täglich	m.W.	selten
17	m.W.	selten	selten	m.W.	m.W.	selten	täglich	selten	täglich
18	m.W.	m.W.	selten	selten	selten	m.W.	selten	selten	m.W.
19	selten	selten	selten	m.W.	täglich	selten	täglich	m.W.	m.W.
20	täglich	täglich	selten	m.W.	täglich	selten	m.W.	selten	selten
21	selten	selten	selten	m.W.	täglich	selten	m.W.	selten	m.W.
22	m.W.	m.W.	selten	selten	selten	selten	selten	nie	täglich
23	selten	m.W.	selten	m.W.	selten	selten	selten	selten	selten
24	m.W.	selten	selten	selten	m.W.	m.W.	m.W.	selten	m.W.
25	m.W.	m.W.	selten	selten	m.W.	selten	selten	selten	selten
26	selten	täglich	selten	selten	täglich	nie	täglich	nie	m.W.
27	täglich	m.W.	m.W.	selten	m.W.	selten	selten	selten	selten
28	täglich	selten	selten	selten	m.W.	nie	selten	selten	nie
29	m.W.	täglich	selten	selten	selten	m.W.	täglich	selten	täglich
30	m.W.	täglich	selten	m.W.	täglich	nie	selten	selten	
31	selten	selten	selten	m.W.	m.W.	nie	selten	m.W.	täglich
32	täglich	täglich	täglich	m.W.	täglich	nie	nie	selten	täglich
33	selten	selten	nie	m.W.	selten	selten	m.W.	selten	täglich
34	selten	m.W.	selten	m.W.	selten	nie	m.W.	nie	nie
35	nie	nie	selten	m.W.	täglich	selten	selten	selten	m.W.
36	täglich	täglich	täglich	m.W.	täglich	nie	selten	nie	täglich
37	m.W.	täglich	selten	selten	selten	m.W.	m.W.	selten	selten
38	m.W.	täglich	selten	selten	m.W.	nie	selten	nie	nie
39	m.W.	m.W.	nie	m.W.	täglich	selten	m.W.	m.W.	täglich
40	m.W.	nie	selten	m.W.	m.W.	selten	selten	selten	m.W.
41	selten	selten	selten	selten	täglich	selten	selten	m.W.	täglich
42	m.W.	m.W.	selten	m.W.	m.W.	selten	selten	selten	m.W.
43	m.W.	m.W.	selten	m.W.	m.W.	selten	m.W.	m.W.	m.W.
44	m.W.	m.W.	m.W.	m.W.	m.W.	nie	selten	selten	m.W.
45	m.W.	selten	selten	selten	selten	selten	selten	selten	selten
46	m.W.	selten	selten	m.W.	m.W.	m.W.	selten	selten	m.W.
47	m.W.	täglich	nie	m.W.	m.W.	nie	selten	selten	täglich
48	selten	m.W.	m.W.	selten	m.W.	selten	selten	selten	m.W.
49	m.W.	m.W.	selten	selten	m.W.	m.W.	m.W.	selten	selten
50	m.W.	selten	selten	selten	m.W.	nie	selten	selten	täglich
51	m.W.	m.W.	selten	selten	täglich	selten	selten	selten	m.W.
52	selten	selten	selten	selten	täglich	selten	m.W.	selten	täglich

Forts. Tabelle A-3: Spezielle Bestandteile der Ernährung (m.W.: mehrmals die Woche)

