

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

---

**Abhängigkeit von Addukten tabakspezifischer Nitrosamine in der  
Mundschleimhaut des Menschen von verschiedenen  
Genussformen des Tabaks, ihre Beeinflussung durch Ernährung,  
Alkohol und Chemopräventiva und die Überprüfung der Effekte  
an der Ratte**

---

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

von  
Anne-Kathrin Heling  
aus  
Weimar

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Elmar Richter

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Elisabeth Mützel  
Prof. Dr. Holger Schulz

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

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2009

*Meinen Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	V
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Krebserkrankungen .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Krebserkrankungen der Lippe, Mundhöhle und des Pharynx .....	3
1.1.2.1 Anatomie .....	3
1.1.2.2 Krebserkrankungen im Bereich von Mundhöhle und Rachen in Deutschland.....	4
1.1.2.3 Krebserkrankungen des Mund-Rachen Raumes in Schweden .....	7
1.1.3 Entstehung von Krebserkrankungen.....	8
1.2 Inhaltsstoffe des Tabakrauchs .....	11
1.2.1 Nitrosamine .....	11
1.2.2 Tabakspezifische Nitrosamine (TSNA) .....	12
1.2.3 Tabakalkaloide .....	16
1.2.3.1 Nicotin.....	17
1.2.3.2 Myosmin.....	19
1.2.3.3 Cotinin.....	22
1.3 Schwedischer rauchfreier Tabak – Snus.....	24
1.3.1 Herstellung .....	24
1.3.2 Nicotinfreisetzung aus Snus .....	25
1.3.3 Pro und Contra der Anwendung von Snus im Vergleich zum Rauchen .....	26
1.3.3.1 Veränderungen in der Mundhöhle.....	26
1.3.3.2 Andere Krebserkrankungen.....	27
1.3.3.3 Weitere Erkrankungen.....	28
1.4 Biomonitoring .....	29
1.4.1 32P-Postlabelling.....	30
1.4.2 Immunoassays .....	30
1.4.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie .....	30
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	33
<b>2 Material und Methoden</b> .....	34
2.1 Material .....	34
2.1.1 Geräte .....	34
2.1.2 Materialien .....	35
2.1.3 Chemikalien .....	36
2.1.4 Lösungen und Reagenzien.....	36
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Bestimmung HPB-freisetzender Addukte in Tierstudien.....	38
2.2.1.1 Vorversuch zur Dosisfindung für die NNK-Belastung .....	38
2.2.1.2 Interaktion von NNK und Ethanol .....	39

2.2.1.3	Chemopräventionsstudie: Einfluss von Antioxidantien auf die DNA-Adduktbildung durch NNK und ihre Modulation durch Ethanol.....	39
2.2.2	Einfluss von Rauchen und Snusen auf HPB-freisetzung DNA-Addukten in humaner Mundschleimhaut .....	40
2.2.2.1	Gewinnung der Proben aus oraler Mucosa.....	41
2.2.2.2	Isolierung der DNA aus oralen Mucosazellen.....	41
2.2.2.3	Bestimmung der DNA-Konzentration mittels UV/VIS-Spektrometrie.....	42
2.2.2.4	Saure Hydrolyse und Aufreinigung des Addukts.....	42
2.2.2.5	Derivatisierung von HPB .....	43
2.2.2.6	Speichelproben .....	43
2.2.2.7	Zehennagelproben .....	44
2.3	GC-MS Analysen .....	45
2.3.1	Chromatographische Bedingungen .....	45
2.3.1.1	Gaschromatograph-Massenspektrometer QMD 1000 .....	45
2.3.1.2	Gaschromatograph-Massenspektrometer VG Autospec M 299 .....	46
2.3.1.3	Berechnung des Gehalts an HPB.....	46
2.3.1.4	Gaschromatograph-Massenspektrometer TRIO 1000 .....	47
2.3.2	Validierung der Methoden.....	47
2.3.2.1	Kalibrierkurven und Nachweisgrenzen.....	47
2.3.2.2	Präzision und Genauigkeit.....	47
2.3.2.3	Wiederfindung.....	48
2.3.2.4	Datenverarbeitung .....	48
2.3.3	Statistik.....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
3.1	Analytik.....	50
3.1.1	Identifizierung der Tabakalkaloide Cotinin, Myosmin und Nicotin .....	50
3.1.1.1	Fragmentierung von Cotinin .....	50
3.1.1.2	Fragmentierung von Myosmin .....	50
3.1.1.3	Fragmentierung von Nicotin .....	51
3.1.2	Validierung der Methode zur Bestimmung der Tabakalkaloide in Speichel, Plasma und Zehennägeln .....	52
3.1.3	Identifizierung von HPB .....	52
3.1.4	Validierung der Methode zur Bestimmung HPB-freisetzung DNA-Addukten.....	53
3.1.4.1	Kalibrierkurven und Nachweisgrenzen .....	53
3.1.4.2	Präzision und Genauigkeit.....	54
3.1.4.3	Wiederfindung.....	54
3.2	Tierstudien.....	55
3.2.1	Vorversuch zur Dosisfindung für die NNK-Belastung .....	55
3.2.2	Interaktion von NNK und Ethanol im Tierversuch .....	57
3.2.3	Chemopräventionsstudie: Einfluss von Antioxidantien auf die DNA-Adduktbildung durch NNK und ihre Modulation durch Ethanol.....	61

3.3	Ergebnisse der Humanstudie .....	67
3.3.1	Einteilung der Probanden .....	67
3.3.2	Bestimmung von Tabakalkaloiden in Speichel und Plasma.....	69
3.3.3	Konzentration von Myosmin, Nicotin und Cotinin in Zehennägeln .....	72
3.3.4	Bestimmung der HPB-freisetzen DNA-Addukte .....	75
3.3.5	Auswertung der DNA-Addukte.....	76
3.3.5.1	HPB-Addukte in Abhängigkeit von Rauchstatus, Alter und Geschlecht .....	77
3.3.5.2	Ernährungsgewohnheiten .....	80
3.3.5.3	Trinkverhalten .....	89
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>93</b>
4.1	Tierstudien.....	93
4.1.1	Interaktion von NNK und Ethanol .....	94
4.1.2	Chemopräventionsstudie .....	96
4.2	Humanstudien.....	100
4.2.1	Cotinin und Myosmin im Speichel.....	100
4.2.2	Cotinin, Nicotin und Myosmin im Plasma.....	101
4.2.3	Cotinin, Myosmin und Nicotin in Zehennägeln .....	102
4.2.4	HPB-freisetzen DNA-Addukte in oraler Mucosa in Abhängigkeit von Tabakgenuss, Geschlecht und Alter .....	103
4.2.5	Andere Einflussfaktoren für DNA-Addukte in der Mundschleimhaut .....	106
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>109</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>112</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>131</b>





## Abkürzungen

<i>AUC</i>	<i>Area under the Curve</i>
<i>BMI</i>	<i>Body Mass Index, [kg/m<sup>2</sup>]</i>
<i>CP</i>	<i>Chlorophyllin</i>
<i>CI</i>	<i>Chemische Ionisation</i>
<i>95%-CI</i>	<i>95% Confidence interval, Konfidenzintervall, Vertrauensbereich</i>
<i>COT</i>	<i>Cotinin</i>
<i>CPS I, CPS II</i>	<i>Cancer Prevention Study I (1959) und II (1982)</i>
<i>CYP</i>	<i>Cytochrom P450</i>
<i>Da</i>	<i>Dalton</i>
<i>DKFZ</i>	<i>Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>EA</i>	<i>Ellagsäure</i>
<i>EI</i>	<i>Elektronenstoß-Ionisation</i>
<i>EtOH</i>	<i>Ethanol</i>
<i>ETS</i>	<i>Environmental tobacco smoke, Passivrauch</i>
<i>eV</i>	<i>Elektronenvolt</i>
<i>GC</i>	<i>Gaschromatographie</i>
<i>h</i>	<i>Stunde</i>
<i>Hb</i>	<i>Hämoglobin</i>
<i>HPB</i>	<i>4-Hydroxy-(3-pyridyl)-1-butanon</i>
<i>HPV</i>	<i>Humanes Papillomavirus</i>
<i>HS</i>	<i>Hauptstromrauch</i>
<i>IARC</i>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<i>IOM</i>	<i>Institute of Medicine, Washington, USA</i>
<i>ICD</i>	<i>International Classification of Diseases</i>
<i>ID</i>	<i>Innendurchmesser</i>
<i>ISTD</i>	<i>Interner Standard</i>
<i>KHK</i>	<i>Koronare Herzkrankheit</i>
<i>LOD</i>	<i>Limit of detection, Nachweisgrenze</i>
<i>LOQ</i>	<i>Limit of quantification, Bestimmungsgrenze</i>
<i>min</i>	<i>Minute</i>
<i>MONICA</i>	<i>Multinational Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease</i>
<i>MS</i>	<i>Massenspektrometrie</i>
<i>m/z</i>	<i>Masse-zu-Ladungsverhältnis</i>
<i>MW</i>	<i>Mittelwert</i>

<i>n</i>	<i>Anzahl</i>
<i>N.</i>	<i>Nervus, der Nerv</i>
<i>NDEA</i>	<i>N-Nitrosodiethylamin</i>
<i>NDMA</i>	<i>N-Nitrosodimethylamin</i>
<i>NHANES</i>	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
<i>NIC</i>	<i>Nicotin</i>
<i>NNK</i>	<i>Nicotine-derived nitrosaminoketone, 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanon</i>
<i>NNN</i>	<i>N'-Nitrosoornicotin</i>
<i>OSCC</i>	<i>Oral squamous cell carcinoma, Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle</i>
<i>PFBC</i>	<i>Pentafluorobenzoylchlorid</i>
<i>PSA</i>	<i>Prostata-spezifisches Antigen</i>
<i>r<sup>2</sup></i>	<i>Bestimmtheitsmaß der linearen Regression</i>
<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute</i>
<i>RT</i>	<i>Raumtemperatur</i>
<i>s</i>	<i>Sekunde</i>
<i>S/N</i>	<i>Signal to noise ratio</i>
<i>SD</i>	<i>Standard deviation, Standardabweichung</i>
<i>SE</i>	<i>Standard error, Standardfehler, definiert als <math>SD/\sqrt{n}</math></i>
<i>SIM</i>	<i>Single Ion Monitoring</i>
<i>SIR</i>	<i>Single Ion Recording</i>
<i>TMA</i>	<i>Trimethylamin</i>
<i>TTS</i>	<i>Transdermale Therapeutische Systeme, Pflaster zum Aufkleben auf die Haut mit speziellen Freisetzungssystemen für enthaltene Wirkstoffe</i>
<i>TSNA</i>	<i>Tabak-spezifische Nitrosamine</i>
<i>UV/VIS</i>	<i>Spektralphotometrie mit ultraviolettem und sichtbarem Licht</i>
<i>Vit E</i>	<i>Vitamin E</i>
<i>ZNS</i>	<i>Zentralnervensystem</i>

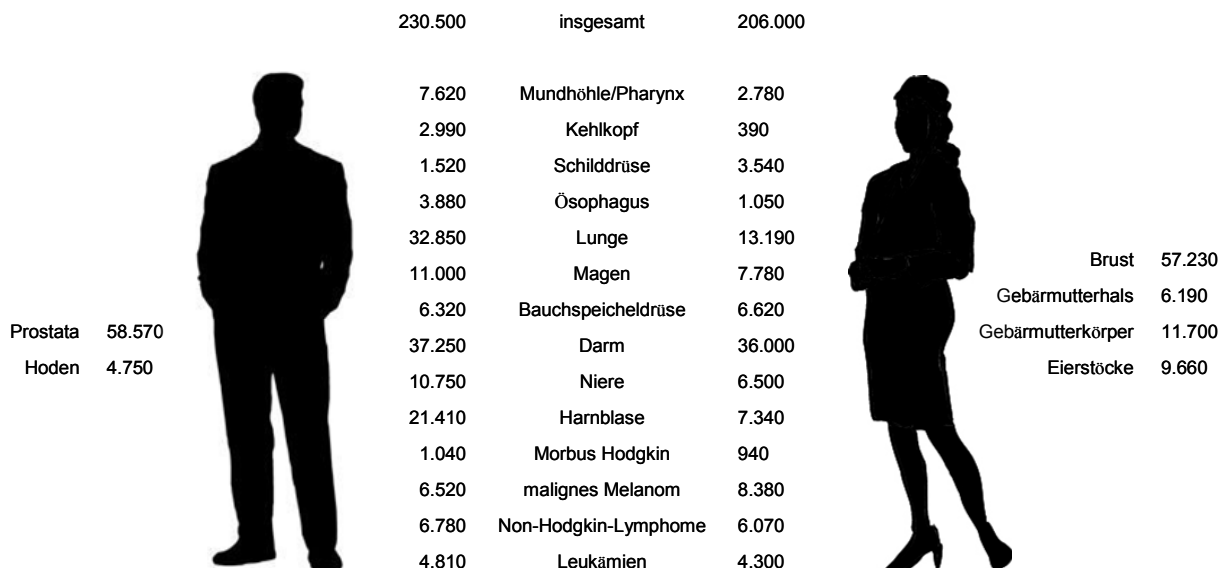
# 1 Einleitung

## 1.1 Krebserkrankungen

### 1.1.1 Epidemiologie

Weltweit erkranken jährlich schätzungsweise 11 Millionen Menschen an Krebs. 7,9 Millionen sterben daran [1]. Aufgrund steigender Lebenserwartung der Menschen und Verschiebung der Alterspyramide werden für das Jahr 2030 bereits 16 Millionen jährliche Neuerkrankungen durch Krebs geschätzt. In Deutschland erkrankten im Jahr 2004 nach Angaben des Robert Koch-Instituts schätzungsweise 436.500 Personen an Krebs, davon 230.500 Männer und 206.000 Frauen [2]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer und Frauen bei 69 Jahren.

Die häufigste Krebserkrankung stellt bei Männern der Prostatakrebs mit 25% dar, gefolgt von Darmkrebs (16%) und Lungenkarzinomen (14%). Wurden im Jahr 2002 noch 48.700 Erkrankungen an Prostatakrebs geschätzt, so waren es 2004 bereits 58.500 Fälle. Diese Zunahme dürfte mit dem vermehrten Einsatz der Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) als Maßnahme zur Früherkennung von Prostatakarzinomen zu erklären sein. Verstärkt in Anspruch genommene Krebsvorsorgeprogramme könnten ebenfalls die Zunahme von Darmkrebs erklären. Im Vergleich zu 2002 wurde eine Zunahme von 1.700 Fällen bei Männern und 200 Fällen bei Frauen verzeichnet.



**Abb. 1–1** Geschätzte Zahl der jährlichen Neuerkrankungen (2004) in der Bundesrepublik Deutschland nach Krebsarten und Geschlecht

In der weiblichen Bevölkerung tritt Brustkrebs mit 28% der Krebserkrankungen vor Darmkrebs (17%) und Lungenkarzinomen (6%) auf (Abb. 1–1). Die Gesamtzahl der Neuerkrankungen an Krebs war im Vergleich zum Jahr 2002 unverändert, es wurden aber mehr Neuerkrankungen der Brust (2.000 Fälle), Schilddrüse (700 Fälle) und Lunge (800 Fälle) verzeichnet. Rückläufig war die Zahl der Neuerkrankungen bei Magenkarzinomen (minus 500 Fälle), Gebärmutterhalskarzinomen (minus 300 Fälle) und Leukämien (minus 500 Fälle).

Nicht alle Krebserkrankungen führen zum Tod, jedoch stellt Krebs weltweit die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems dar. In Deutschland starben im Jahr 2004 insgesamt 209.328 Menschen an Krebs [2]. Das sind 25,6% von insgesamt 818.271 Todesfällen (Tab. 1–1). Das mittlere Sterbealter liegt für Männer bei 71 Jahren und für Frauen bei 75 Jahren.

**Tab. 1–1 Todesursachen in Deutschland im Jahr 2004 nach Anzahl und Prozent [3]**

<b>Todesursache</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent [%]</b>
Kreislaufsystem	368.472	45,0
bösartige Neubildungen (Krebs)	209.328	25,6
Atmungssystem	52.500	6,4
Verdauungssystem	42.213	5,2
Unfälle	14.847	1,8
Suizid	10.733	1,3
Andere	130.911	16,0
Insgesamt	818.271	100

Die relativen 5-Jahresüberlebensraten mit Krebs liegen im Zeitraum von 1994 bis 1998 für Frauen bei 60% und für Männer bei 53%. Damit ergibt sich eine Verbesserung um 2 Prozentpunkte im Vergleich zum vorhergehenden Auswertungszeitraum von 1990 bis 1994.

Die Risikofaktoren für die Entstehung von Krebserkrankungen sind vielfältig. Unter den vermeidbaren Risikofaktoren nimmt das Rauchen, das zwischen einem Viertel und einem Drittel aller Krebstodesfälle verursacht, die größte Bedeutung vor falschen Ernährungsgewohnheiten, Übergewicht und hohem Alkoholkonsum ein. Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung bestimmter Krebserkrankungen sind chronische Infektionen, Expositionen am Arbeitsplatz, Umwelteinflüsse und genetische Prädisposition. Die Bestimmung der Ursache für die individuelle Entwicklung einer Tumorerkrankung ist häufig nicht möglich, da im Laufe eines Lebens die Belastungen in vielfältiger Weise zusammen wirken. Allerdings ist das Rauchen für den Lungenkrebs und die Kombination aus Rauchen und Trinken für Tumoren der oberen Atem- und Verdauungswege mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit verantwortlich zu machen.

## 1.1.2 Krebserkrankungen der Lippe, Mundhöhle und des Pharynx

### 1.1.2.1 Anatomie

An die Cavum oris (Mundhöhle) mit Vestibulum oris (Mundhöhlenvorhof) schließt sich der Pharynx (Rachen) an, dessen unteres Ende in den Ösophagus (Speiseröhre) übergeht und somit den Beginn des Verdauungskanals darstellt (Abb. 1–2). Das Innere der Mundhöhle ist, mit Ausnahme der Zähne, von Schleimhaut mit zahlreichen kleinen Speicheldrüsen ausgekleidet. In der Mundhöhle wird feste Nahrung zerkleinert und in einen gleitfähigen Zustand überführt. Der dazu benötigte Speichel enthält vor allem Elektrolyte,  $\alpha$ -Amylase und Muzine [4].

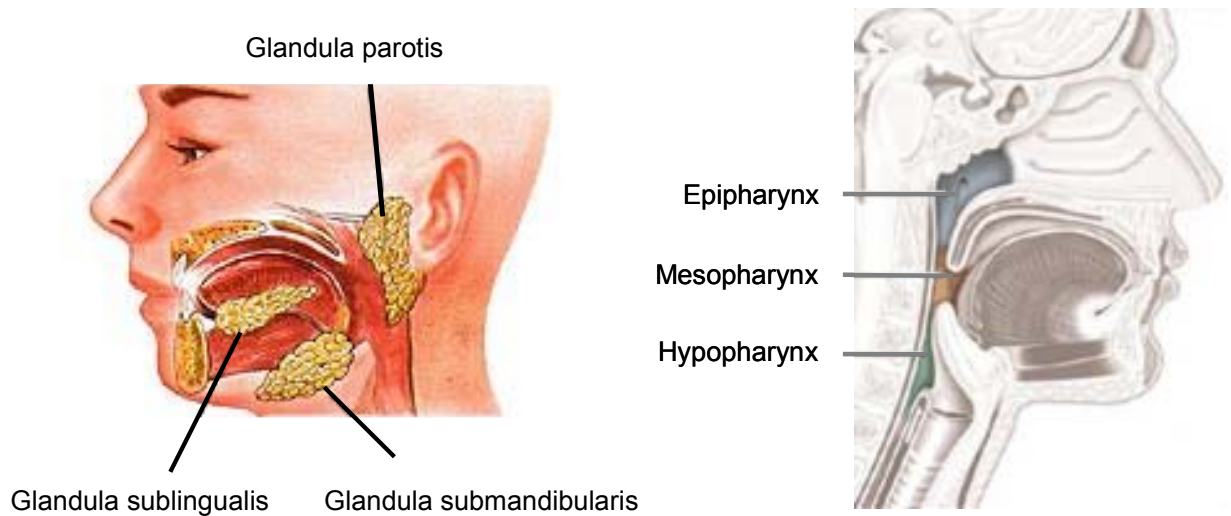


**Abb. 1–2 Einblick in die Mundhöhle beim Erwachsenen [5]**

Die Labia oris (Lippen) bilden die äußere Begrenzung des Mundraumes. Die seitliche Begrenzung der Mundhöhle wird durch die Bucca (Wange) dargestellt. Lippen- und Wangenschleimhaut gehen in das Zahnfleisch (Gingiva) über, das an den Processus alveolares (Alveolarfortsätze) mit dem Knochen fest verbunden ist. Das die Mundhöhle fast vollständig einnehmende Organ ist die Lingua (Zunge). Der Gaumen bildet das Dach der Mundhöhle. Man unterscheidet den Palatum durum (harter Gaumen), der durch eine Knochenplatte versteift ist, von dem Palatum molle (weichen Gaumen). Die Übergangszone zwischen Mundhöhle und Rachenraum (Isthmus faucium) besteht aus dem Arcus palatoglossus (vorderer Gaumenbogen), dem Velum palatinum (Gaumensegel) mit der Uvula palatina (Gaumenzäpfchen), dem M. tensor veli palatini (Spanner des Gaumensegels), der für die Öffnung des Tubenlumens und die Belüftung des Mittelohres beim Schlucken und Gähnen verantwortlich ist, dem M. levator veli palatini (Gaumenheber) und dem Arcus palatopharyngeus (hinterer Gaumenbogen). An der Rachenenge (Isthmus faucium) findet sich der Waldeyersche Rachenring, der die Tonsilla palatina (Gaumenmandel), Tonsilla pharyngea (Rachenmandel), Tonsilla lingualis (Zungenmandel) und die Tonsilla tubaria (Tubenmandel) einschließt und damit zur Immunabwehr beiträgt [6].

Die Lage der Speicheldrüsen zeigt die Abb. 1–3. Sie sezernieren den überwiegenden Anteil des Mundspeichels. Die Glandula parotis (Ohrspeicheldrüse) stellt die größte Speicheldrüse dar. Der Pharynx ist

ein von Schleimhaut ausgekleideter Muskelschlauch und wird in die drei Abschnitte Epipharynx, Mesopharynx und Hypopharynx unterteilt (Abb. 1–3). Die Epiglottis (Kehldeckel) stellt die Grenze zum Hypopharynx dar, der die Zugänge zum Kehlkopf und Ösophagus enthält.



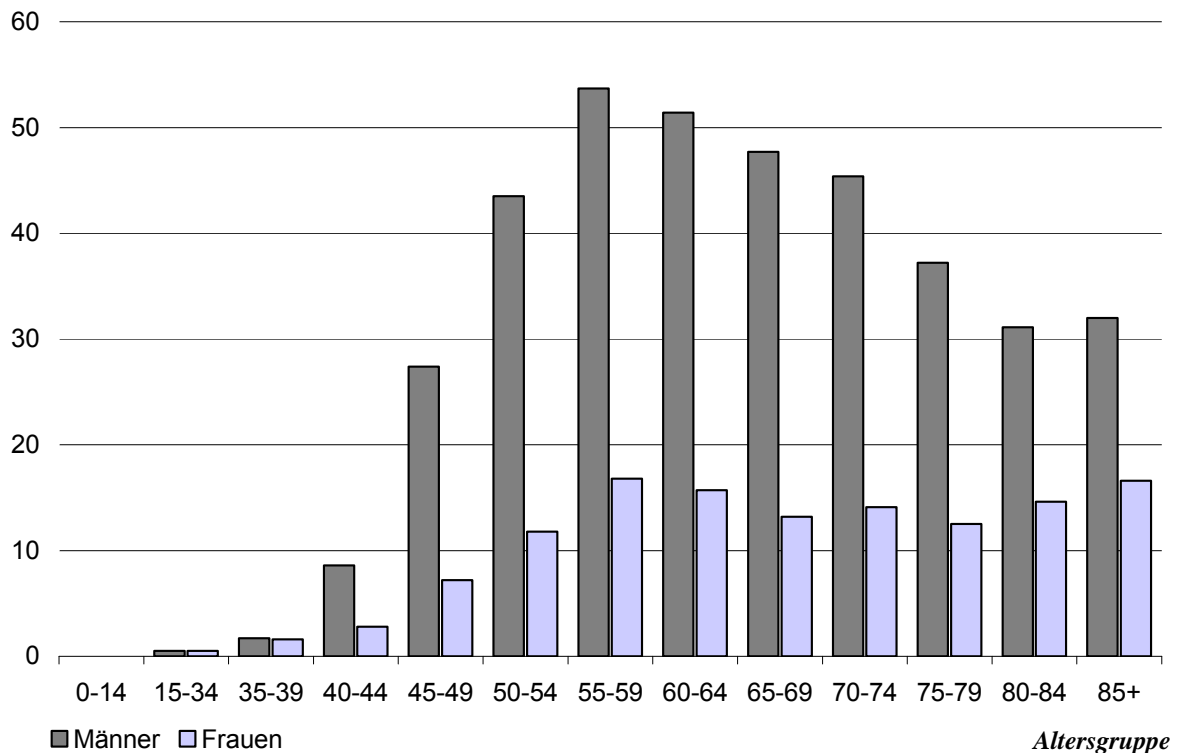
**Abb. 1–3 Lage der Speicheldrüsen und Einteilung der Abschnitte des Pharynx [5]**

### 1.1.2.2 Krebserkrankungen im Bereich von Mundhöhle und Rachen in Deutschland

Beim Oropharynxkarzinom handelt es sich um ein Plattenepithelkarzinom. Es kann sich aus Läsionen, chronischen Entzündungen und Leukoplakie als Präkanzerose entwickeln. Wird Krebs im Bereich der Mundhöhle diagnostiziert, so handelt es sich in 9 von 10 Fällen um ein Oropharynxkarzinom.

Das Risiko, an Krebs der Mundhöhle einschließlich Zungenkrebs ohne Speicheldrüsenkrebs zu erkranken, liegt für Männer etwa dreimal höher als für gleichaltrige Frauen. Im Jahr 2004 erkrankten etwa 7.620 Männer und 2.780 Frauen an Krebs im Bereich von Mundhöhle und Rachen [2]. Das entspricht einem Anteil von ca. 3,3% an allen bösartigen Neubildungen bei Männern und steht hinsichtlich der Krebserkrankungshäufigkeit an siebter Stelle. Bei Frauen sind dies nur 1,4%.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern mit 61 Jahren etwas niedriger als bei Frauen mit 63 Jahren. Männer weisen niedrigere Überlebensraten als Frauen auf. Jüngere Patienten haben die günstigsten Überlebensaussichten (Abb. 1–4). Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Mundhöhlenkarzinome liegen im Mittel bei 47% für Männer und 55% für Frauen. Der abnehmende Anteil prognostisch sehr günstiger Krebskrankheiten der Lippe und die Zunahme des Anteils von prognostisch ungünstigen Krebskrankheiten des Rachens in den Jahren 1980 bis 1995 haben zu einer Verschlechterung der Überlebensraten in der Gruppe der Krebskrankheiten der Mundhöhle und des Rachens insgesamt beigetragen. Die günstigsten 5-Jahres-Überlebensraten hat Lippenkrebs mit 90%, die ungünstigsten Rachenkrebs mit 30-40%. Werden zusätzlich Metastasen diagnostiziert, sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf 20%.



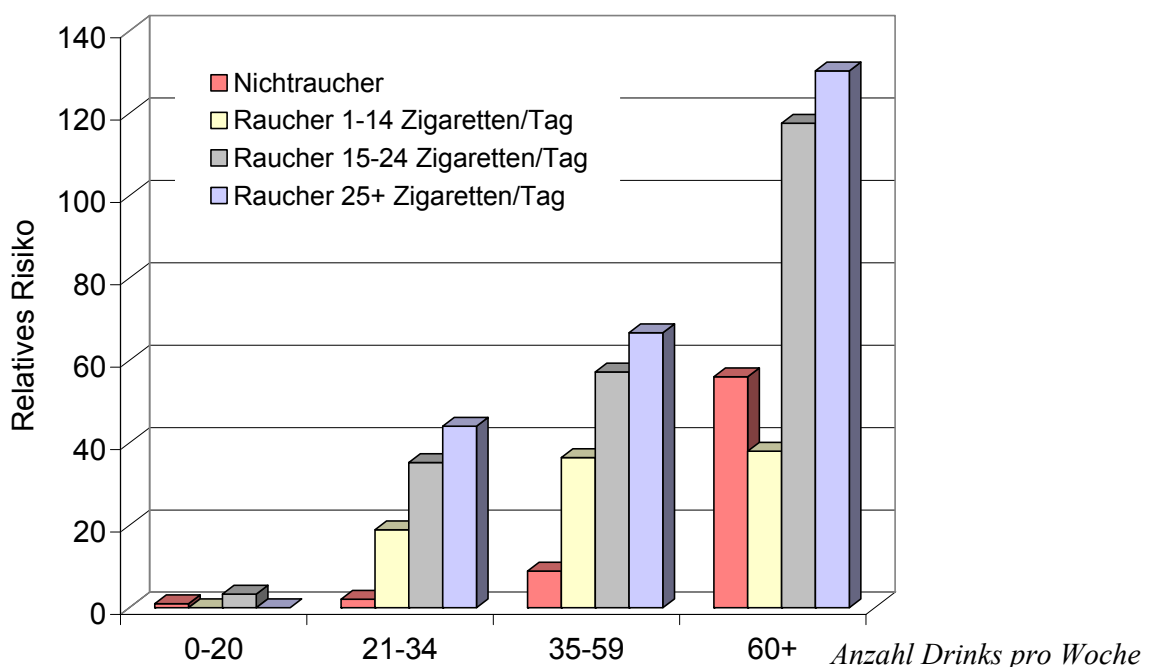
**Abb. 1–4 Schätzung der altersspezifischen Inzidenz von Mundhöhlenkarzinomen in Deutschland für 2004, ICD-10 C00-14 [2]**

Krebserkrankungen der Speicheldrüsen betreffen in etwa 80% die Parotis. Sie treten insgesamt sehr selten auf, wobei Männer (4 Fälle/100.000 Einwohner) etwa doppelt so häufig erkranken wie Frauen. Als Ursache werden entzündliche Vorerkrankungen diskutiert.

Unter den Risikofaktoren für Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens stehen der Dauergebrauch von Alkoholika (bis zu 30faches Risiko) und das Zigarettenrauchen an erster Stelle [7-12]. Alkohol entfaltet eine synergistische Wirkung (Abb. 1–5), indem es den Durchtritt der Kanzerogene, die aus dem Tabak stammen, erleichtert [13]. Ebenso können Zigarren- und Pfeifenrauchen, Cannabis-konsum und die Verwendung von Kautabak die Krebsentstehung fördern [2,14,15]. Das Risiko ist vergleichbar zwischen Zigarettenrauchern, Benutzern von Zigarillos, Zigarren- oder Pfeifenrauchern und sinkt stark ab, je länger die Gewohnheit bereits aufgegeben wurde. Wurde das Rauchen zwanzig Jahre zuvor beendet, ist kein erhöhtes Risiko mehr festzustellen [16].

Seltene Zahnarztbesuche können zu einer Verzögerung der Diagnose beitragen, besonders wenn mangelnde Mundhygiene vorliegt. In den vergangenen Jahren ist eine Zunahme des Auftretens von Mundhöhlenkarzinomen bei jungen Menschen in der Altersgruppe zwischen 19 und 25 Jahren festzustellen. Dieses Phänomen wird mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) in Verbindung gebracht. Die Übertragung erfolgt durch direkten Hautkontakt, beispielsweise durch Verschleppung der Erreger der Genitalwarzen in die Mundhöhle durch Oralverkehr [17]. Das Virus könnte als ein Cofaktor an der Pathogenese von oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) beteiligt sein, insbesondere beim Oropharynxkarzinom [18]. Eine Metaanalyse [19] wies ein 4,7fach erhöhtes Auftreten von HPV in OSCC vergli-

chen mit normaler oraler Mucosa nach. Es wird konträr diskutiert, ob Nichtraucher häufiger HPV-assoziierte Krebserkrankungen der Mundhöhle erleiden als Raucher [20,21]. Diese, der Familie der Papovaviren zugehörige DNA-Virusart, kann je nach Subtyp benigne und maligne Tumoren der Haut und Schleimhäute bedingen. Die Niedrigrisikotypen HPV 6 und HPV 11 führen zur Entstehung der Condylomata acuminata, die auch unter den Begriffen Feig- oder Feuchtwarzen bekannt ist. Ebenfalls kann es zur Ausbildung von Malignomen kommen [22]. Die Hochrisikotypen HPV 16 und HPV 18 tragen zur Entstehung des Cervixkarzinoms bei. Der deutsche Forscher Harald zur Hausen, langjähriger Leiter des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg, bekam für seine Arbeiten zu Nachweis und Prophylaxe des HPV-assoziierten Gebärmutterhalskrebses, im Oktober 2008 den Medizinnobelpreis verliehen.



**Abb. 1–5 Rauchen und Trinken als Risikofaktoren für Mundhöhlentumoren [13]**

Zur Kodierung der Todesursachen und Krankheiten wird die International Classification of Diseases (ICD) als internationaler Standard genutzt. Seit 1994 ist die 10. Revision in Kraft getreten, die als ICD-10 bezeichnet wird [23]. Kapitel II listet Neubildungen und ist untergliedert in bösartige Neubildungen (C00-C97), in-situ-Neubildungen (D00-D09), gutartige Neubildungen (D10-D36) und Neubildungen unsicheren oder unbekanntes Verhaltens (D37-D48). Bösartige Neubildungen von Lippen, Mundhöhle und Pharynx werden unter C00-C14 klassifiziert (Tab. 1–2).

Betrachtet man das Auftreten von Mundhöhlenkarzinomen in verschiedenen Ländern, stellt man eine Zunahme von Inzidenz und Mortalität besonders in den Westeuropäischen Ländern fest. Höchste Fallzahlen bei Männern sind aus Frankreich und Indien bekannt, gefolgt von der Slowakei, Slowenien, Ungarn und der Schweiz. Frauen erkranken am häufigsten in Indien, Südostasien und den USA. Die niedrigsten Raten sind aus Japan, China und den Skandinavischen Ländern bekannt [24].



**Tab. 1–2 Klassifizierung der Todesursachen und Krankheiten nach ICD-10 (Auswahl C00-C14)**

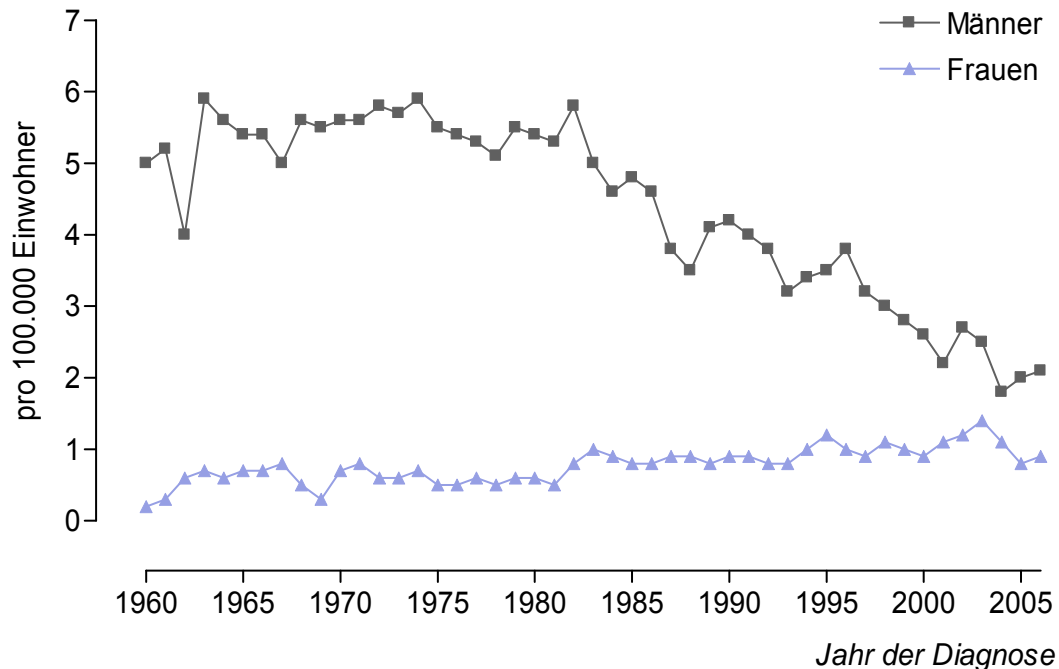
<b>Gruppe</b>	<b>Lokalisation</b>
C 00	Maligne Neoplasien der Lippen
C 01	Maligne Neoplasien des Zungengrundes
C 02	Maligne Neoplasien sonstiger und nicht näher bezeichneter Teile der Zunge
C 03	Maligne Neoplasien des Zahnfleisches
C 04	Maligne Neoplasien des Mundbodens
C 05	Maligne Neoplasien des Gaumens
C 06	Maligne Neoplasien sonstiger und nicht näher bezeichneter Teile des Mundes
C 07	Maligne Neoplasien der Parotis
C 08	Maligne Neoplasien sonstiger und nicht näher bezeichneter großer Speicheldrüsen
C 09	Maligne Neoplasien der Tonsillen
C 10	Maligne Neoplasien des Oropharynx
C 11	Maligne Neoplasien des Nasopharynx
C 12	Maligne Neoplasien der Nasennebenhöhle (Processus piriformis)
C 13	Maligne Neoplasien des Hypopharynx
C 14	Maligne Neoplasien sonstiger und ungenau bezeichneter Lokalisationen der Lippe, Mundhöhle und des Pharynx

### 1.1.2.3 Krebserkrankungen des Mund-Rachen Raumes in Schweden

Innerhalb Europas weist Schweden die niedrigste Inzidenz an Krebserkrankungen des Mund-Rachen Raumes auf. Zwei Drittel der Patienten mit diesen Plattenepithelkarzinomen sind männlich. Verglichen mit allen malignen Tumorerkrankungen in Schweden, lag die Erkrankungsrate für Tumoren des Mund-Rachen Bereiches im Jahr 2006 gerade bei 1,9% für Männer und 1,4% für Frauen [25].

Die niedrige Inzidenz von Mundhöhlentumoren lässt sich mit dem im Vergleich zu anderen europäischen Ländern geringen Anteil an Rauchern bei den schwedischen Männern erklären. Etwa ein Viertel der Männer genießt Tabak ausschließlich in Form des Schwedischen Kautabaks, der auch unter dem Begriff Snus bekannt ist (s. Kapitel 1.3). Dieser mehr als hundert Jahre alte Brauch ist auch in anderen skandinavischen Ländern verbreitet, außerhalb dieser Länder aber sehr selten. In anderen Ländern der EU ist der Vertrieb von Snus sogar seit einigen Jahren verboten. Snus wird überwiegend in der nördlichen Region Schwedens benutzt. Dort ist innerhalb des Landes die niedrigste Inzidenz für Mundhöhlentumoren gegeben, während man in den Städten Stockholm, Göteborg und Malmö die höchste Inzidenz findet [25]. Snus wird in diesen Städten wesentlich seltener verwendet als in der nördlichen Region mit geringer Inzidenz.

Den stärksten Rückgang neu diagnostizierter Krebsverdachtsfälle wiesen Tumoren der Lippe bei Männern auf (Abb. 1–6). Es wurde ein jährlicher Rückgang um durchschnittlich 5,7% innerhalb von 10 Jahren bis zum Jahr 2006 festgestellt. Das führte im Jahr 2006 zu einer altersstandardisierten Rate von 2,1 für Männer und 0,9 für Frauen pro 100.000 Einwohner.



**Abb. 1–6** Entwicklung von malignen Neuerkrankungen der Lippe in den Jahren 1960-2006 in Schweden im Vergleich zwischen Männern und Frauen [25]

### 1.1.3 Entstehung von Krebserkrankungen

Krebs ist im allgemeinen Sprachgebrauch ein Sammelbegriff für eine Vielzahl von Krankheiten, bei denen Körperzellen unkontrolliert wachsen, sich teilen und gesundes Gewebe verdrängen oder zerstören können [26]. Die Auslöser von Krebs sind vielfältig und führen zu einer Störung des genetisch geregelten Gleichgewichtes zwischen dem Zellzyklus und der Apoptose.

Protoonkogene und Tumorsuppressorgene überwachen die Reduplikation, Reparatur- und Apoptosevorgänge, um die Erhaltung des genetischen Codes zwischen den Zellgenerationen zu sichern. Kommt es zu Veränderungen in einem dieser Gene, kann das Gen den von ihm überwachten Teilschritt nicht mehr korrekt ausführen. Weitere Defekte können in der nächsten Zellgeneration auftreten. Sind Gene betroffen, die die Apoptose regulieren (z.B. p53), werden diese Zellen unsterblich. Durch weitere Veränderungen der DNA erwerben die Zellen zusätzliche Überlebensstrategien. Sie können unter Sauerstoffmangel überleben und eine eigene Blutversorgung ausbilden (Angiogenese). Wandern sie aus dem Gewebe aus und lagern sich in fremden Geweben wie Knochen, Lunge oder Gehirn an, ist eine Metastasierung erfolgt.

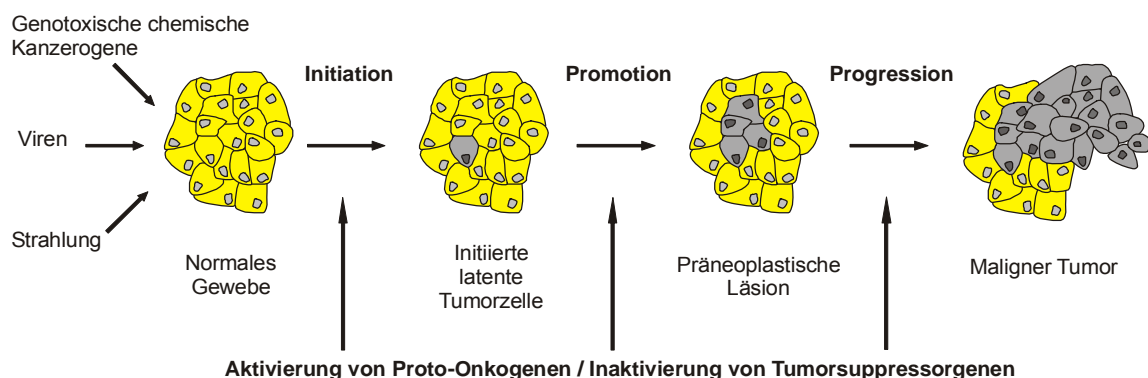
Die Entstehung von benignen und malignen Tumoren durch Einwirkung von Chemikalien wird als chemische Kanzerogenese bezeichnet. Man unterscheidet genotoxische und epigenetische Ursachen. Die genotoxische Kanzerogenese beschreibt Reaktionen von Substanzen mit zellulären Bestandteilen, insbesondere mit DNA. Die Substanzen wirken mutagen. Wichtige Substanzklassen mit genotoxischer Wirkung sind aromatische Amine, polycyclische Kohlenwasserstoffe, Alkylanzien und Nitrosamine. In der epigenetischen Kanzerogenese spielen hormonelle Einflüsse, chronische Entzündungen, Cytotoxizität und Promotoren eine wichtige Rolle.

Die chemische Kanzerogenese (Abb. 1–7) ist ein in Phasen ablaufender Vorgang, der durch die irreversible Schädigung des Genoms der Zellen (*Initiation*), der Vermehrung initiiertter Zellen (*Promotion*) und der zunehmenden Malignität der initiierten Zellen (*Progression*) beschrieben wird.