Nr.	Fleisch	Wurst	Geräucher-tes	Fisch	Obst/Gemüse	Süßwaren	Schoko-lade	Nüsse	Milch
53	selten	m.W.	selten	m.W.	m.W.	selten	selten	selten	täglich
54	m.W.	täglich	selten	m.W.	m.W.	selten	selten	selten	selten
55	täglich	m.W.	selten	m.W.	m.W.	selten	selten	selten	m.W.
56	selten	m.W.	selten	selten	m.W.	m.W.	m.W.	selten	m.W.
57	m.W.	täglich	selten	selten	täglich	selten	selten	selten	nie
58	selten	m.W.	m.W.	selten	m.W.	m.W.	selten	selten	selten
59	m.W.	m.W.	selten	selten	täglich	m.W.	selten	selten	m.W.
60	m.W.	m.W.	selten	selten	m.W.	selten	m.W.	nie	m.W.
61	täglich	täglich	m.W.	m.W.	täglich	selten	m.W.	selten	selten
62	m.W.	täglich	selten	selten	m.W.	selten	m.W.	nie	selten
63	täglich	nie	selten	selten	täglich	nie	m.W.	m.W.	täglich
64	täglich	m.W.	selten	selten	täglich	selten	selten	nie	m.W.
65	selten	nie	nie	selten	m.W.	selten	selten	selten	täglich
66	m.W.	m.W.	selten	selten	m.W.	selten	m.W.	selten	m.W.
67	m.W.	m.W.	selten	m.W.	m.W.	nie	täglich	selten	täglich
68	selten	selten	selten	m.W.	täglich	m.W.	m.W.	m.W.	täglich
69	selten	m.W.	selten	selten	selten	täglich	m.W.	selten	täglich
70	m.W.	m.W.	selten	selten	m.W.	selten	m.W.	täglich	täglich
71	selten	selten	selten	m.W.	täglich	nie	selten	täglich	täglich
72	m.W.	m.W.	selten	selten	täglich	selten	selten	selten	selten
73	selten	nie	selten	m.W.	täglich	selten	selten	m.W.	täglich
74	m.W.	m.W.	m.W.	m.W.	täglich	nie	nie	selten	täglich
75	m.W.	selten	selten	m.W.	täglich	m.W.	m.W.	m.W.	täglich
76	m.W.	m.W.	selten	selten	täglich	selten	m.W.	selten	m.W.
77	nie	selten	nie	selten	nie	nie	nie	nie	nie
78	nie	nie	nie	nie	nie	selten	selten	nie	täglich
79	täglich	selten	selten	selten	m.W.	nie	selten	selten	selten
80	m.W.	m.W.	selten	m.W.	selten	m.W.	täglich	selten	selten
81	m.W.	m.W.	selten	selten	täglich	selten	täglich	nie	täglich
82	selten	selten	selten	selten	m.W.	m.W.	selten	selten	m.W.
83	selten	täglich	selten	m.W.	täglich	nie	selten	selten	täglich
84	selten	nie	nie	selten	täglich	m.W.	täglich	m.W.	täglich
85	täglich	täglich	m.W.	m.W.	m.W.	selten	selten	selten	selten
86	m.W.	m.W.	selten	selten	selten	selten	selten	selten	m.W.
87	täglich	täglich	selten	selten	täglich	selten	nie	selten	selten
88	m.W.	m.W.	selten	selten	m.W.	nie	selten	nie	m.W.
89	m.W.	m.W.	selten	m.W.	selten	selten	selten	nie	täglich
90	m.W.	m.W.	m.W.	selten	m.W.	selten	selten	selten	selten
91	m.W.	täglich	selten	selten	täglich	selten	m.W.	selten	täglich
92	m.W.	nie	selten	selten	täglich	m.W.	m.W.	selten	m.W.
93	m.W.	m.W.	selten	selten	m.W.	selten	m.W.	selten	m.W.
94	m.W.	täglich	m.W.	m.W.	täglich	selten	selten	selten	täglich
95	m.W.	selten	selten	selten	täglich	selten	täglich	m.W.	täglich
96	m.W.	selten	nie	selten	täglich	nie	selten	selten	täglich
97	m.W.	m.W.	m.W.	selten	täglich	nie	täglich	nie	selten
98	nie	nie	nie	selten	täglich	nie	selten	m.W.	nie