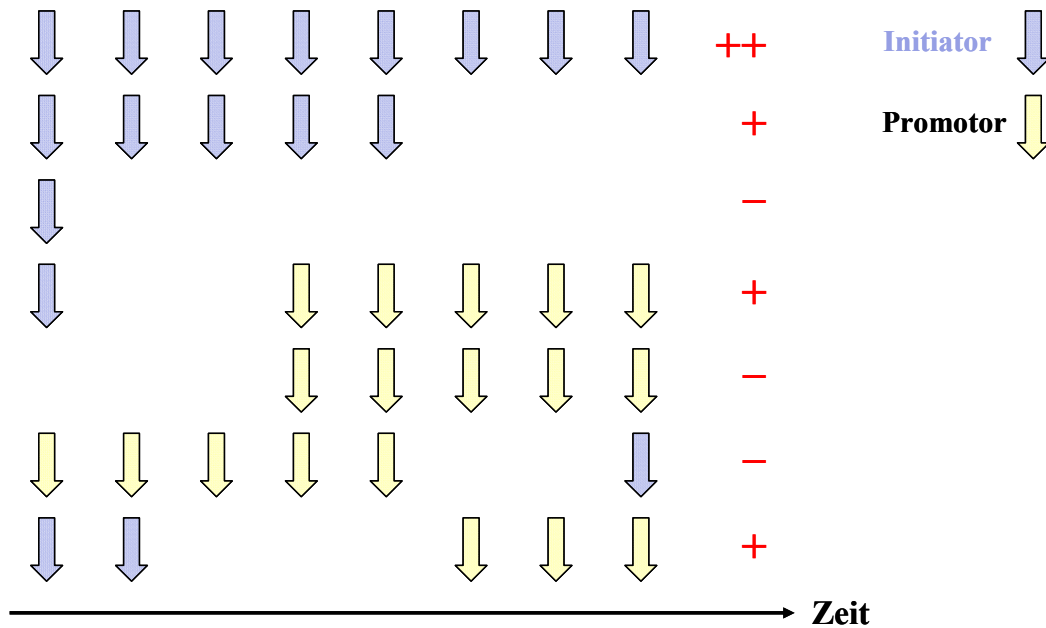
Zu Beginn der Kanzerogenese steht das Einwirken von mutagenen oder genotoxischen Substanzen, die in Wechselwirkungen mit der DNA des Zellkerns treten und zu Mutationen führen. Versagen die vielfältigen Reparaturmechanismen, dann bleibt ein irreversibler Schaden erhalten (*Initiation*). Eine initiierte Zelle kann sich unter dem Einfluss eines Promotors stärker vermehren als eine normale Zelle (Abb. 1–8).

Die *Tumorpromotion* ist ein Prozess, der die vorausgegangene Initiation beschleunigen und verstärken kann. Durch Proliferation initiiertter Zellen entstehen präneoplastische Zellpopulationen mit identischen Mutationen. Dieser Prozess kann Wochen bis Jahre andauern. Nach einer längeren Unterbrechung kann die Wirkung der promovierenden Substanz verloren gehen, daher kann die Tumorpromotion in einer frühen Phase reversibel sein. *Initiation* und *Promotion* führen zunächst zur Entstehung benigner Tumoren. Die Vermehrung präneoplastischer Zellen in der Promotionsphase führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für weitere Mutationen.

Der Übergang vom benignen zum malignen Tumor wird als *Progression* bezeichnet, der wie die Initiation irreversibel ist. Chromosomale Schäden treten verstärkt auf bis hin zur Aneuploidie. Ein charakteristisches Merkmal dieser Phase stellt die zunehmende Instabilität der Tumorzellen dar. Es besteht eine erhöhte Ausprägung von Tumorerheterogenitäten und der Tumorprogression unter Bildung von metastasierenden Subklonen.



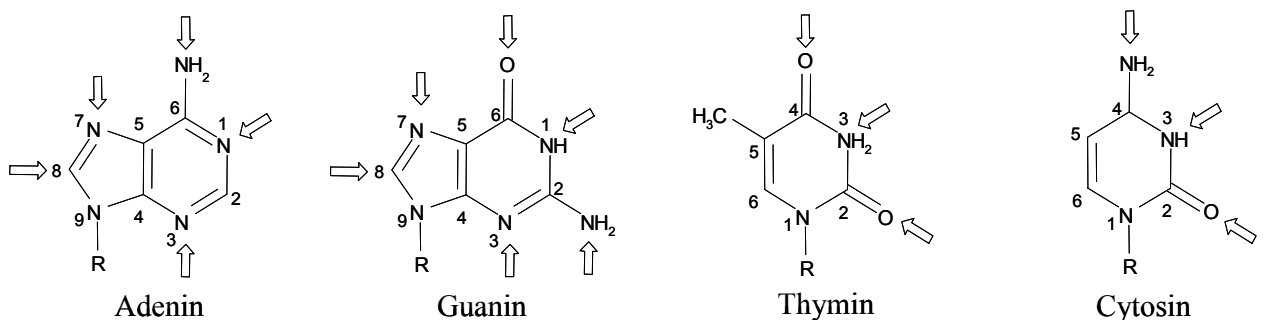
**Abb. 1–7 Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese**



**Abb. 1–8 Wirkungen von Initiator und Promotor in zeitlicher Abhängigkeit auf die Entwicklung von Tumoren (Tumorentstehung +, kein Tumor -)**

Kanzerogene gehen nach metabolischer Aktivierung kovalente Bindungen mit zellulären Makromolekülen ein und bilden Addukte. Diese Reaktion kann mit allen Stickstoff- und enolisierten Sauerstoffatomen der Nukleinbasen, dem C8-Atom der Purinbasen und den Hydroxylgruppen der Phosphorsäure geschehen. Die Adduktbildung hängt von spezifischen elektronischen und stereochemischen Faktoren ab [27]. Die vorherrschenden Angriffspunkte der Kanzerogene sind die Positionen N2, O6 und C8 der Guaninbase der DNA (Abb. 1–9) [28]. Nicht oder unzureichend reparierte DNA-Addukte können während der Replikation zu einem Basentausch und zu Veränderungen der genetischen Information führen. Dadurch wird während der Translation die normale Proteinbiosynthese verändert. Kommt es zu einem Austausch einer Aminosäure, kann die weitere Funktion des Proteins beeinträchtigt sein.

DNA-Addukte können als internes Dosimeter für die Exposition mit Kanzerogenen angesehen werden, denn sie stellen einen frühen, kritischen Schritt in der chemischen Kanzerogenese dar. Bei vielen chemischen Substanzen ist aufgrund der DNA-Adduktbildung die Organotropie von Tumoren vorhersehbar. DNA-Addukte sind aber nicht die einzige Ursache für die Organspezifität von Kanzerogenen.

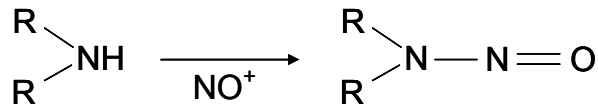


**Abb. 1–9 DNA-Basen mit potentiellen Stellen für Additionsreaktionen**

## 1.2 Inhaltsstoffe des Tabakrauchs

### 1.2.1 Nitrosamine

Die Stoffklasse der Nitrosamine umfasst Verbindungen, deren charakteristisches Strukturmerkmal die Gruppierung N-NO ist (Abb. 1–10), die zwei organische Molekülreste verbindet. Ihre Bedeutung als Schadstoffgruppe liegt in erster Linie in der eindeutig krebserregenden Wirkung der meisten Vertreter.



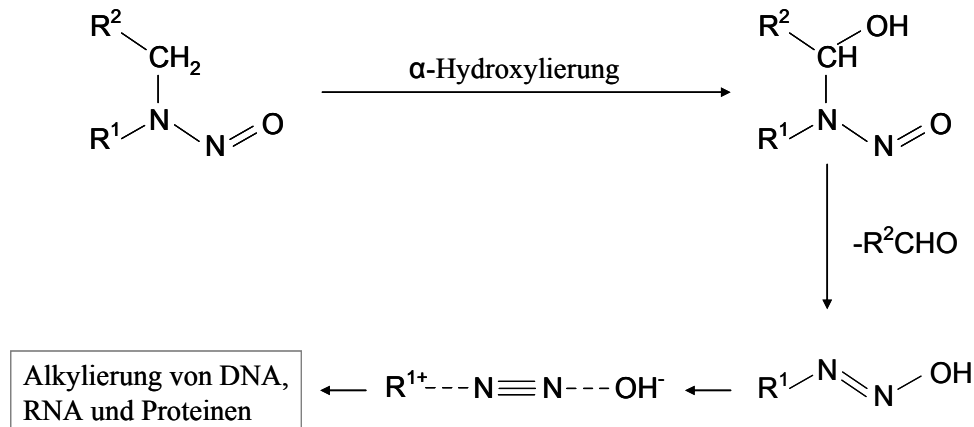
**Abb. 1–10 Vereinfachtes Schema der Nitrosierung**

Nitrosamine entstehen 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 tierischer Herkunft nachgewiesen werden. Wichtigste Vertreter aus der Klasse der Nitrosamine sind hier das Dimethylnitrosamin und das Nitrosopyrrolidin. Bei Fleischwaren wurde gezeigt, dass durch den Vorgang des Bratens der Gehalt an Nitrosaminen noch gesteigert werden kann [29].

Im menschlichen Körper werden Nitrosamine ebenfalls gebildet, beispielsweise im sauren Milieu des Magens. Ein Hauptfaktor ist dabei die aufgenommene Menge an Nitrat, das im Magen und im Darm absorbiert wird. 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<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oxidiert, reagiert mit Wasser zu Nitrit und Hämoglobin oxidiert dann das Nitrit zu Nitrat. Dieses Nitrat wird mit Hilfe eines Anionentransportsystems in den Speichel sezerniert [30,31]. Bakterien der Mundhöhle reduzieren das Nitrat zu Nitrit, das fast vollständig mit dem Speichel geschluckt wird und damit als Hauptquelle für Nitrit im Magen gilt [32]. Insgesamt wird im menschlichen Körper täglich mit ca. 1 mg/kg Körpergewicht ebensoviel Nitrat gebildet, wie über die Nahrung aufgenommen wird [29].

Neben der chemischen Nitrosierung im sauren Milieu sind auch Bakterien für die endogene Bildung von Nitrosaminen im Menschen von Bedeutung. Die Reaktion aus Nitrat bzw. Nitrit und Aminen zu Nitrosaminen kann durch diverse Bakterienstämme, beispielsweise *Escherichia*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* oder *Proteus* katalysiert werden [33,34]. Diese Vorgänge werden als mögliche Risikofaktoren für Magenkrebs bei Menschen mit Achlorhydrie (optimale Bedingungen für die Vermehrung von Bakterien im Verdauungstrakt) und für Blasenkrebs bei Patienten mit chronischen Harnwegsinfekten angesehen.

Die Mehrzahl der bekannten Nitrosamine stellen Präkanzerogene dar, die über eine  $\alpha$ -Hydroxylierung metabolisch aktiviert werden. Dazu ist die Beteiligung verschiedener Cytochrom P450 Isoenzyme notwendig, die gewebespezifisch wirken können. Daraus ergibt sich eine Organspezifität der Nitrosamine für die Entstehung von Tumoren, die unabhängig vom Ort der Applikation auftreten [35]. Es entsteht ein instabiles  $\alpha$ -Hydroxynitrosamin, das unter Protonenwanderung und Abspaltung eines Aldehyds zum Diazohydroxid reagiert. Unter Abspaltung von Stickstoff kann dieses ultimale Kanzerogen dann DNA, RNA und Proteine alkylieren oder durch Hydrolyse einen Alkohol bilden.

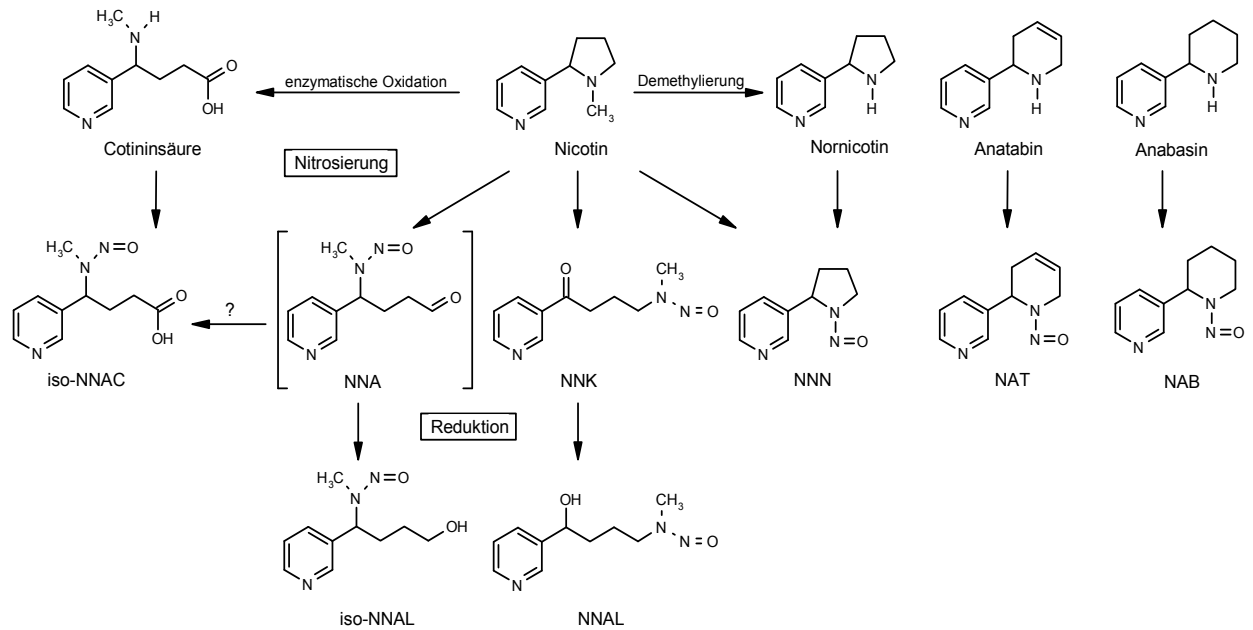


**Abb. 1–11 Adduktbildung durch Nitrosamine**

DNA-Addukte, die vor der Zellreplikation nicht oder falsch repariert werden, können zu Genmutationen führen oder exponierte Zellen dazu veranlassen, sich in irreversibel veränderte Präneoplasien umzuwandeln [36]. Eine so initiierte Zelle durchläuft dann theoretisch alle weiteren Stadien der chemischen Kanzerogenese.

### 1.2.2 Tabakspezifische Nitrosamine (TSNA)

Die tabakspezifischen Nitrosamine (TSNA) entstehen hauptsächlich während der Tabakverarbeitung aus Tabakalkaloiden und sind deshalb in unverbranntem Tabak und im Tabakrauch vorhanden. Das wichtigste Alkaloid, Nicotin, liegt im unverbrannten Tabak, je nach Sorte, mit 5 bis 180 mg/g vor. Durch oxidative Spaltung der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung entstehen aus dem Nicotin das Nitrosaminoketon 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und das 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanal (NNA). Nach Abspaltung der Methylgruppe des Nicotins entsteht *N'*-Nitrosornicotin (NNN) [37]. Aus weiteren Alkaloiden, die in geringeren Mengen im Tabak vorkommen, wie Nornicotin, Anabasin und Anatabin, die sekundäre Amine sind, entstehen NNN, *N'*-Nitrosoanatabin (NAT) und *N'*-Nitrosoanabasin (NAB). Die enzymatisch aus Nicotin gebildete Cotininsäure wird zu 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure (*iso*-NNAC) nitrosiert. 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) [38] (Abb. 1–12).



**Abb. 1–12 Bildung tabakspezifischer Nitrosamine aus Tabakalkaloiden [38]**

Bis auf das NNA konnten alle Nitrosamine sowohl im unverbrannten Tabak als auch im Hauptstrom- und Nebenstromrauch nachgewiesen werden (Tab. 1–3). 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 (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.

**Tab. 1–3 Konzentration tabakspezifischer Nitrosamine in Tabak, Zigarettenrauch und Umgebungsluft [39,40].**

	NNN	NNK	NAB + NAT
Zigaretten tabak [ $\mu\text{g/g}$ ]	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*	

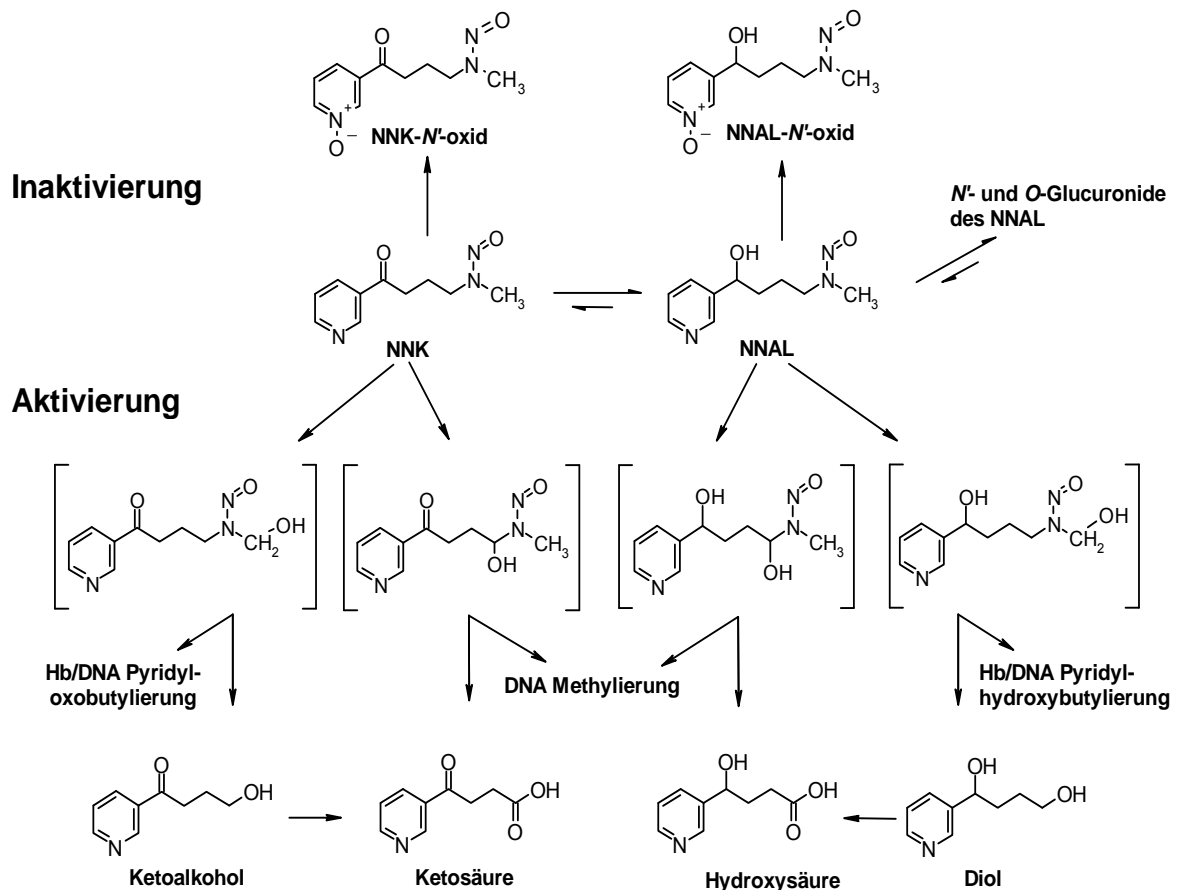
\* bei 0 – 30 gerauchten Zigaretten

TSNA kommen in Spuren in den Blättern der jungen Tabakpflanze vor. Der größte Teil der TSNA entsteht während der unterschiedlichen Trocknungs- und Fermentierungsprozesse des Roh tabaks [41,42], aber auch während der Verbrennung des Tabaks steigt die Nitrosaminbelastung des Rauchs an. Und letztlich kommt es zur Bildung der TSNA durch endogene Nitrosierungsprozesse im menschlichen Körper. Unverbrannter Tabak enthält weniger Kanzerogene als Zigarettenrauch, da diese erst

durch Verbrennungsprozesse gebildet werden. In Schnupf- und Kautabak und allen anderen rauchlosen Tabakprodukten wird den TSNA das größte kanzerogene Potential zugeschrieben [43-45].

Der Nicotinanteil der Tabakblätter beträgt ungefähr 1% bis 8%, selten bis 15%. Der Nitrosaminanteil ist um den Faktor 3000 bis 30.000 kleiner. Unter den verschiedenen Tabakanbietern schwankt der TSNA-Gehalt des Tabaks stark [46-48]. Durch Änderungen im Herstellungsverfahren kann eine erhebliche Reduktion des Gehalts an TSNA im Zigaretten tabak erreicht werden [49].

NNN und NNK wurden durch die IARC als kanzerogen für den Menschen eingestuft [45]. NNK induziert Lungentumoren in Nagetieren, unabhängig von der Art und Weise der Verabreichung. Außerdem kann es in Nagetieren die Entstehung von Tumoren in Leber, Pankreas, Mundhöhle und Nase begünstigen. NNN wurde als Kanzerogen der Lunge in Mäusen nachgewiesen, in Ratten traten unter dem Einfluss von NNN vermehrt Tumoren des Ösophagus, der Mundhöhle und der Trachea auf. Ein Mix aus NNN und NNK führte zur Entstehung von Mundhöhlentumoren in Ratten [50].



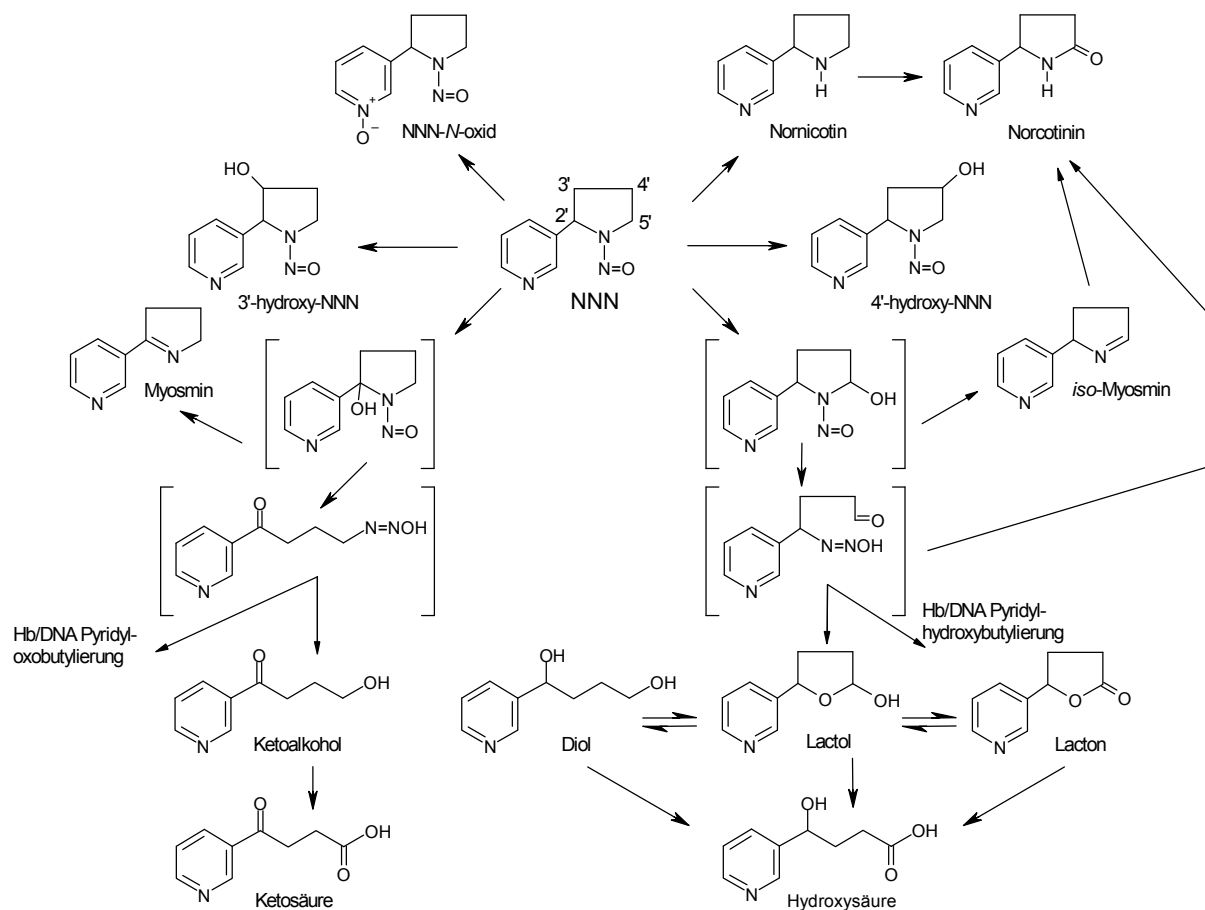
**Abb. 1–13 Metabolismus von NNK (reaktive Zwischenstufen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet, modifiziert nach Richter und Tricker [51])**

NNK unterliegt einer metabolischen Aktivierung durch  $\alpha$ -Hydroxylierung, die durch Cytochrom P450 katalysiert wird (Abb. 1–13) [52]. Es kommt zur Bildung reaktiver Elektrophile, die mit der DNA zu methylierten und pyridyloxobutylierten DNA-Addukten reagieren (POB-DNA-Addukte) [53]. Die Reaktion mit Wasser führt zu den Metaboliten Ketoalkohol (HPB) und Ketosäure, die zwar im Urin



nachweisbar sind, aber keine Spezifität für die NNK-Belastung haben, weil sie in höheren Mengen auch vom Nicotin gebildet werden [54]. Nach Reduktion von NNK zu NNAL durch Steroiddehydrogenasen und andere mikrosomale und cytosolische Enzyme [55,56] erfolgt entweder die Entgiftung zu Glucuroniden [57] oder analog zu NNK eine Aktivierung zu einem methylierenden Zwischenprodukt oder anstelle des POB zu einem pyridylhydroxylierenden Agens und damit zu PHB-Addukten [53]. Für die mit Wasser abreagierten Metaboliten Diol und Hydroxysäure gilt ebenfalls, dass sie im Urin in höherem Maße vom Nicotin stammen als von den TSNA. Beide Nitrosamine, NNK und NNN, können auch zu den entsprechenden *N'*-Oxiden entgiftet werden.

Die metabolische Aktivierung von NNN durch  $\alpha$ -Hydroxylierung am C2 des Pyrrolidinrings führt ebenfalls zu POB-Addukten, die Hydroxylierung am C5 zu PHB-Addukten. Auch hier ist die *N'*-Oxidation ein Entgiftungsweg. Andere in der Abb. 1–14 gezeigte Metaboliten des NNN spielen quantitativ eine untergeordnete Rolle.

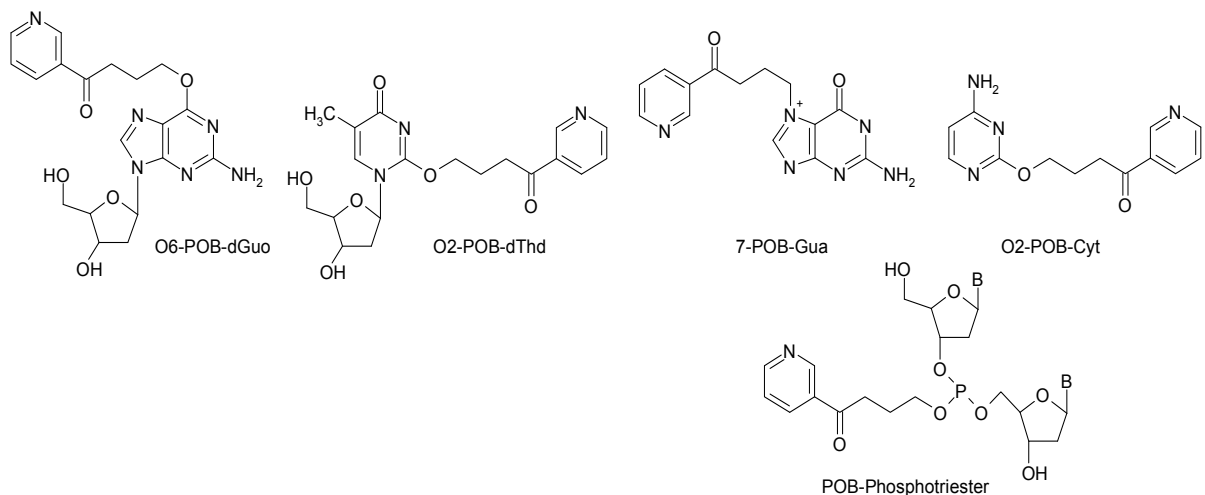


**Abb. 1–14 Metabolismus von NNN (reaktive Zwischenstufen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet, modifiziert nach Tyroller et al. [58])**

POB-Addukte am Hämoglobin, die nach alkalischer Hydrolyse und Derivatisierung des freigesetzten HPB mit hoher Empfindlichkeit durch GC-MS erfassbar sind, sollten hochspezifische Marker für die Belastung mit den beiden TSNA NNN und NNK sein [59]. Analog zu der Belastung mit dem NNK-

Metaboliten NNAL, der im Urin als Summe aus der freien Form und seiner Glucuronide gemessen wird, war zwischen Rauchern und Nichtrauchern ein Unterschied um durchschnittlich den Faktor 100 zu erwarten [60,61]. Entgegen dieser Erwartung waren die Unterschiede der POB-Hb-Addukte zwischen Rauchern und Nichtrauchern weniger als dreifach [62-66].

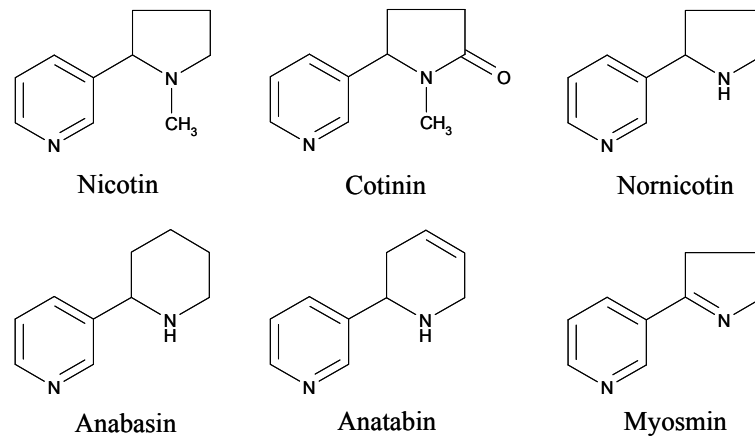
POB-DNA-Addukte, die nach saurer Hydrolyse pauschal als HPB bestimmt wurden, zeigten auch in Lunge, Ösophagus und Magen geringe Unterschiede, maximal 7fach zwischen den Addukten in der Lunge von Rauchern und Nichtrauchern mit Lungenkrebs [66-70]. Neuerdings gelang die Bestimmung von spezifischen DNA-Addukten nach Gabe größerer Mengen von NNK, NNAL und NNN an Ratten [71-76]. Dabei entfiel der höchste Anteil auf POB-Addukte (Abb. 1–15). Bei Mäusen wurden nach NNK-Belastung auch POB-Addukte am Phosphortriester der DNA gefunden [77]. Wegen ihrer hohen Spezifität für NNK, NNAL und NNN wird die Bildung von POB-Addukten als der Schlüsselmechanismus für die Kanzerogenese dieser TSNA in Nagetieren und Menschen vermutet.



**Abb. 1–15** Strukturen von POB-DNA-Addukten [71-74,77]

### 1.2.3 Tabakalkaloide

Die Gattung *Nicotiana* (Solanaceae) ist mit etwa 60 Arten in gemäßigten und subtropischen Gebieten des amerikanischen Kontinents, sowie auf Inseln im Pazifik und in Australien beheimatet. Der Tabak gelangte nach Europa als Kulturpflanze. Zu Gewinnung des Rauchtobaks werden Virginischer Tabak, *Nicotiana tabacum*, und in geringerem Umfang der Bauern-Tabak, *Nicotiana rustica*, kultiviert. Der Alkaloidgehalt der Blätter der beiden Tabakarten liegt zwischen 0,5 und 8,0%. Zur Herstellung von Tabakwaren werden Sorten mit einem Gehalt von durchschnittlich 1,5% Alkaloiden bevorzugt. Die Alkaloide dienen der Pflanze als Stickstoffquelle, Wachstumsregulator und Fraßschutz vor Insekten. Das bekannteste Tabakalkaloid stellt das Nicotin dar.



**Abb. 1–16 Die wichtigsten Vertreter der Tabakalkaloide**

### 1.2.3.1 Nicotin

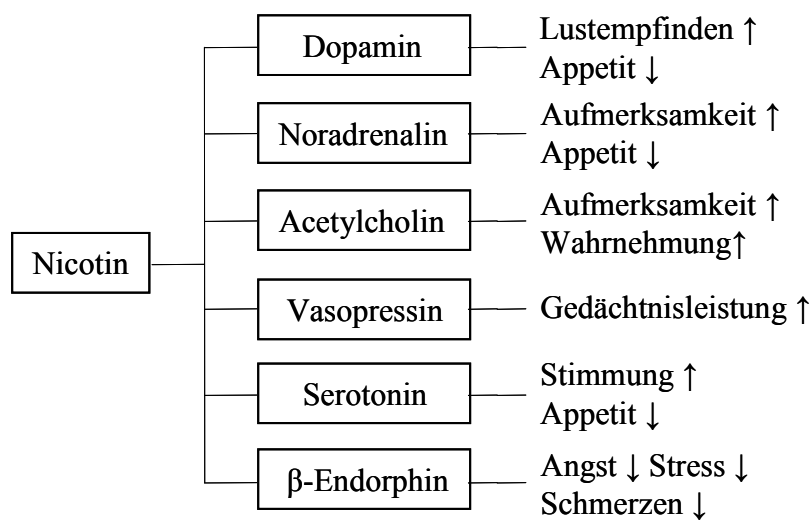
Nicotin wird in der Wurzel der Tabakpflanze gebildet und überwiegend in den Blättern abgelagert. Es kann je nach Pflanzenart bis zu 10% des Trockengewichtes erreichen. In Handelstabaken beträgt die Konzentration zwischen 0,3 und 3%, manchmal sogar bis zu 7%. Nicotin ist auch in anderen Nachtschattengewächsen wie Kartoffeln, Tomaten, Auberginen und Blumenkohl enthalten [78-80].

Für die Aufnahme von Nicotin spielt die Darreichungsform aufgrund der ionischen Eigenschaften von Nicotin ( $pK_a$ -Werte 6,16 und 10,96) eine wichtige Rolle. Im leicht sauren Zigarettenrauch (pH 5,8 - 6,2) ist das Nicotin zu 99% an Partikel gebunden und liegt überwiegend in der ionisierten, wasserlöslichen Form vor [81]. Die kleinen Nicotin-haltigen Partikel gelangen durch Inhalation in die tiefe Lunge, die eine große Oberfläche für die rasche Resorption aufweist. Der Flüssigkeitsfilm auf dem Epithel hat als Puffer einen leicht alkalischen, physiologischen pH-Wert von 7,4. Unter diesen Bedingungen liegt Nicotin überwiegend in seiner lipophilen, nicht-ionisierten Form vor und kann rasch in das Blut aufgenommen werden. Die schnelle Resorption führt zu einer arteriovenösen Differenz der Konzentration von Nicotin, d.h. im arteriellen Blut treten 2-3fach höhere Konzentrationen auf als im venösen Blut. Eine rasche Resorption tritt auch über die Nase, aber nicht über die Mundhöhle ein [82].

Der wichtigste primäre Metabolit von Nicotin ist das Cotinin (Abb. 1–22), zum Metabolismus von Nicotin (vgl. 1.2.3.3) [83]. Nicotin wird nur in geringem Umfang unverändert über die Nieren ausgeschieden. Verteilung und Ausscheidung von Nicotin werden wesentlich von der pH-abhängigen Ionisierung bestimmt. Im sauren Magensaft und Speichel kann es zu einer Anreicherung um mehr als das 50fache gegenüber dem Plasma kommen [84]. Nicotin lagert sich ebenfalls im Haar ein, das für das Biomonitoring genutzt werden kann [85,86]. Die Ausscheidung von unverändertem Nicotin über die Niere kann sich bei alkalischem Urin stark verringern. Nicotin wird auch in die Muttermilch ausgeschieden, bei stillenden Müttern kommt es dadurch zu einer Nicotinbelastung des Säuglings [87-89].

Der Metabolismus von Nicotin erleichtert aber nicht nur dessen Ausscheidung, sondern lässt in geringem Maße reaktive Zwischenstufen entstehen, die zu einer kovalenten Bindung an Proteinen und an der DNA führen können [90-93].

Die Genusswirkungen des Nicotins werden als der Hauptgrund für die Rauchgewohnheit angesehen. Der persönliche Nicotinbedarf, aber auch andere Faktoren wie Geschmack und Reizwirkung im Rachen, bestimmen vornehmlich die Intensität des Rauchens. Sie ist durch Zugfrequenz und Zugvolumen, sowie Dauer und Tiefe der Inhalation gekennzeichnet, weniger durch die Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten. Die sensorischen Effekte werden über den Atemtrakt ausgelöst und über periphere Nervenreizung kommt es innerhalb von Millisekunden zu einer direkten Erregung des Zentralnervensystems (ZNS). Die Abhängigkeit vom Rauchen und die Ausbildung von Entzugssymptomen bei Nicotinabstinenz werden durch die Erregung nicotinischer Acetylcholinrezeptoren (nACh) im ZNS vermittelt, die eine Reihe von indirekten Effekten auf dopaminerge, adrenerge und weitere Transmittersysteme zur Folge haben [94]. Die Vielzahl der durch Nicotin freigesetzten Neurotransmitter, z.B. Dopamin, Noradrenalin, Acetylcholin, Vasopressin, Serotonin und  $\beta$ -Endorphin, führt zu einer uneinheitlichen Gesamtwirkung von Nicotin bei Rauchern und ist schwer vorhersagbar (Abb. 1–17).



**Abb. 1–17 Ausschüttung von Neurotransmittern durch Nicotin und deren zentralnervösen Auswirkungen [95]**

Wie Acetylcholin (ACh) depolarisiert Nicotin die postsynaptische Membran in den sympathischen und parasympathischen Ganglien und an der motorischen Endplatte. In kleinen Dosen ist Nicotin ähnlich ganglienerregend wie ACh, in größeren Dosen erfolgt nach der anfänglichen Erregung die Blockade. In gleicher Weise verhalten sich die vegetativen Zentren im Hirnstamm und verlängertem Rückenmark. Bei längerer Einwirkung von Nicotin kommt es wegen der anhaltenden Depolarisierung zu einer Blockade der ganglionären Erregungsübertragung. Die Blockade des Rezeptors kann die Depolarisierung überdauern. Der Körper reagiert auf diese Blockade, indem er mehr Rezeptoren zur Verfügung stellt (upregulation). Stoppt man die Nicotinzufuhr, sind zu viele Rezeptoren vorhanden,

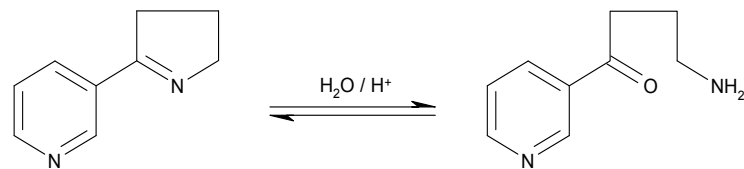
die über hypercholinerge Aktivitäten für die Entzugssymptome verantwortlich sind. Während die Hochregulierung Tage bis Wochen dauert, geht die Wiederanpassung an den nicotinfreien Zustand wahrscheinlich schneller von statten. Bedingt durch die Wirkung des Nicotins auf neuronale nACh-Rezeptoren haben Raucher ein deutlich reduziertes Risiko, an Parkinson oder Alzheimer zu erkranken als Nichtraucher [96,97]. Oral verwendete Tabakwaren weisen eine stärkere Schutzwirkung vor Parkinson auf und unterstützen die Hypothese, dass tatsächlich das Nicotin für den protektiven Effekt verantwortlich ist und keine anderen Rauchinhaltsstoffe [98].

Rauchen stellt einen Risikofaktor für die Entstehung von Parodontose dar. Die Wirkungsmechanismen und die Beteiligung von Nicotin sind aber nicht eindeutig geklärt. Für die Stimulation der Kolonisierung von Epithelien der Zahnschleimhaut mit relevanten Keimen bedarf es in vitro sehr hoher Konzentrationen von Nicotin ( $10^6$  ng/mL). Aufgrund der Anreicherung von Nicotin im Speichel können diese Werte jedoch in der Mundhöhle erreicht werden [99]. Nicotin führt zur Hemmung der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die in der Wundheilung erforderlich ist [100]. In der Mundhöhle und bei Parodontose könnte Nicotin hier eine negative Rolle spielen. Durch die hohe Anreicherung von Nicotin im Speichel und einer eventuellen zusätzlichen Anreicherung im sauren entzündeten Gewebe könnten vor Ort sicher sehr viel höhere Nicotinkonzentrationen erreicht werden als im Blut. Eine Nicotinverabreichung über die Mundhöhle, wie sie beim Verwenden von Snus erfolgt, erweist sich in diesem Zusammenhang als nachteilig.

Raucher haben ein erhöhtes Risiko für Herzinfarkte [101]. Die Mortalität nach einem akuten Herzinfarkt ist aber paradoxerweise bei Rauchern geringer als bei Nichtrauchern [102]. Nicotin selbst erhöht akut leicht den Blutdruck und die Pulsfrequenz und dadurch den Sauerstoffbedarf im Myokard und reduziert die Durchblutung des Herzmuskels durch Konstriktion der Koronargefäße. Ein wesentlicher Unterschied zwischen alleinigem Nicotingenuss und dem Rauchen stellt die Belastung mit Kohlenmonoxid dar, die nur beim Raucher gegeben ist. Mit der erhöhten Kohlenmonoxidbindung am Hämoglobin, beim Raucher im Mittel 5-6% COHb, geht eine reduzierte Versorgung der Herzmuskelzellen mit Sauerstoff, eine Herabsetzung der Reizschwelle für Kammerarrhythmien und eine Polycythämie mit erhöhter Thromboseneigung einher [103]. Epidemiologische Untersuchungen zeigen bei Genießern rauchloser Tabakwaren trotz gleicher Nicotinbelastung wie bei Rauchern kein erhöhtes Infarkttrisiko [104].

### 1.2.3.2 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 (Abb. 1–18), es bildet sich eine primäre Aminogruppe und in 1-Position eine Ketogruppe. Diese Keto-Imin-Tautomerie ist pH-abhängig, bei physiologischem pH liegt das Gleichgewicht weit auf der linken Seite, nur ca. 1% des Myosmins liegen in der offenkettigen Aminoketonform vor [105,106].