Tabelle A-4: HPB-Addukte, Myosmin- und Cotininkonzentration und Rauchstatus

Nr.	HPB [pmol/mg DNA]		Myosmin [pg/ml]	Cotinin [ng/ml]	Rauchstatus	
	oral	aboral			Fragebogen	akut
7	43,84	0,33			Raucher	ja
8	1,21	2,02			Raucher	ja
9	0,00	5,81			Nichtraucher	nein
10	5,27	1,06			Nichtraucher	nein
11	2,48	20,20			Raucher	ja
12	0,00	0,46			Raucher	ja
13	0,27	0,00			Nichtraucher	nein
14	0,00	0,43	666	51,9	Ex-Raucher	ja
15	0,46	0,00	547	53,5	Ex-Raucher	ja
16	0,25	0,26	366	1,2	Ex-Raucher	nein
17	2,58	0,00	149	0,0	Nichtraucher	nein
18	0,00	0,00	991	78,5	Raucher	ja
19	0,00	0,00	259	42,7	Nichtraucher	ja
20	0,33	0,00	352	0,0	Nichtraucher	nein
21	0,26	0,00	235	0,0	Nichtraucher	nein
22			353	0,0	Nichtraucher	nein
23			401	0,0	Nichtraucher	nein
24			363	35,9	Nichtraucher	ja
25			604	0,0	Nichtraucher	nein
26			348	0,0	Ex-Raucher	nein
27			442	0,0	Nichtraucher	nein
28			584	0,0	Nichtraucher	nein
29			351	0,0	Ex-Raucher	nein
30	7,44	3,34	461	13,7	Ex-Raucher	nein
31	2,83	4,23	343	0,0	Nichtraucher	nein
32	7,58	3,53	400	66,2	Raucher	ja
33	7,33	3,86	375	0,0	Nichtraucher	nein
34	41,66	9,10	323	0,0	Nichtraucher	nein
35	4,09	4,92	479	0,0	Ex-Raucher	nein
36	9,24	3,43	371	0,0	Ex-Raucher	nein
37	4,29	3,44	560	0,0	Nichtraucher	nein
38	4,41	4,55	1413	42,7	Raucher	ja
39	9,34	1,14	572	0,0	Nichtraucher	nein
40	1,32	1,06	51	0,0	Nichtraucher	nein
41	1,54	2,48	37	0,0	Nichtraucher	nein
42	0,58	1,42	44	56,4	Raucher	ja
43	2,51	2,54	32	10,4	Ex-Raucher	nein
44	0,93	0,92	46	0,0	Nichtraucher	nein
45		0,55	54	154,3	Raucher	ja
46	1,32	1,89	56	0,0	Ex-Raucher	nein
47	0,00	0,00	6	0,0	Nichtraucher	nein
48	0,99	0,00	51	0,0	Ex-Raucher	nein
49		2,25	53	0,0	Ex-Raucher	nein
50	4,13	0,00	169	57,4	Raucher	ja
51	1,69	2,57	0	0,0	Nichtraucher	nein
52	6,61	0,67	47	0,0	Nichtraucher	nein

Forts. Tabelle A-4: HPB-Addukte, Myosmin- und Cotininkonzentration und Rauchstatus

Nr.	HPB [pmol/mg DNA]		Myosmin [pg/ml]	Cotin [ng/ml]	Rauchstatus	
	oral	aboral			Fragebogen	akut
53	0,00	0,80	48	0,0	Nichtraucher	nein
54	6,03	11,41	7	0,0	Raucher	ja
55	4,96	36,98	170	44,4	Raucher	ja
56	32,40	7,47			Nichtraucher	nein
57	5,53	4,63	57	0,0	Nichtraucher	nein
58	19,07	72,93	731	60,8	Raucher	ja
59	7,44	7,23	49	1,4	Nichtraucher	nein
60	5,56	58,69	11	9,1	Raucher	ja
61	3,02		0	1,4	Raucher	na
62	0,00	0,00	15	121,7	Raucher	ja
63	3,08	2,57	214	0,7	Nichtraucher	nein
64	3,52	2,90	12	0,0	Nichtraucher	nein
65	3,84	2,05	7	0,0	Nichtraucher	nein
66	3,56	2,45	27	0,0	Nichtraucher	nein
67	2,86	4,88	0	0,0	Nichtraucher	nein
68	24,33	0,82	0	0,0	Nichtraucher	nein
69	4,15	3,50	0	59,4	Raucher	ja
70	6,42	4,68	33	0,0	Ex-Raucher	nein
71	7,54	3,61	0	0,0	Ex-Raucher	nein
72	6,82	5,13	22	0,0	Nichtraucher	nein
73	19,14	6,09	0	31,2	Raucher	ja
74	20,10	17,19	0	0,0	Nichtraucher	nein
75	8,18	1,44	0	0,0	Nichtraucher	nein
76	0,00	0,00	0	5,5	Nichtraucher	nein
77	1,06	0,00	0	3,9	Nichtraucher	nein
78	0,78	0,22	350	62,5	Raucher	ja
79	0,00	1,95	39	6,2	Nichtraucher	nein
80	1,83	3,79	254	54,1	Raucher	ja
81	1,81	2,19	84	55,7	Raucher	ja
82	0,63	0,00	49	48,2	Raucher	ja
83	0,18	0,00	3	0,0	Nichtraucher	nein
84	0,00	1,69	14	0,0	Ex-Raucher	nein
85	1,41	0,51	6	0,0	Nichtraucher	nein
86	0,51	0,70	34	0,0	Nichtraucher	nein
87	0,00	0,00	110	49,7	Raucher	ja
88	1,57	0,00	48	0,0	Nichtraucher	nein
89	0,28	0,32	48	36,1	Raucher	ja
90	0,00	0,55	107	36,5	Ex-Raucher	ja
91	0,00	1,10	40	6,6	Nichtraucher	nein
92	4,76	1,83	93	43,0	Raucher	ja
93	14,50	2,10	3	0,0	Nichtraucher	nein
94	0,81	0,30	0	0,0	Raucher	ja
95	4,42	0,81	225	0,0	Nichtraucher	nein
96	2,81	0,94	137	0,0	Ex-Raucher	nein
97	0,26	1,89	118	0,0	Ex-Raucher	nein
98	1,06	2,09	190	0,0	Ex-Raucher	nein