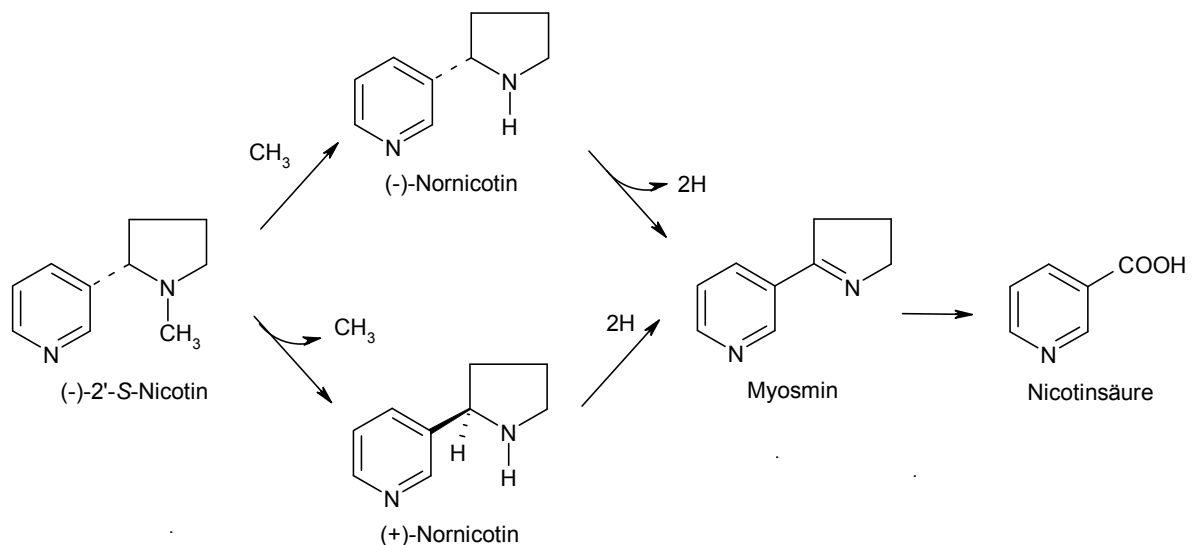


**Abb. 1–18 pH-abhängiges Hydrolysegleichgewicht von Myosmin in saurer Lösung**

Myosmin tritt nur zu einem geringen Anteil in der Alkaloidfraktion der Tabakpflanze auf. In einer luftgetrockneten dunklen Tabaksorte hatte Myosmin einen Anteil von 0,2 bis 1,1% am Gesamtalkaloidgehalt [107]. Je nach Tabaksorte und Herstellungsprozess kann der Myosmingehalt zwischen 9 und 28  $\mu\text{g/g}$  liegen [108].

Das Ausgangsprodukt für Myosmin stellt in der heranwachsenden Pflanze Nicotin dar, das zu Nornicotin demethyliert wird. Durch Dehydrogenierung von Nornicotin wird Myosmin gebildet, welches in weiteren Folgereaktionen zu Nicotinsäure abgebaut wird (Abb. 1–19 [109]).

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 [110]. Myosmin belastet die Luft von Räumen, in denen häufig geraucht wird, mit 0,04 bis 0,185  $\mu\text{g/m}^3$  [111].

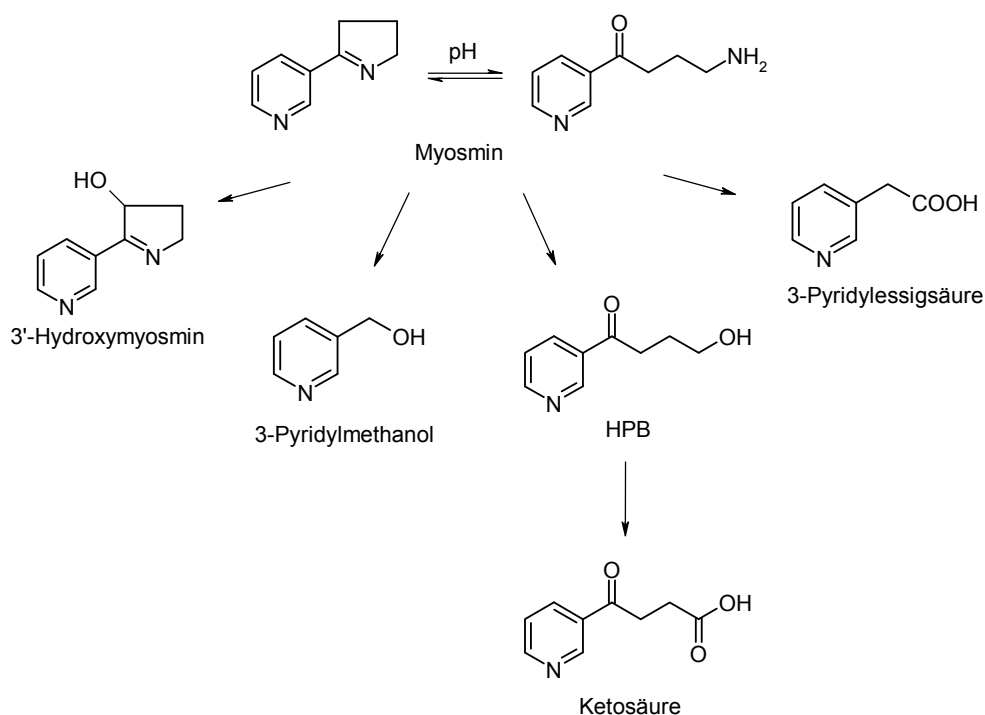


**Abb. 1–19 Bildung von Nornicotin und Myosmin aus Nicotin im Blatt der Tabakpflanze (vereinfachte Darstellung)**

Myosmin wurde nicht nur in der Tabakpflanze identifiziert, sondern in Spuren auch in anderen Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*), in Papaya (*Carica papaya*) [112,113], Nachtjasmin (*Cestrum nocturnum*) [114] und *Duboisia hopwoodii* [115,116], immer in Verbindung mit dem Auftreten von Nicotin. Erste Hinweise auf eine weitere, von Nicotin unabhängige Verbreitung ergaben Untersuchungen von Zwickenpflug et al. [117], die 0,2 bis 2,0  $\mu\text{g/g}$  Myosmin in Erd- und Haselnüssen nachweisen konnten. In weiteren Untersuchungen wurde Myosmin in einer Fülle von pflanzlichen Nahrungsmitteln gefunden. Dabei zeigte sich keine eindeutige Familien- oder Gattungsabhängigkeit. Auch in Milchprodukten wurde Myosmin in Konzentrationen bis über 6  $\text{ng/g}$  nachgewiesen [118].

Zur Toxizität von Myosmin existieren bislang wenige Daten [119,120]. Es liegt nur eine Studie zur  $LD_{50}$  von Myosmin an Ratten vor [121]. Bei oraler Gabe ist Myosmin mit einer  $LD_{50}$  von 1875 mg/kg etwa 10fach weniger giftig als Nicotin. Konvulsionen stehen als Vergiftungserscheinung im Vordergrund, die bei Myosmin etwas schwächer ausgeprägt sind als bei Nicotin. In Hamstern zeigte sich eine Störung der Fruchtbarkeit [122].

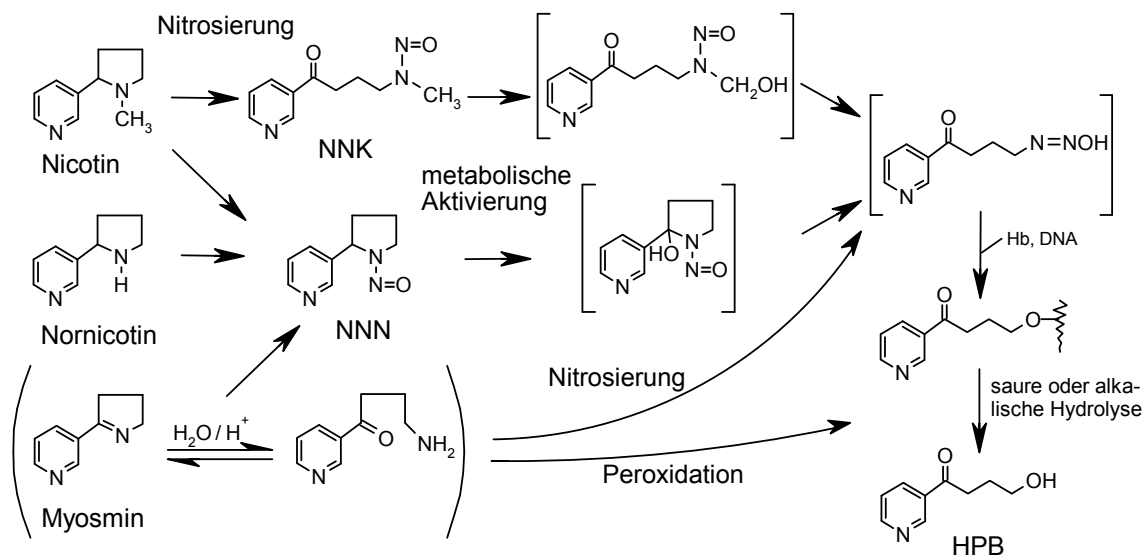
Im Ames-Test konnten keine mutagenen Eigenschaften für Myosmin nachgewiesen werden, es wurde aber die Induktion von DNA-Schäden im Testsystem *Escherichia coli polA<sup>+</sup>/polA<sup>-</sup>* beobachtet [123]. In humanen Nasenschleimhautzellen und Lymphozyten zeigte Myosmin nach in vitro Inkubation eine konzentrations- und zeitabhängige Schädigung der DNA im Comet Assay [124]. Der genotoxische Effekt wurde in humanen Ösophagus-Adenokarzinomzelllinien bestätigt und durch Inkubation im Sauren oder Zugabe nitrosierender Substanzen gesteigert [125]. Ebenso ergaben sich Hinweise auf eine Hemmung der O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase durch Myosmin. In humanen Lymphozyten wird die Mutationsfrequenz im Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen durch Myosmin erhöht [126].



**Abb. 1–20 Metaboliten im Urin von Wistar-Ratten nach oraler Gabe von Myosmin [127]**

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 [128]. Die rasche Elimination mit einer Halbwertszeit von ca. 1 Stunde wurde in einem weiteren Versuch zur Ausscheidung von Myosmin bestätigt [127]. Tritium-markiertes Myosmin wurde nach oraler Gabe innerhalb von 24 h zu über 90% weitgehend im Urin ausgeschieden (Abb. 1–20). Über 70% der Radioaktivität im Urin entfielen auf die beiden Hauptmetaboliten Ketosäure (50-63%) und 3-Pyridylacetic acid (20-26%).

Zwickenpflug [129] beschrieb die Rolle von Myosmin im Rahmen der Bildung von Addukten durch tabakspezifische Alkaloide (Abb. 1–21). Myosmin kann nicht nur zu NNN nitrosiert werden, sondern durch Nitrosierung und Peroxidation direkt in reaktive Zwischenstufen überführt werden, die zur Pyridyloxobutylierung von DNA und Hämoglobin führen [129-131]. Somit können Lebensmittel neben den Tabakprodukten als Quelle für die Entstehung von HPB-DNA-Addukten nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 1–21 Bildung von HPB-Addukten durch Tabakalkaloide (reaktive Zwischenstufen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet)**

### 1.2.3.3 Cotinin

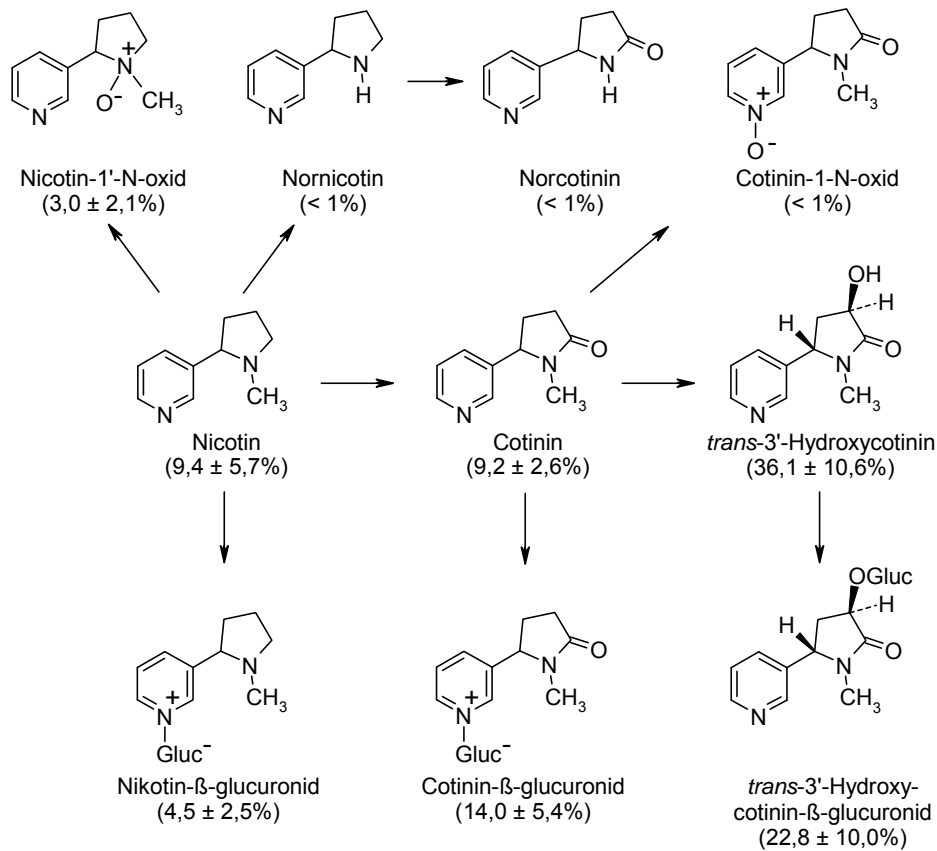
Nicotin wird im Menschen zu 70-80% zu Cotinin metabolisiert (Abb. 1–22, [83,132,133]). Während die Nicotinkonzentration im Plasma einem deutlichen circadianem Rhythmus unterliegt und am Morgen vor der ersten Zigarette einen Tiefpunkt erreicht, sind die Konzentrationen von Cotinin bei gleichmäßigem Rauchen relativ konstant und 10-mal höher als die abendlichen Spitzenwerte für Nicotin. Die tägliche Aufnahme von Nicotin kann deshalb besser mit Hilfe des Cotinins geschätzt werden [134]. Die Substanz ist aufgrund ihrer langen Halbwertszeit von 17 - 18 Stunden [135] im Vergleich zum Nicotin mit 2 - 3 Stunden ein guter Biomarker [136-138] für die Rauchbelastung in Blut, Urin und Speichel. Je 100 ng Cotinin/mL Plasma rechnet man mit einer täglichen Aufnahme von 8 mg Nicotin. Ebenso kann Cotinin in Haaren und Zehennägeln als Marker für die Langzeitexposition nachgewiesen werden [139-141]. Mit Hilfe der gemessenen Mengen kann eine Einteilung in Raucher, Nichtraucher und Passivraucher erfolgen. Dazu bedient man sich der Grenzwerte (cut off-Werte), die in Abhängigkeit der Probenmatrix stehen (Tab. 1–4). Nicotinhaltige Nahrungsmittel können eine zusätzliche Belastung des Menschen mit Cotinin darstellen (vergl. 1.2.3.1), allerdings kommt es auf Grund der geringen aufgenommenen Nicotinmengen kaum zu einer Veränderung der ETS-bedingten Cotininwerte.



**Tab. 1–4 Konzentrationen von Cotinin in verschiedenen Matrices mit entsprechenden cut off-Werten zur Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern**

Cotinin [ng/mL] oder [ng/mg]	NR	Passiv-raucher	Raucher	Cut off	Lit.
Plasma/Serum	0,1 – 0,8	0,4 – 2,0	200 – 300	10 – 20	[136]
Urin	1 – 10	8 – 25	1300 – 1700	60 – 120	[136]
Speichel	< 5	5 – 10	> 100	7 – 28	[137,138]
Haare	< 0,13		0,1 – 5		[139,141]
Zehennägel	< 0,01	0,01 – 0,04	0,23 – 6,4		[140]

Das wichtigste Enzym für den Abbau von Nicotin zu Cotinin ist das Cytochrom P450 Isoenzym 2A6. Wie bei vielen anderen Enzymen des Fremdstoffwechsels beim Menschen gibt es einen genetischen Polymorphismus. Langsame Metabolisierer haben in Relation zu ihrem Zigarettenkonsum deutlich höhere Nicotinkonzentrationen im Plasma und sollten deshalb weniger rauchen und seltener abhängig werden. Wegen der geringen Prävalenz langsamer Metabolisierer bei Kaukasiern, zu denen auch wir Deutsche rechnen, spielt dieser Polymorphismus nur eine untergeordnete Rolle [133,142-144].



**Abb. 1–22 Hauptmetaboliten vom Nicotin beim Menschen mit Angabe der im Urin ausgeschiedenen Mengen der Metaboliten, berechnet auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Nicotin (%) [133]**

## 1.3 Schwedischer rauchfreier Tabak – Snus

Unter dem Begriff Snus wird ein rauchfreier Tabak verstanden, der traditionell in Schweden und zu einem geringeren Anteil in anderen Skandinavischen Ländern verwendet wird. Es ist ein feuchtes, gemahlenes Tabakprodukt, das entweder als loser Tabak oder in Form kleiner abgepackter Beutelchen zwischen der oberen Lippe, dem Lippenbändchen und der Gingiva platziert wird. Snus wird vor dem Entfernen für 25-30 Minuten im Mund belassen. 25% der schwedischen Männer verwenden Snus, bei den Frauen sind es schätzungsweise 3%. Die Tendenz ist zunehmend, gerade in der weiblichen Bevölkerung.

### 1.3.1 Herstellung

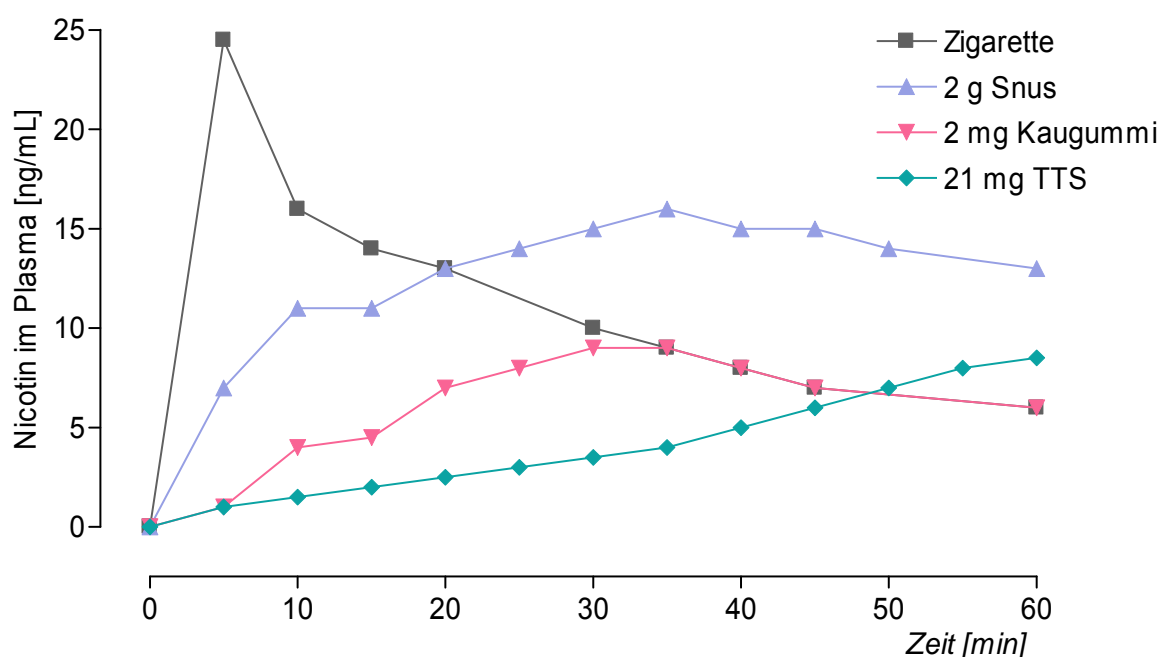
Der schwedische Kautabak enthält eine große Anzahl schädlicher Substanzen, darunter auch krebs-erzeugende tabakspezifische Nitrosamine (TSNA, siehe 1.2.2). Unterschiedliche Tabakpflanzensorten und verschiedene Trocknungsmethoden des Tabaks haben Auswirkungen auf die Nitrit- und TSNA-Gehalte in Tabak vor seiner Weiterverarbeitung [145-147]. Die schwedischen Hersteller von Kautabak verwenden seit Jahren selektierte Tabaksorten, vorwiegend Dark Kentucky und Virginia Tabak mit hohen Nicotin-Gehalten [148], die zunächst sonnen- und luftgetrocknet werden. Hersteller der amerikanischen Kautabaksorten verwenden als Ausgangsmaterial hitzegetrocknete Tabaksorten.

Nach der Vortrocknung wird der Tabak in kleine Stücke geschnitten, nochmals getrocknet, gemahlen und gesiebt. Die schwedischen Hersteller nutzen einen Weiterverarbeitungsprozess, in dem der Tabak mittels Dampf über 24-36 Stunden bei Temperaturen um 100 °C behandelt wird. Dieser Erhitzungsprozess führt zur Abtötung von Bakterien, sodass ein relativ steriles Produkt entsteht [149]. Dieses wird in Metalldosen verpackt und kühl aufbewahrt. Bis zum Verkauf bleibt das Produkt gekühlt, was zu seiner Haltbarkeit beiträgt. Eine Studie untersuchte schwedische Kautabakprodukte auf deren Gehalt an Nitrosaminen, die bei Temperaturen zwischen -20 °C und 20 °C über 20 Wochen aufbewahrt wurden [150]. Dieser stieg nicht signifikant an, obwohl die Produkte über eine lange Zeit unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt waren. Das untermauert die Hypothese, dass der Herstellungsprozess die mikrobiologische Aktivierung von Nitrit unterbindet. Im Gegensatz zur schwedischen Methode nutzen die amerikanischen Hersteller Fermentierungsprozesse ohne hohe Temperaturen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Nitrit- und TSNA-Level in amerikanischen Kautabaksorten signifikant anstiegen, wurden diese bei 37 °C über vier Wochen aufbewahrt [151].

Die Gehalte an TSNA in rauchfreien Tabakprodukten, vorwiegend NNN und NNK, wurden in amerikanischen Sorten im Zeitraum 1980 - 1992 um 90% reduziert [38,152]. Auch in schwedischen Marken wurde ein Rückgang festgestellt, ausgehend von einem deutlich geringeren Level von 7,3 µg/g auf 1,1 µg/g Feuchtgewicht [153]. TSNA konnten in verschiedenen Studien im Speichel der Anwender rauchfreier Produkte nachgewiesen werden [147,154-156].

### 1.3.2 Nicotinfreisetzung aus Snus

Der typische pH des schwedischen Snus liegt im alkalischen Bereich zwischen 7,8 bis 8,5 [146,149]. Dies beschleunigt die Resorption von Nicotin über die Mundschleimhaut, denn nur in seiner unprotonierten Form als freie Base kann Nicotin die Zellmembranen passieren. Brunnemann et al. [157] haben durch Vergleich zweier Sorten von Kautabak gezeigt, dass bei einem pH von 5,8 nur 1 % als unprotoniertes Nicotin vorlag, während bei der zweiten Sorte mit pH 7,99 59% in Form der freien Base entdeckt wurden. Die schwedischen Marken weisen generell höhere pH-Werte auf, als die vergleichbaren amerikanischen rauchfreien Tabakprodukte [146].



**Abb. 1–23 Zeitverlauf der Nicotinkonzentration im Plasma in Abhängigkeit verschiedener Freisetzungssysteme [83]**

Abb. 1–23 zeigt die Nicotinkonzentration im Plasma in Abhängigkeit von der Zeit und verschiedenen Freisetzungssystemen. Aus dem Zigarettenrauch wird Nicotin sehr rasch ins Blut aufgenommen, es kommt innerhalb von 5 Minuten zu einem Anstieg auf Spitzenwerte von mehr als 20 ng Nicotin/mL Plasma. Danach fällt die Nicotinkonzentration innerhalb einer Viertelstunde auf etwa die Hälfte ab. Die Anwendung von schwedischem Snus führt dagegen zu einem langsamen Anfluten des Nicotins mit einem Plateau von 15 ng/mL nach etwa einer halben Stunde. Zu diesem Zeitpunkt hat der Snuser bereits eine höhere Nicotinkonzentration im Blut als der Raucher einer Zigarette [158,159]. Mit dem Kaugummi, der 2 mg Nicotin enthält, wird bei vergleichbarer Aufnahmekinetik nur eine etwa halb so hohe Nicotinkonzentration erreicht wie bei Anwendung von Snus. Ähnlich gering sind die maximalen Nicotinkonzentrationen im Blut nach Applikation von Nicotinplastern (Transdermales Therapeutisches System, TTS), bei sehr viel langsamerer Anflutung als bei dem Kaugummi und dem Snus.

### 1.3.3 Pro und Contra der Anwendung von Snus im Vergleich zum Rauchen

Betrachtet man die unter Kap. 1.3.2 erwähnte Freisetzung von Nicotin aus Snus, entsteht kein Zweifel, dass Snus in gleichem Maße zur Entwicklung von Abhängigkeit führt wie andere Tabakarten auch. Entschließen sich Benutzer von Snus, die oft jahrelange Angewohnheit abzulegen, entwickeln sie typische Abhängigkeits- und Entzugssymptome. Daher wird es oft als schwer empfunden, den eingeschlagenen Weg zu einem Leben ohne den Gebrauch von Snus durchzuhalten.

Im Hinblick auf das Abhängigkeitspotenzial und die Nicotinfreisetzungsrates (Abb. 1–23) zeigt die Anwendung von Snus keine deutliche Überlegenheit gegenüber Zigaretten. Trotzdem wird die Anwendung von rauchfreiem Tabak häufig als sichere Alternative zum Zigarettenrauchen angesehen. Der potentielle Vorteil zur Reduktion des Rauchens wurde vielfach diskutiert.

#### 1.3.3.1 Veränderungen in der Mundhöhle

Rauchfreier Tabak wird seit mehreren Jahrzehnten mit der Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen in Verbindung gebracht und ist durch die IARC seit 1985 als Humankarzinogen eingestuft [44,45,160]. Im Jahr 2001 veröffentlichte das amerikanische Institute of Medicine (IOM) einen Report [161], der ein wesentlich höheres Risiko für die Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen bei Benutzern von Toombak gegenüber Nichtrauchern aus dem Sudan bestätigte. Bei Anwendern von amerikanischem Kautabak wurde vor 1980 ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Mundhöhlenkrebs festgestellt [162,163]. Neuere Studien konnten dies nicht mehr bestätigen [164,165].

Im Gegensatz zu den amerikanischen Ergebnissen gibt es aus Schweden keine älteren Studien, die von einem erhöhten Risiko für Karzinome im Mund-Rachen-Bereich bei Anwendern von schwedischem Snus berichten [163,166]. Wie bereits erwähnt, weist Schweden im Vergleich mit anderen Ländern eine der geringsten Inzidenzraten im Hinblick auf die Krebsentstehung im Bereich der Kopf- und Nackenregion und der Mundhöhle auf. Schildt et al. [167] verglichen in dem Zeitraum von 1980-89 in einer Fall-Kontroll-Studie 410 Patienten mit Mundhöhlenkarzinom mit 410 passenden Kontrollen. 20% aller Probanden benutzten zu dem Zeitpunkt Snus bzw. wurden als ehemalige Benutzer kategorisiert. Es konnte kein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Mundhöhlenkrebs bei aktiven Benutzern von Snus festgestellt werden (OR 0,7). Dagegen hatten starke Raucher und Trinker ein signifikant erhöhtes Risiko mit einem OR von jeweils 1,8 und in der Kombination von bis zu 5,7. Die Studie von Lewin et al. [16] konnte ähnliche Ergebnisse bestätigen. Die 2007 veröffentlichte Studie von Luo et al. [168] schloss 279.897 schwedische Bauarbeiter ein, von denen nach Ausschluss der Raucher noch 125.576 Probanden für die Charakterisierung der Effekte durch die Anwendung von Snus zur Verfügung standen. Ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Mundhöhlenkarzinomen konnte nicht bestätigt werden (RR 0,8, 95%-CI 0,4-1,7).

Die regelmäßige Anwendung von Snus kann zu einem Rückgang des Zahnfleisches, zu Parodontose und Karies führen [169]. Für diese Effekte wird hauptsächlich Nicotin verantwortlich gemacht [170].

Die Stelle der Mundschleimhaut, an der Snus vorwiegend platziert wird, zeigt häufig chronische Verdickung und verstärkte Faltenbildung [169]. Vielfach treten Leukoplakien auf, weiße, nicht abwischbare Effloreszenzen der Schleimhaut. Die Leukoplakien gehören zu den fakultativen Präkanzerosen, die ein Entartungspotential zum Plattenepithelkarzinom zeigen. Diese Gewebeveränderungen sind weitgehend reversibel, wenn die Gewohnheit unterbrochen wird und treten seltener auf, wenn Snus nicht in loser Form, sondern portioniert in kleinen Beutelchen verwendet wird. Es liegt die Vermutung nahe, dass Unterschiede des pH-Werts der Produkte Auswirkung auf das Ansprechen der Gewebe haben. Verglichen mit losem Snus weist abgepackter Snus einen um durchschnittlich 0,5 Einheiten niedrigeren pH auf. Je höher also der pH des Snus, desto stärker können Veränderungen in der Mundschleimhaut auftreten [169].

### 1.3.3.2 Andere Krebserkrankungen

Der Genuss rauchloser Tabakwaren zeigte in den USA keinen Einfluss auf andere Krebserkrankungen, egal ob diese mit dem Rauchen in Zusammenhang standen oder nicht [165]. Folgerichtig hat der Lungenkrebs bei schwedischen Männern auch die geringste Inzidenz in ganz Europa [1]. Einzige Ausnahme könnte der Pankreaskrebs darstellen. Bereits 1983 wurde durch Heuch et al. [171] auf ein erhöhtes Risiko für Krebs der Bauchspeicheldrüse im Zusammenhang mit rauchlosen Tabakprodukten hingewiesen. Die Studie fand ihre Fortsetzung in der prospektiven Kohortenstudie von Bofetta et al. [172], in der von 1966 bis 2001 die Todesursachen von 10.136 Männern aus Norwegen registriert wurden. Davon verstarben 105 (1,04%) an Pankreaskrebs. Bei den Benutzern von Snus konnte ein signifikant erhöhtes Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs (RR 1,67, 95%-CI 1,12-2,50) nachgewiesen werden. Wurde zusätzlich noch geraucht, stieg das RR auf 1,86 (95%-CI 1,13-3,05) an. Allerdings sind diese Ergebnisse äußerst unsicher, weil die Befragung zu Rauchen und Snusen nur zu Beginn der Studie erfolgte. Etwaige Änderungen der Gewohnheiten, insbesondere der mögliche Wechsel von Snusen zu Rauchen oder auch nur das gleichzeitige Rauchen und Snusen könnten das Ergebnis erheblich beeinflussen, denn das Rauchen als Risikofaktor für Pankreaskrebs steht außer Frage. Die schwedische Kohortenstudie von Luo et al. [168] an männlichen Bauarbeitern konnte ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Krebs der Bauchspeicheldrüse bei Benutzern von Snus feststellen. Es wurde als relatives Risiko RR 2,0 (95%-CI 1,2-3,3) bestimmt und Hinweise auf eine Dosis-Risiko-Beziehung gefunden. Auch hier gilt die Einschränkung, dass nur das Ergebnis der ersten Befragung zu Beginn des Eintritts in die Studie für die Einteilung in Snuser und Raucher herangezogen wurde. Die Dosisabhängigkeit bei Snus beruht auf der einfachen Frage, ob die Studienteilnehmer  $<10$  oder  $\geq 10$  Gramm Snus pro Tag benutzten. Weitere amerikanische Studien [173-176] befassten sich ebenfalls mit dem Risiko für das Auftreten von Bauchspeicheldrüsenkrebs in Abhängigkeit von der Anwendung rauchfreier Tabakprodukte. Sie waren allerdings zu klein, um zu belastbaren Ergebnissen zu führen. Eine Metaanalyse kommt zu dem Schluss, dass der Zusammenhang zwischen der Anwendung rauchfreier Tabakpro-

dukte und Pankreaskrebs noch nicht endgültig geklärt ist. Auf jeden Fall ist das Rauchen ein stärkerer Risikofaktor [177].

### 1.3.3.3 Weitere Erkrankungen

Neben Tumorerkrankungen wurde vor allem ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen und dem langjährigen Konsum von oralen Tabaken untersucht. Auch hier gibt es bisher keine eindeutigen Ergebnisse. Das im Tabak enthaltene Nicotin fördert atherosklerotische Erkrankungen durch Einfluss auf den Lipidstoffwechsel und die Koagulation. Zudem kann es hämodynamische Effekte ausüben und Endothelschäden verursachen [95,178]. Nicotin hat einen sofortigen Effekt auf Blutdruck, Herzfrequenz und die Elastizität der Arterien [95,177]. Die Anwendung von rauchfreien Tabakprodukten führt sehr schnell zu erhöhtem kardialen Auswurf und einer Konstriktion der Gefäße [179-181]. Ob das Ausmaß dieser Veränderungen ausreicht, um das Krankheitsrisiko durch die Nicotinaufnahme beim Tabakkauer/Snuser zu erhöhen, ist noch ungewiss. Durch Fettsäuren und Flavonoide, die sich in oral verwendetem Tabak nachweisen lassen, soll sogar ein Schutzeffekt auf Blutgefäße gegeben sein [104]. Epidemiologische und klinische Studien haben in diesem Zusammenhang ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse gebracht [104,164,178,182-189]. Selbst die große INTERHEART-Studie [190] mit Daten aus 52 Ländern konnte ein signifikant erhöhtes Risiko für Herzinfarkt nur bei Tabakkauern feststellen (OR 2,2, 95%-CI 1,4-3,5). Für andere orale Genussformen von Tabak, wie amerikanischer Snuff oder indischer Pan, waren die Fallzahlen immer noch zu gering.

Die Datenlage zur Entwicklung von Diabetes durch Anwendung von Snus ist begrenzt. Während die in der Studie von Persson et al. [191] untersuchten Personen mit familiärer Vorgeschichte von Diabetes bei hohem Konsum von Snus ( $\geq 3$  Packungen) ein erhöhtes Risiko für Typ 2 Diabetes aufwiesen (OR 2,6), konnte die jüngste Studie von Eliasson et al. [192] weder bei Rauchern noch bei Benutzern von Snus eine veränderte Glucosetoleranz bzw. Insulinkonzentration feststellen.

Im Rahmen der Auswertung der Cancer Prevention Study II (CPS II) wurde auch der Zusammenhang zwischen der Erkrankung an Parkinson und der Verwendung von rauchfreien Tabakprodukten untersucht [98]. Das Risiko wurde signifikant niedriger bewertet (RR 0,22, 95%-CI 0,1-0,7) als für Probanden, die rauchten (RR 0,79, 95%-CI 0,7-0,9) und unterstützt die Ergebnisse der Studie von Benedetti [193], die ebenfalls eine stärkere Reduzierung des Risikos, an Parkinson zu erkranken, für Verwender oraler Tabake (OR 1,8, 95%-CI 0,04-0,8) als für Raucher (OR 0,69, 95%-CI 0,5-1,1) feststellte. Es gibt Hinweise, dass Nicotin und weitere Komponenten des rauchfreien Tabaks einen schützenden Effekt bei dopaminergem Zerstörung der Neuronen ausüben [194].

Die Verwendung von Snus zeigt kein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer COPD oder von Lungenkrebs, welche als die beiden vorherrschenden Erkrankungen durch das Rauchen angesehen werden. Die Aufnahme erfolgt nicht über den Respirationstrakt, das Gewebe wird daher nicht direkt mit potentiell krebserzeugenden Stoffen belastet [195].

Rauchloser Tabak stellt für Schwangere keine sichere Alternative dar. Es steht außer Frage, dass das ungeborene Leben durch Verzicht auf jegliche Form von Tabakwaren geschützt werden sollte. Das in allen Tabakwaren enthaltene Nicotin tritt über den mütterlichen Blutkreislauf in den Fetus über. Beim Stillen gelangt es über die Muttermilch in den Blutkreislauf des Neugeborenen. Die Entwicklung des Kindes kann sich prä- und postnatal verzögern [196-199]. Eine Studie [200] wertete Daten des schwedischen Geburtenregisters der Jahre 1999-2000 aus. Die Studie verglich Daten von Neugeborenen von 789 Benutzerinnen von Snus, 11.242 Raucherinnen und 11.500 Nichtraucherinnen. Babys der Benutzerinnen von Snus hatten ein um 40 g reduziertes Geburtsgewicht im Vergleich zu denen der Nichtraucherinnen, Neugeborene von Raucherinnen waren im Durchschnitt sogar 206 g leichter. Frühgeburten traten bei Anwenderinnen von Snus doppelt so häufig auf als bei Nichtraucherinnen. Das erniedrigte Geburtsgewicht könnte damit erklärt werden. Die Gefahr einer Präeklampsie ist bei Benutzerinnen von Snus auch im Vergleich zu Raucherinnen signifikant erhöht. Aufgrund der Datenlage ist unbedingt von der Anwendung von Snus während der Schwangerschaft abzuraten.

## 1.4 Biomonitoring

In der allgemeinen Definition der amerikanischen Gesundheitsbehörde (NIH) sind Biomarker objektiv erfassbare charakteristische Kenngrößen, die als Indikatoren von physiologischen Prozessen, pathologischen Prozessen oder einer medikamentösen Behandlung dienen [201].

In der Arbeits- und Umweltmedizin dient das Biomonitoring der Abschätzung der Belastung des Menschen und des damit verbundenen Gesundheitsrisikos durch Chemikalien in der Umwelt [202]. 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 Art der Aufnahme (oral, dermal oder inhalativ) [202].

Das Biomonitoring des biochemischen Effektes umfasst erste Reaktionsprodukte der Fremdstoffe 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 konnte [66,203].

Marker des biologischen Effekts dienen der Erfassung erster biologischer Effekte durch den Einfluss chemischer Substanzen wie Schwesterchromatidaustauschraten, Chromosomenaberrationen, Strangbrüche, Micronuclei oder Enzymaktivitäten [202].

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

#### **1.4.1 <sup>32</sup>P-Postlabelling**

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 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP entweder direkt oder nach chromatographischer Anreicherung markiert, um die entsprechenden [5'-<sup>32</sup>P]-Desoxyribonukleotid-3',5'-bisphosphate zu erhalten. Die <sup>32</sup>P-markierten DNA-Addukte werden anschließend chromatographisch über Dünnschichtplatten oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von den natürlichen Nukleotiden getrennt und über Radioaktivitätsmessung quantifiziert. Mit Hilfe des <sup>32</sup>P-Postlabellings 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 [204]. Aber auch die reproduzierbare quantitative Bestimmung bereitet große Probleme [205].

#### **1.4.2 Immunoassays**

Mit Hilfe von Antikörpern gegen spezifische DNA- oder Proteinaddukte können diese durch Radioimmunassays oder enzymatische Testsysteme (ELISA) quantitativ bestimmt werden. In Gewebeschnitten lässt sich auch die Verteilung innerhalb eines Organs und in den Zellen selbst durch Immunhistochemie semiquantitativ bestimmen. Ein Hauptproblem ist häufig die mangelnde Spezifität, d.h. es können Addukte von Substanzen mit sehr ähnlicher chemischer Struktur nicht immer eindeutig abgegrenzt werden. Dies kann teilweise durch zusätzliche chromatographische Trennung, z.B. auf Immunitätssäulen behoben werden [206,207].

#### **1.4.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie stellt ein Verfahren mit hoher Spezifität dar, weil sie in großem Maße Auskunft über die Struktur der untersuchten Substanzen erlaubt. Voraussetzung ist eine vorherige Trennung durch verschiedene chromatographische Methoden. Für die nichtflüchtigen Nukleotidaddukte bieten sich vor allem die Hochdruckflüssigkeitschromatographie und die Kapillarelektrophorese an, die jedoch einen hohen apparativen Aufwand erfordern, um das erforderliche Hochvakuum für den



Übergang in das Massenspektrometer zu erreichen. Diese Methoden stehen in unserer Arbeitsgruppe nicht zur Verfügung. Gegenüber der Gaschromatographie haben sie außerdem den Nachteil einer geringeren Nachweisempfindlichkeit. Nachfolgend wird deshalb nur die Gaschromatographie-Massenspektrometrie näher erläutert.

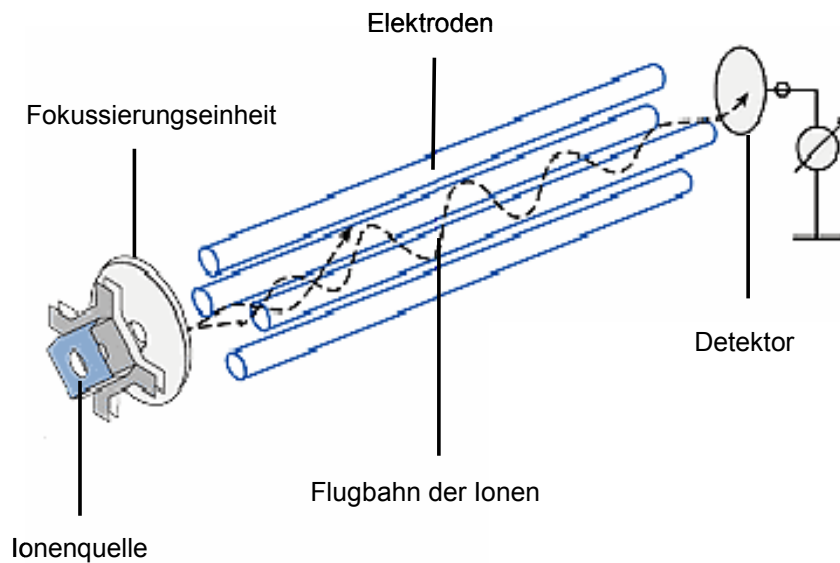
Die Gaschromatographie ist ein in der allgemeinen Analytik häufig verwendetes Verfahren zur Trennung von flüchtigen Substanzen. Ein Gaschromatograph besteht aus einer Trägergasversorgung, einem Injektor, einer Trennsäule, einem Säulenofen und einem Detektor. Die Probe wird in das Gerät injiziert und mit Hilfe eines inerten Trägergases (Stickstoff, Helium) auf die Trennsäule aufgebracht. Die Säule besteht aus einer langen Fused-Silica-Kapillare. Diese ist mit einer hochviskosen, nichtflüchtigen Flüssigkeit beschichtet, die als stationäre Phase dient. 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 [208].

In der Spurenanalytik wird zur eindeutigen Identifizierung eines Stoffes die Massenspektrometrie als Detektionsmöglichkeit verwendet. 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 der Energie von 70 eV beschossen, dadurch entstehen Radikal-Kationen. Im Weiteren kommt es zu zahlreichen Bindungsbrüchen, sodass ein substanzspezifisches Fragmentierungsmuster entsteht. Bei der positiven CI werden die Substanzen nicht direkt ionisiert. 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 den Analyten ionisieren.

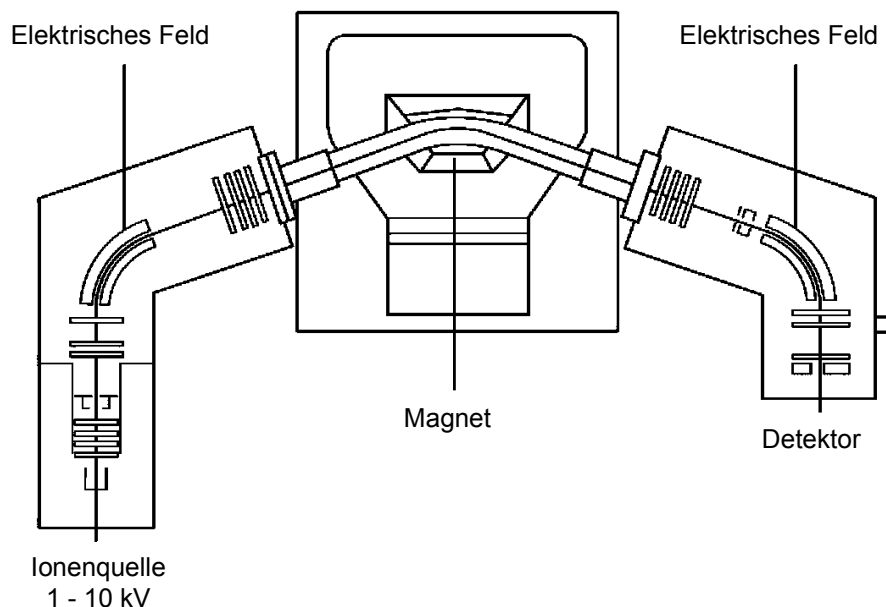
Die negative CI wird auch als Elektroneneinfang-Ionisation bezeichnet. Die CI zählt zu den weichen Ionisationsarten. Es treten weniger Fragmentierungsreaktionen auf als in der EI [209]. Die so entstandenen geladenen Teilchen werden aus der Quelle heraus beschleunigt. Elektrostatische Linsen fokussieren den Ionenstrahl. Im anschließenden Massenanalysator werden die Teilchen nach ihrem Masse-zu-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 (Abb. 1–24) und das Sektorfeld (Abb. 1–25) 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 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 [209]. Bei Sektorfeldgeräten werden die Ionen durch ein Magnetfeld abgelenkt. Die Teilchen beschreiben

dabei eine Kreisbahn, daher ergibt sich für jede Masse ein bestimmter Bahnradius. Je nach Einstellung treffen nur die gewünschten Teilchen auf den Detektor [209].