## Danksagung

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

Ganz besonders herzlich danke ich meinem Betreuer Herrn Professor Dr. Elmar Richter für die permanente großzügige Unterstützung, die jederzeit gewährte freundliche Anleitung sowie für die vielen wertvollen Anregungen und die große Hilfestellung in fachlichen Fragen und die Möglichkeit an dem Princess Chulabhorn International Science Congress in Bangkok und der AACR-Tagung in San Diego teilzunehmen.

Auch danke ich Herrn Professor Dr. Eyer, Herrn Professor Dr. Richter als kommissarische Leiter und Herrn Professor Dr. Gudermann als neuem Vorstand des Walther-Straub-Instituts für die Überlassung des Arbeitsplatzes

Für die Bereitstellung der Biopsie- und Blutproben danke ich Herrn Prof. Dr. Stadlhuber der chirurgischen Klinik der Paracelsus-Universität Salzburg und dem Klinikpersonal des Klinikums rechts der Isar der Technischen-Universität München.

Herrn Manuel Maier sage ich danke für die kompetente Einarbeitung an den GC/MS-Geräten und in die wissenschaftliche Arbeitsweise, Herrn Lang, Herrn Grau und Frau Biermann der SMS GmbH, die mir stets mit Rat und Tat bei der Betreuung der Geräte zur Seite standen.

Bei Frau Schütte-Borcovec und Frau Mayerhofer möchte ich mich für die Hilfe bei der Aufarbeitung der Plasmaproben bedanken. Ein großer Dank gilt auch Frau Anne-Kathrin Heling, die von Beginn an die Leiden der instrumentellen Analytik mit mir geteilt hat.

Insgesamt danke ich dem kompletten Team des Arbeitskreises, das mich sehr freundlich aufgenommen und immer unterstützt hat.

Der größte Dank allerdings gilt meinen Freunden und vor allem meiner Familie, die immer für mich da waren und bei denen ich allen Frust und Ärger abladen konnte. Sie haben mir erst ermöglicht den Weg zu gehen, den ich gegangen bin.

## Lebenslauf

Name: Heppel  
Vorname: Christopher  
Geburtsdatum: 12. Juni 1980  
Geburtsort: Würzburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulischer und beruflicher Werdegang:

1987-91 Eichendorff Grundschule, Gerbrunn

1991–2000 Schönborn Gymnasium, Würzburg

Abschluss mit dem Abitur

2000-2004 Studium der Lebensmittelchemie an der Julius-  
Maximilians-Universität Würzburg

Oktober 2002 Vorexamen

November 2004 1. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker

Seit Januar 2005 Doktorand am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie der Medizinischen Fakultät München,  
Betreuer : Prof. Dr. E. Richter