**Abb. 1–24 Schema eines Quadrupolmassenfilters (modifiziert nach [210])**



**Abb. 1–25 Prinzip eines doppelfokussierenden Massenspektrometers (modifiziert nach [210])**

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 isotoopenmarkierten Analyten zu verwenden ( $^2\text{H}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -markiert), da etwaige Verluste an Analyten im selben Maße den Standard betreffen. Das Verhältnis Analyt zu Standard bleibt über die gesamte Analyse hinweg gleich. Im Massenspektrometer können dann Analyt und Standard getrennt werden. Bei genauer Kenntnis der eingesetzten Menge an isotoopenem Standard kann der Gehalt des Analyten berechnet werden [211].

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Oropharynxkarzinom steht in Deutschland mit einem Anteil von 3,3% an allen bösartigen Neubildungen bei Männern an der siebten Stelle der Krebsneuerkrankungen. Der jahrelange Gebrauch von Tabakwaren ist ein wichtiger Risikofaktor, der durch gleichzeitige Anwendung hochprozentiger Alkoholika multipliziert wird. In vielen westeuropäischen Industrieländern konnte eine Zunahme von Inzidenz und Mortalität festgestellt werden, dagegen weist Schweden die niedrigste Inzidenzrate auf. Eine mögliche Erklärung dafür wird im geringeren Anteil an Rauchern vermutet. Ein Viertel der schwedischen Männer verwendet Tabak in Form des Schwedischen Kautabaks, der als Snus bekannt ist.

Für die tabakspezifischen Nitrosamine 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und das *N*'-Nitrosornicotin (NNN) konnte in Tierversuchen die Entstehung von Tumoren der Mundhöhle nachgewiesen werden. Ebenso wurde gezeigt, dass NNK als Kanzerogen für Lunge und Leber und NNN für den Ösophagus auftreten. Beide Substanzen unterliegen einer metabolischen Aktivierung, die über reaktive Zwischenstufen zu einer Pyridyloxobutylierung der 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.

Myosmin wurde lange Zeit als tabakspezifisches Alkaloid angesehen, bis es in Grundnahrungs- und Genussmitteln ebenso nachgewiesen wurde. In vitro konnte gezeigt werden, dass Myosmin zu NNN oder zu einem instabilen Produkt nitrosiert wird, das ebenfalls zur Pyridyloxobutylierung führt.

Die Zielsetzungen der Tierstudie sind die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung für das Ausmaß der DNA-Schädigungen in den Zielorganen Lunge und Leber, ausgelöst durch die Gabe von NNK und ihre Beeinflussung durch Ethanol. Des Weiteren sollen protektive Effekte ausgewählter antioxidativer Substanzen auf die Entstehung der DNA-Addukte überprüft werden.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Quantifizierung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten in humaner Mundschleimhaut. Um eine mögliche Aussage treffen zu können, wie stark sich der Einfluss von HPB-freisetzenden DNA-Addukten auf das Risiko für die Entstehung von Mundhöhlentumoren auswirkt, sollen Nichtraucher, Raucher und Verwender des schwedischen oralen Tabakproduktes Snus miteinander verglichen werden. Zur Bestimmung des Rauchstatus und der Belastung mit Myosmin werden Speichel- und Plasmaproben der Probanden verwendet. Ebenso sollen die Gehalte an Nicotin, Myosmin und Cotinin als Langzeitmarker für die Rauchbelastung in Zehennagelproben bestimmt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Analysenwaage A-150-SX, Cobes, Spanien

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

Eppendorf Thermomixer, Eppendorf, Hamburg

Gaschromatograph-Massenspektrometer 1:

GC: Serie 8000, Carlo Erba/Fisons, Mailand, Italien – CE Instruments, Mainz

MS: QMD 1000, Carlo Erba/Fisons, Mailand, Italien – CE Instruments, Mainz

Software: MassLab Version 1.3, Fisons

Vakuumpumpe: Edwards High Vacuum Pump E2M2 Two Stage, Crawley, Sussex, England

Kühlmobil, Van der Heijden Labortechnik GmbH, Dörentrup

Gaschromatograph-Massenspektrometer 2:

GC: Serie 8060, Fisons Instruments, Manchester, UK

TRIO 1000 Benchtop GC/MS, Fisons Instruments, Manchester, UK

Software: MassLab Version 1.3, Fisons

Vakuumpumpe: Edwards High Vacuum Pump E2M2 Two Stage, Crawley, Sussex, England

Kühlmobil, Van der Heijden Labortechnik GmbH, Dörentrup

Gaschromatograph-Massenspektrometer 3:

GC: Serie 8060, Carlo Erba/Fisons, Mailand, Italien – CE Instruments, Mainz

MS: VG Autospec M 299 high resolution mass spectrometer, Fisons, Manchester, UK

Software: Opus, Version 3.2 X, Fisons, Manchester, UK

Vakuumpumpe: Edwards High Vacuum Pump E2M12 double Stage 238 l/min rotary pump, Crawley, Sussex, England

GC-Spritze 10  $\mu$ L, Hamilton, Darmstadt

Magnetrührer: Variomag Poly 15, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim

Pipetten von Gilson, Limburg-Offheim:

Microman 1000, 250, 25  $\mu$ L

Pipetman 1000, 200, 20, 10  $\mu$ L

Spektralphotometer UV-265 FW, Shimadzu, Düsseldorf

Überkopfschüttler, Labortechnik Frobel, Lindau

Ultraschallbad Sonorex RK 106, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin

Ultraturrax, Jahnke und Kunkel, Staufen

Vortex Rüttler, Heidolph, Kehlheim

Zentrifugen:

Minizentrifuge Universal 16R, Hettich, Tuttlingen

Minifuge GL, Bachofer, Reutlingen

Sorvall RC5C mit Rotor SS-34, Sorvall Inst. DuPont, Bad Homburg

## 2.1.2 Materialien

Bechergläser 25, 50, 100 und 200 mL, Brand GmbH und Co, Wertheim/Main

Cytobrush Plus<sup>®</sup>, Abstrichbürste, Cooper Surgical Inc., Berlin

500 µL- und 2,5 mL Eppendorf-Gefäße, Sarstedt, Nümbrecht

Filamente:

Rheniumfilament, 5 Windungen, SMS, Idstein (für TRIO 1000)

Rheniumfilament (low emission), 1 Windung, SMS, Idstein (für QMD und Autospec)

GC-Säulen:

VF-5 ms: 5% Phenyl-95% Dimethylsiloxanphase, Varian Inc., Lake Forest (CA), USA,  
L 30 m, ID 0,25 mm, df 0,25 µm, Polaritätsindex 8

VF-17 ms: 14% Cyanopropylphenyl-86% Methylpolysiloxan, Varian Inc., Lake Forest (CA),  
USA, L 30 m, ID 0,25 mm, df 0,25 µm, Polaritätsindex 19, CP 8944

Invisorb<sup>®</sup> Spin Tissue Midi Kit, Invitex, Berlin:

Liner: Splitless Liner Borsilikat, 5 mm, Bezug über SMS, Idstein

Magnetrührstäbchen 15 x 6 mm, PTFE, zylindrisch, Brand, Weilheim

Messkolben 10, 50 und 100 mL, Brand GmbH und Co, Wertheim/Main

Messpipetten aus Glas 10 mL und 20 mL, Brand GmbH und Co, Wertheim/Main

Microvial 100 µL, Zinsser Analytics, Frankfurt

Minivial 1,5 mL Glas mit Silikon PTFE Septen, Zinsser Analytics, Frankfurt

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

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

PP Röhrchen 12 mL mit Schraubdeckel und Fuß, Sarstedt, Nümbrecht

Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL<sup>®</sup>, 10,00 mm, Hellma, Müllheim

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

Salivette<sup>®</sup>, Watterolle ohne Präparierung, Sarstedt, Nümbrecht

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

Spiralfedern für Microvials, Alltech, München

Vollpipette aus Glas 5 mL, Brand GmbH und Co, Wertheim/Main

25 ml Weithalsbechergläser

Wheaton vials 1,5 mL Schraubglas mit teflonbeschichteten Deckeln, Zinsser Analytics, Frankfurt

Zentrifugeneinsätze 16 mL aus PP, Sorvall, DuPont, Bad Homburg

Zentrifugeneinsätze 16 mL Adapter PN 00382 für Rotor SS34 Sorvall, DuPont, Bad Homburg

Zentrifugengläser 20 mL und 50 mL, Schott/Duran, Mainz



- 1 mg HPB/Gefäß mit 100 µL Hexan lösen, je 4 µL in 4 mL Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C einfrieren (entspricht 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 einfrieren (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 einfrieren (entspricht jeweils 5 ng pro Gefäß).
- 5 ng HPB/Gefäß mit 1000 µL Hexan lösen, je 10 µL in 1,5 mL Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C einfrieren (entspricht jeweils 500 pg pro Gefäß).
- D4-HPB-Stammlösungen
    - 5 mg D4-HPB in 10 mL Hexan lösen, je 1 mL in 1,5 mL Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C einfrieren (entspricht 500 µg pro Gefäß).
    - 500 µg D4-HPB/Gefäß mit 100 µL Hexan lösen, je 4 µL in 4 mL Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C einfrieren (entspricht 20 µg pro Gefäß).
    - 20 µg D4-HPB/Gefäß mit 2000 µL Hexan lösen, je 20 µL in 4 mL Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C einfrieren (entspricht jeweils 200 ng pro Gefäß).
    - 200 ng D4-HPB/Gefäß mit 2000 µL Hexan lösen, je 50 µL in 1,5 mL Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C einfrieren (entspricht jeweils 5 ng pro Gefäß).
    - 5 ng D4-HPB/Gefäß mit 1000 µL Hexan lösen, je 10 µL in 1,5 mL Gläschen überführen, eindampfen und bei -20 °C einfrieren (entspricht jeweils 500 pg pro Gefäß).
  - D4-HPB-Standardlösung
    - 500 pg D4-HPB/Gefäß mit 100 µL Dichlormethan lösen (entspricht 5 pg/µL D4-HPB).
  - 0,5 N Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer
    - 0,89 g Dinatriumhydrogenphosphat werden in 10 mL Wasser bidest. gelöst, pH-Einstellung auf pH 7,2 mit konz. Phosphorsäure.
  - 1 N NaOH
    - 0,4 g Natriumhydroxid werden in 10 mL Wasser bidest. gelöst.
  - 4 N NaOH
    - 40 g Natriumhydroxid rotuli werden mit 250 mL Wasser bidest. verdünnt.
  - Proteinase K
    - Die Proteinase K aus dem Invisorb<sup>®</sup> Spin Tissue Midi Kit wird mit 1,5 mL Wasser bidest. gelöst und sofort verbraucht bzw. bei -20 °C eingefroren (Stabilität für 12 Monate garantiert).
  - TMA-Lösung
    - Unter dem Abzug arbeiten und Handschuhe tragen! Alle Gefäße vor der Benutzung mit n-Hexan spülen.
    - 0,3 g Trimethylamin-HCl in 20 mL Wasser bidest. lösen. 0,2 g Natriumhydroxid in 5 mL Wasser bidest. lösen. Beide Lösungen vereinigen, 10 min stehen lassen. 20 mL abnehmen und im Scheidetrichter mit 20 mL n-Hexan extrahieren.
  - VM 1
    - Vormischung 1 für Derivatisierung
    - 10 µL Pentafluorbenzoylchlorid mit 490 µL Dichlormethan mischen.

- VM 2                                      Vormischung 2 für Derivatisierung  
50 µL VM 1 mit 2,5 mL TMA-Lösung mischen.
- Wash Buffer                                Der Wash Buffer aus dem Invisorb<sup>®</sup> Spin Tissue Midi Kit wird  
mit 105 mL Ethanol vermischt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bestimmung HPB-freisetzender Addukte in Tierstudien

Die Tierversuche wurden unter Leitung von Dr. Maciej Stepnik im Laboratory of Molecular Toxicology, Department of Toxicology and Carcinogenesis, Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz, Polen durchgeführt. Für die Analyse von HPB-freisetzenden DNA-Addukten wurde uns Gewebe oder DNA von Leber und Lunge männlicher Wistar-Ratten zur Verfügung gestellt. Die Ratten stammten aus der Abteilung für Tierzucht des Nofer Instituts, hatten zu Beginn der jeweiligen Studien ein Alter von 8-10 Wochen und wurden entweder einzeln oder in Gruppen von zwei bis drei Tieren bei 21±2 °C und einem 12:12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Alle Tiere hatten Zugang zu einer standardisierten Diät für Nagetiere (AIN 93) und Wasser *ad libitum*.

#### 2.2.1.1 Vorversuch zur Dosisfindung für die NNK-Belastung

Die Ratten wurden randomisiert in 10 Gruppen mit je 4 Tieren unterteilt. Die einzelnen Gruppen erhielten 1, 3 oder 5 ppm NNK in Trinkwasser *ad libitum* für einen Zeitraum von 2, 3 oder 4 Wochen, während die Kontrollgruppe über 4 Wochen lediglich Trinkwasser *ad libitum* bekam (Tab. 2–1). Das mit NNK versetzte Trinkwasser wurde alle 3-4 Tage frisch zubereitet und in lichtgeschützten, braunen Glasflaschen bis zur Verwendung aufbewahrt. Körpergewicht, Wasser- und Futterverbrauch wurden 2 × pro Woche erfasst.

**Tab. 2–1 Dosisplan für die Gabe von NNK über das Trinkwasser im Vorversuch**

<b>Exposition NNK</b>	<b>1 ppm NNK</b>	<b>3 ppm NNK</b>	<b>5 ppm NNK</b>	<b>Kontrolle</b>
2 Wochen	4 Tiere	4 Tiere	4 Tiere	-
3 Wochen	4 Tiere	4 Tiere	4 Tiere	-
4 Wochen	4 Tiere	4 Tiere	4 Tiere	4 Tiere
Summe	12 Tiere	12 Tiere	12 Tiere	4 Tiere

Am Versuchsende wurden die Ratten entblutet und das Blut sowie Leber, Lunge, Ösophagus und Pankreas bei -80 °C tiefgefroren. Dr. Panagiotis Georgiadis vom Institute of Biological Research and Biotechnology der National Hellenic Research Foundation in Athen erhielt die tiefgefrorenen Organe auf Trockeneis zur Isolierung der DNA. Aliquote der DNA wurden auf Trockeneis zu unserer Forschungsgruppe in München gesendet.



Die anschließende Aufarbeitung des Leber- und Lungengewebes erfolgt wie unter 2.2.2.2 und 2.2.2.5 beschrieben. In der Vorschrift wurde lediglich die Konzentration des Internen Standards geändert. Der Interne Standard D4-HPB wurde mit 500 pg/Probe zugesetzt. Dazu wurde eine D4-HPB-Stammlösung von 5 ng D4-HPB/Gefäß gelöst mit 100 µL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und davon je Probe 10 µL pipettiert.

### 2.2.1.2 Interaktion von NNK und Ethanol

Die Ratten wurden in 6 Untersuchungsgruppen mit je 9 Tieren randomisiert (Tab. 2–2). Die Kontrolltiere (Gruppe I) erhielten Diät und Trinkwasser *ad libitum*. NNK und Ethanol wurden dem Trinkwasser zugesetzt.

**Tab. 2–2 Dosisplan für die Gabe von NNK und Ethanol über das Trinkwasser**

<b>Gruppe</b>	<b>Behandlung</b>
I	Kontrolle
II	1 ppm NNK
III	5 ppm NNK
IV	10% Ethanol
V	10% Ethanol + 1 ppm NNK
VI	10% Ethanol + 5 ppm NNK

Nach einer Behandlungsdauer von 4 Wochen wurden die Tiere getötet. Für die Bestimmung von DNA-Addukten wurde die halbe Leber und der rechte Lungenflügel bei -80 °C eingefroren und auf Trockeneis nach München geschickt.

Die anschließende Aufarbeitung des Leber- und Lungengewebes erfolgt wie unter 2.2.2.2 bis 2.2.2.5 beschrieben. Durchschnittlich wurden 154 mg Lungen- und 168 mg Lebergewebe eingewogen. In der Vorschrift wurde die Konzentration des Internen Standards geändert. Der Interne Standard D4-HPB wurde mit 500 pg/Probe zugesetzt. Dazu wurde eine D4-HPB-Stammlösung von 5 ng D4-HPB/Gefäß gelöst mit 100 µL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und davon je Probe 10 µL pipettiert.

### 2.2.1.3 Chemopräventionsstudie: Einfluss von Antioxidantien auf die DNA-Adduktbildung durch NNK und ihre Modulation durch Ethanol

Für die Untersuchung chemopräventiver Eigenschaften bekannter Antioxidantien gegen NNK mit oder ohne gleichzeitige Ethanolbelastung wurden 13 Gruppen mit jeweils 9 Ratten nach dem in Tab. 2–3 gezeigten Schema behandelt.

Die Kontrollgruppe erhielt während der gesamten Studiendauer nur die AIN-93 Diät und Wasser *ad libitum*. Es wurden jeweils 4 Gruppen in die Behandlungsarme NNK (Gruppen II-V), Ethanol (Gruppen VI-IX) und NNK + Ethanol (Gruppen X-XIII) eingeteilt. Je eine Gruppe aus jedem Behandlungsarm erhielt 5 Wochen Kontrollfutter oder Futter mit 7 g/kg Futter Ellagsäure, 3 g/kg Chlorophyllin

oder 10 g/kg Vitamin E. Nach einer Woche erfolgte für 4 Wochen die zusätzliche Exposition mit 5 ppm NNK, 10% Ethanol oder mit beiden Substanzen über das Trinkwasser.

Am Versuchsende wurden die Ratten getötet und umgehend Leber- und Lungengewebe entnommen und auf Trockeneis zu unserem Arbeitskreis gesendet.

**Tab. 2–3 Dosisplan für die Chemopräventionsstudie. NNK und Ethanol wurden 4 Wochen über das Trinkwasser verabreicht. Die Gabe von Ellagsäure, Chlorophyllin und Vitamin E begann eine Woche früher und erfolgte 5 Wochen über das Futter.**

<b>Gruppe</b>	<b>Behandlung</b>
I	Kontrolle
II	5 ppm NNK
III	5 ppm NNK + 7 g/kg Ellagsäure
IV	5 ppm NNK + 3 g/kg Chlorophyllin
V	5 ppm NNK + 10 g/kg Vitamin E
VI	Ethanol, 10% im Trinkwasser
VII	10% Ethanol + 7 g/kg Ellagsäure
VIII	10% Ethanol + 3 g/kg Chlorophyllin
IX	10% Ethanol + 10 g/kg Vitamin E
X	5 ppm NNK + 10% Ethanol
XI	5 ppm NNK + 10% Ethanol + 7 g/kg Ellagsäure
XII	5 ppm NNK + 10% Ethanol + 3 g/kg Chlorophyllin
XIII	5 ppm NNK + 10% Ethanol + 10 g/kg Vitamin E

Die Aufarbeitung des Leber- und Lungengewebes erfolgt wie unter 2.2.2.3 bis 2.2.2.5 beschrieben. Durchschnittlich wurden 128 mg Lungen- und 125 mg Lebergewebe eingewogen. In der Vorschrift wurde die Konzentration des Internen Standards geändert. Der Interne Standard D4-HPB wurde mit 500 pg/Probe zugesetzt. Dazu wurde eine D4-HPB-Stammlösung von 5 ng D4-HPB/Gefäß gelöst mit 100 µL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und davon je Probe 10 µL pipettiert.

## **2.2.2 Einfluss von Rauchen und Snusen auf HPB-freisetzende DNA-Addukte in humaner Mundschleimhaut**

In der Humanstudie stand die Bestimmung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten in der Mundschleimhaut im Vordergrund. In der Studie wurde der Einfluss des Rauchens und des Genusses von schwedischem Snus untersucht. Zusätzlich wurde die Belastung mit Tabakalkaloiden in Speichel und Zehennägeln als Kurz- bzw. Langzeitmarker gemessen.

In die vorliegende Studie wurden 45 Nichtraucher aus München, 92 Raucher, davon 26 aus München und 66 aus Lodz, Polen sowie 33 Benutzer von schwedischem Snus aus Helsingborg, Schweden ein-

geschlossen. Die Proben von den polnischen Probanden wurde von Frau Dr. Jola Gromadzinska vom Department of Toxicology and Carcinogenesis, Nofer Institute of Occupational Medicine, in Lodz, Polen, gesammelt. Die schwedischen Proben wurden freundlicherweise durch das Team von Prof. Karl Olov Fagerström, Helsingborg gesammelt und uns zur Verfügung gestellt. Alle Probanden waren gesunde Freiwillige mit guter oraler Hygiene. Mit Hilfe eines Fragebogens wurden Alter, Rauch-, Snus- und Trinkverhalten, Ernährungsgewohnheiten und Schulbildung erfasst (siehe Anhang A-3).

Um den Rauchstatus der Probanden zu bestimmen, wurde Cotinin in Proben von Speichel, Plasma und Zehennägeln gemessen. In allen Proben wurde zusätzlich Myosmin bestimmt, in Plasma und Zehennägeln auch noch Nicotin. Von den Probanden aus München und Schweden wurde Speichel mit Hilfe einer Salivette<sup>®</sup> aufgefangen. Abschnitte von Zehennägeln wurden von allen Schweden und einem ausgewählten Teil der Münchner Probanden gesammelt. Von den polnischen Probanden erhielten wir Plasmaproben. Alle Proben wurden sofort nach der Entnahme bei -20 °C eingefroren.

Die analytische Methode und ein Teil der Ergebnisse für Nichtraucher und Raucher wurden von Frau Schütte-Borkovec in ihrer Dissertation niedergelegt und bereits veröffentlicht [212,213]

### **2.2.2.1 Gewinnung der Proben aus oraler Mucosa**

Die Zellen der Mundschleimhaut wurden von den Innenseiten der rechten und linken Wange entnommen. Dazu wurde je Seite eine Entnahmebürste (Cytobrush Plus<sup>®</sup>) für ca. 2 min mit moderatem Druck auf der Wangenschleimhaut hin- und herbewegt und danach in einem PP-Röhrchen (12 mL) aufbewahrt. Die Benutzer von Snus wurden gebeten, eine weitere Probe von der Stelle zu sammeln, an der der Snus vorwiegend platziert wird. In der Regel ist dies der Bereich zwischen der oberen Lippe und dem Lippenbändchen. Somit konnten bei Nichtrauchern und Rauchern nach der Aufarbeitung der Proben Doppelbestimmungen der HPB-freisetzenden DNA-Addukte, bei Snusern Dreifachbestimmungen durchgeführt werden.

### **2.2.2.2 Isolierung der DNA aus oralen Mucosazellen**

Für die Isolierung der DNA wurde der Invisorb Spin Tissue Midi Kit<sup>®</sup> verwendet. Die Bürstchen wurden nach Behandlung mit 2 mL „Lysis Buffer G“ und 80 µL „Proteinase K Solution“ bei 52 °C über mindestens 4 Stunden im Thermomixer inkubiert, um die Zellen in Lösung zu bringen und die Proteine zu zerstören. Danach wurden die Bürstchen entnommen und vorsichtig ausgedrückt. Nach Zugabe des „Binding Buffer T“ wurde die entstandene Suspension in einen „Spin Filter“ überführt, der vorher auf ein neues Tubenröhrchen aufgesetzt wurde. Der Filter wurde bei 52 °C für 1 min im Thermomixer inkubiert. Damit erfolgte eine Aktivierung des Filters, der die DNA für Waschw Zwecke mit ethanolischem „Wash Buffer“ zurückhielt. Der Filter wurde anschließend bei 40-50 °C im Trockenschrank für mindestens 20 min getrocknet. Bei zu kurzer Trockenzeit hätte verbliebenes restliches Ethanol die nachfolgende Elution der DNA vom Filter verhindern können. Der getrocknete Filter wurde auf ein neues Probenröhrchen aufgesetzt, mit 500 µL eines 52 °C warmen „Elution Buffer D“

behandelt und 6 min bei 52 °C inkubiert. Die DNA konnte bei 4000 rpm über 5 min aus dem Filter heraus zentrifugiert werden. Danach wurde sie in ein Eppendorf-Gefäß mit 2,5 mL überführt.

### 2.2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels UV/VIS-Spektrometrie

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch UV/VIS-Spektrometrie mit Hilfe von Glas-*kuvetten*. Vor der Messung wurde ein Blindabgleich mit Wasser bidest. durchgeführt. Dazu wurden 140 µL DNA-Lösung verwendet und die Extinktion bei 230, 260 und 280 nm gemessen und bei Bedarf entsprechend verdünnt. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 und 280 nm ergibt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren. Bei reinen DNA-Lösungen liegt das Verhältnis zwischen 1,8 und 2,2. Niedrigere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte können ein Anzeichen für die Anwesenheit von RNA sein oder darauf hindeuten, dass die DNA denaturiert ist. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 und 230 nm ermöglicht ein Abschätzen des Salzgehaltes der Probe.

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

$$2-1: \text{DNA} [\text{mg} / \text{mL}] = \frac{(oD_{260} / 20) \times (1000 + \text{Aliquotvolumen})}{\text{Aliquotvolumen}}$$

### 2.2.2.4 Saure Hydrolyse und Aufreinigung des Addukts

Die Freisetzung des HPB aus der DNA erfolgte mit Hilfe der sauren Hydrolyse. Dazu wurden 500 µL DNA-Lösung im Eppendorf-Cup mit 105 µL 4 N HCl versetzt. Nach Zugabe von 50 pg D4-HPB als Internen Standard erfolgte die Hydrolyse bei 80 °C über 3 Stunden im Trockenschrank.

Anschließend wurde durch zweimaliges Extrahieren mit jeweils 500 µL Dichlormethan die Lösung aufgereinigt. Dazu wurden die Eppendorf-Cups für 10 min in einen Überkopfschüttler eingespannt und die Phasen 10 min bei 34-36 rpm gemischt. Um eine Trennung der Phasen zu ermöglichen, wurde anschließend für 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die untere Dichlormethan-Phase wurde verworfen.

Um HPB zur weiteren Aufarbeitung in die organische Phase zu überführen, wurden 410 µL 1 N NaOH und 100 µL 0,5 N Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer zugesetzt. Damit konnte die Einstellung eines pH-Wertes zwischen 7,2 und 7,5 sichergestellt werden, welcher für die quantitative Gewinnung des HPB notwendig ist.

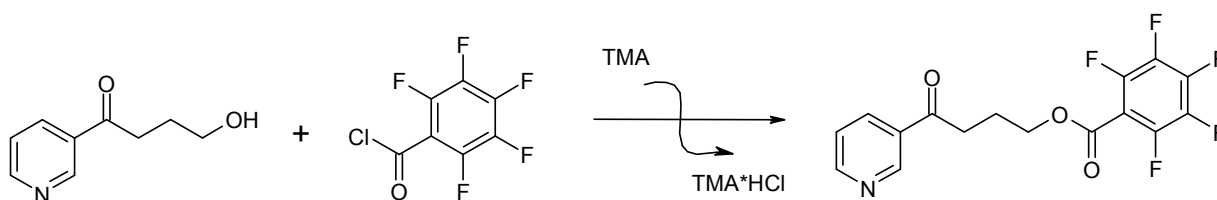
Die Überführung des HPB in die organische Phase erfolgte durch 4-maliges Ausschütteln mit jeweils 300 µL Dichlormethan. Dazu wurden die Eppendorf-Cups für 10 min in den Überkopfschüttler eingespannt und anschließend für 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde in 1,5 mL Vials überführt, unter Stickstoff eingengt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C tiefgefroren.

### 2.2.2.5 Derivatisierung von HPB

Für einen quantitativen Nachweis des HPB mittels GC/MS ist eine Derivatisierung notwendig mit dem Ziel, eine leicht flüchtige und gut ionisierbare Substanz zu erhalten (Abb. 2–1).

Dazu wurde das eingeeengte HPB zunächst mit 123,8  $\mu\text{L}$  Dichlormethan wieder in Lösung gebracht. Die Derivatisierungslösung wurde für jeden Ansatz frisch hergestellt: 10  $\mu\text{L}$  Pentafluorbenzoylchlorid wurden mit 490  $\mu\text{L}$  Dichlormethan gemischt (VM 1). Davon wurden 50  $\mu\text{L}$  entnommen und mit 2,5 mL TMA-Lösung versetzt. 126,2  $\mu\text{L}$  dieser VM 2 wurden zur gelösten Probe zugesetzt. Um eine möglichst hohe Derivatisierungsrate zu erzielen, wurde die Mischung über 2 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Einengen zur Trockne mittels Stickstoff gestoppt.

Nachdem die Proben mit 80  $\mu\text{L}$  einer Mischung aus Hexan/Dichlormethan im Verhältnis 60/40 erneut suspendiert wurden, konnten sie in ein 100  $\mu\text{L}$  Microvial überführt, zur Trockne eingedampft und bis zur GC/MS Analyse tiefgefroren werden.

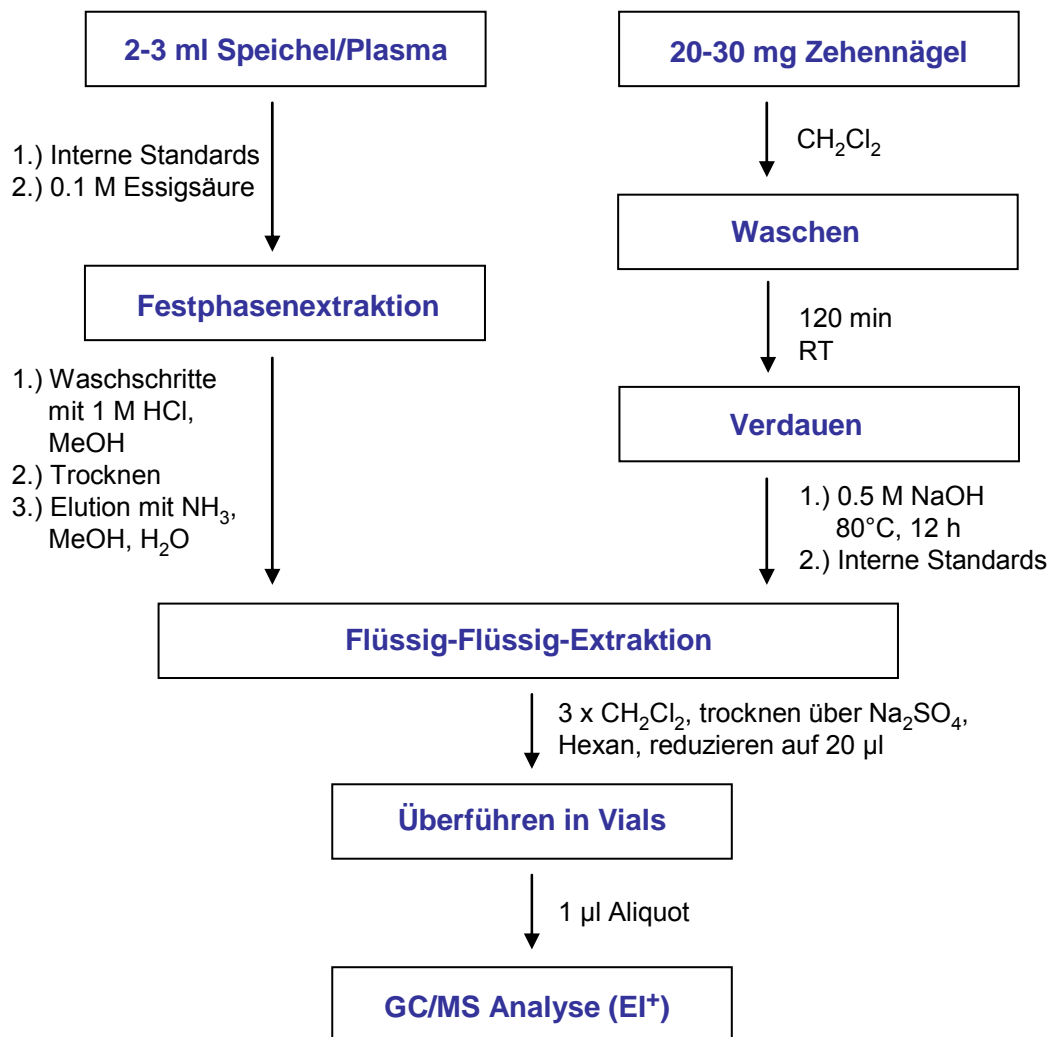


**Abb. 2–1 Derivatisierung des HPB ( $m/z$  165,0790) mit Pentafluorbenzoylchlorid (PFBC). Unter Einfluss des Trimethylamins (TMA) entsteht das leichter flüchtige Derivatisierungsprodukt ( $m/z$  359,0581).**

### 2.2.2.6 Speichelproben

Zur Bestimmung von Rauchstatus und Myosminbelastung wurden Speichelproben mittels Salivette<sup>®</sup> gesammelt. Die Watterolle wurde für 90 s unterhalb der Zunge behalten, um eine Speichelmenge von 2-3 mL zu sammeln. Nach Entnahme wurde die Watterolle im zugehörigen Gefäß bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Speichel in ein 12 mL PP-Röhrchen überführt. Die Plasmaproben wurden aus heparinisiertem venösen Blut durch Zentrifugation gewonnen. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden diese Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Nach Zugabe der Internen Standardlösung mit D3-Cotinin und D4-Myosmin wurden die Proben mit 4 mL einer 0,1 M Essigsäure angesäuert und einer Festphasenextraktion mittels SPE-Säulen unterzogen. Zum Waschen der Proben wurden 3 mL 1 M HCl und 2 x 3 mL MeOH verwendet und unter Vakuum getrocknet. Es wurden je 2 mL einer Lösung aus 5% NH<sub>3</sub> in 70%igem MeOH zum Eluieren verwendet. Während der anschließenden Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und in Hexan überführt. Diese Phase wurde eingeeengt auf 20  $\mu\text{L}$  und mit Hilfe von GC/MS im EI<sup>+</sup>-Modus gemessen. Der Analysengang ist in der Abb. 2–2 schematisch dargestellt.



**Abb. 2–2 Analyse von Myosmin und Cotinin und in Speichel, Plasma und Zehennägeln mit den internen Standards D4-Myosmin und D3-Cotinin und von Nicotin in Zehennägeln (interner Standard D3-Nicotin) (modifiziert nach [140,212])**

### 2.2.2.7 Zehennagelproben

Zur Untersuchung von Nicotin, Myosmin und Cotinin als Marker für die Langzeitbelastung wurden Proben von Zehennägeln gesammelt. Der vorderste Teil der Nägel wurde mit Hilfe einer Nagelschere entfernt und nach rechter und linker Körperseite getrennt in einem Eppendorf-Cup gesammelt.

Für die Analyse wurden die Nagelabschnitte zerkleinert und 120 min in 2 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen. Nach dem Abpipettieren des CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurden die Proben bei geöffnetem Deckel 10 min bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet. Die getrockneten Proben wurden mit 0,5 mL einer 1 M NaOH zur Verdauung angesetzt und bei 80 °C im Trockenschrank über 12 h inkubiert. Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe der Internen Standardlösung mit D3-Cotinin, D3-Nicotin und D4-Myosmin und im Anschluss die Flüssig-Flüssig-Extraktion wie in Abb. 2–2 gezeigt.

Die Aufarbeitung und Derivatisierung der Proben wird ausführlich in der Dissertation von Schütte-Borkovec [212] beschrieben.

## 2.3 GC-MS Analysen

### 2.3.1 Chromatographische Bedingungen

#### 2.3.1.1 Gaschromatograph-Massenspektrometer QMD 1000

Der Nachweis des HPB in den Proben des Vorversuchs für die Dosisfindung von NNK für die Tierstudien erfolgte mit Hilfe eines Gaschromatographen der Serie 8000 und eines Quadrupol Massenspektrometers QMD 1000 der Firma Carlo Erba/Fisons. Gemessen wurde mit negativ chemischer Ionisation (NCI), welche eine hohe Nachweisempfindlichkeit sicherstellte.

Von der in 10 µL Hexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> resuspendierten Lösung des derivatisierten HPB wurde 1 µL in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Probenaufgabe erfolgte im splitless Verfahren mit einer Schließzeit der Ventile (Top/Bottom) von 1 min. Die Trennung erfolgte auf einer VF-5 ms Kapillarsäule, als Trägergas diente Helium der Qualität 5.0 mit einem konstanten Druck von 20 psi (1,5 bar) und einer Flussrate von 2 mL/min. Methan wurde mit einem Flaschenvordruck von 2,5 bar und einer Flussgeschwindigkeit von ca. 1,5 mL/min als Ionisierungsgas verwendet.

Die Temperaturen im Injektorblock und der Transferline betragen 250 °C.

Folgendes Temperaturprogramm wurde für die quantitative Bestimmung des derivatisierten HPB und dessen Internen Standards verwendet:

- 2 min bei 50 °C halten,
- Heizen mit 20 °C/min bis auf 180 °C,
- Heizen mit 10 °C/min bis auf 250 °C,
- Heizen mit 25 °C/min bis auf 280 °C,
- 4 min bei 280 °C halten.

Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV bei einer Quelltemperatur von 115 °C, die mit einem 1-Wendel-Filament aus Rhenium erzeugt werden konnte. Die Spannung des Photomultipliers betrug 580 V. Die dwell time betrug 0,08 sec, der inter channel delay 0,02 sec und der span 0,10 sec. Für eine Optimierung der Detektionsparameter wurde das Referenzgas Heptacosyl FC 43 verwendet, dessen charakteristische Massenzahlen m/z 333, 414, 452 und 595 auf optimale Bedingungen eingestellt wurden. Dazu wurden 1x wöchentlich die Fokussierungslinsen der MS-Ionenquelle durch Variation der angelegten Spannung auf ihr Optimum getrimmt und damit eine Verbesserung der Auflösung erhalten.

#### 2.3.1.2 Gaschromatograph-Massenspektrometer VG Autospec M 299

Der Gaschromatograph Fisons 8060 und das hochauflösende doppelfokussierende Massenspektrometer VG Autospec M 299, Fisons wurde für die Bestimmung der HPB-Addukte in den beiden Hauptversuchen der Tierstudien eingesetzt. Für die Bestimmung von HPB-Addukten aus humanen oralen Mucosazellen war diese Gerätekonfiguration unerlässlich. Das statische Ionentrennsystem des

Massenspektrometers ermöglicht eine höhere Nachweisempfindlichkeit durch ein verbessertes Auflösungsvermögen im Vergleich zu einem Quadrupol-Massenspektrometer.

Die chromatographische Auftrennung erfolgte über eine VF-17 ms Kapillarsäule mit Helium als Trägergas bei einer Flussrate von 0,9 mL/min. Der split/splitless Injektor wurde bei 270 °C im splitless Verfahren betrieben.

Das Temperaturprogramm wurde auf folgende Parameter eingestellt:

2 min bei 50 °C halten,  
 Heizen mit 20 °C/min bis auf 180 °C,  
 Heizen mit 10 °C/min bis auf 250 °C,  
 Heizen mit 20 °C/min bis auf 300 °C,  
 8 min bei 300 °C halten.

Die Temperatur in der Transferline wurde bei 250 °C gehalten.

Um Messungen mit negativ chemischer Ionisation (NCI) durchführen zu können, wurde als Ionisierungsgas Ammoniak mit einem Druck von 2,73 kPa eingesetzt. Ammoniak hinterlässt weniger Ablagerungen auf dem Filament und der Inneren Quelle als Methan und verlängert die Lebensdauer der Filamente. Das 1-Wendel-Filament aus Rhenium wurde auf 115 °C gehalten. Die Elektronenenergie wurde auf 255 eV und der Emissionsstrom auf 1,00 mA eingestellt. Die dwell time betrug 0,05 sec, die delay time 0,01 sec und die totale Scanzeit 0,34 sec. Im SIM-Modus wurden die Ionen bei einer Auflösung von 5000 auf 5 kV beschleunigt und die Massenzahlen m/z 359,0581 für das HPB und 363,0828 für den Internen Standard D4-HPB aufgezeichnet.

### 2.3.1.3 Berechnung des Gehalts an HPB

Für die quantitative Bestimmung wurde die Peakfläche des entsprechenden Ions (D0-HPB) durch die Fläche des internen Standards (D4-HPB) geteilt und mit den Verhältnissen der Molekulargewichte ( $M [D0-HPB]/M [D4-HPB]$ ) und der absoluten Menge des zugesetzten internen Standards (Menge [D4-HPB]) multipliziert. Dieser Wert wurde durch die Menge an eingesetzter DNA dividiert. Man erhält die Menge HPB in fmol/mg DNA mit folgender Formel:

$$2 - 2: \text{Menge} [D0 - HPB] = \frac{(\text{Fläche} [D0 - HPB] - \text{Blindwert}) \times M [D0 - HPB] \times \text{Menge} [D4 - HPB]}{(\text{Fläche} [D4 - HPB] - \text{Blindwert}) \times M [D4 - HPB] \times \text{Menge} [DNA]}$$

Für eine korrekte Berechnung wurde der Blindwert aus parallel aufgearbeiteten Proben, die reinen „Elution Buffer D“ enthielten, in gleicher Form berechnet und abgezogen.

### 2.3.1.4 Gaschromatograph-Massenspektrometer TRIO 1000

Für die Bestimmung der Tabakalkaloide in Speichel, Plasma und Zehennägeln kam das Quadrupol-Massenspektrometer TRIO 1000 im EI-Modus zum Einsatz.



### 2.3.2 Validierung der Methoden

Das Verfahren der Validierung der Methoden zur Bestimmung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten wurde in der Dissertation von Heppel [70] ausführlich beschrieben und ist bereits publiziert [69]. Die Validierung der Bestimmung von Tabakalkaloiden in Speichel, Plasma und Zehennägeln wurde in der Dissertation von Schütte-Borkovec [212] beschrieben und ebenfalls publiziert [213]. Die Methodenvalidierung ist ein wichtiges Instrument der Qualitätssicherung. Sie soll Auskunft darüber geben, ob eine Analysenmethode geeignet ist, eine vorgegebene spezifische Aufgabe zu erfüllen. Die Zuverlässigkeit der Methode soll dokumentiert und die kritischen Schritte der Methode geprüft werden. Eine Validierung umfasst Richtigkeit, Präzision, Linearität, Nachweisgrenze, Wiederfindungsrate und weitere Parameter, die von Art und Zweck der Analytik abhängig sind.

Nachfolgend wird die Validierung der HPB-Methode kurz rekapituliert.

#### 2.3.2.1 Kalibrierkurven und Nachweisgrenzen

Für die Erstellung einer Kalibrierkurve zur Bestimmung von Linearität und der Nachweisgrenzen wurden 50 µg Lachssperma-DNA-Lösung der Konzentration 1 mg/mL mit 500 µL „Elution Buffer D“ aus dem Invisorb® Spin Tissue Midi Kit versetzt. Zur Bestimmung der Linearität wurde HPB in den folgenden Konzentrationen zugesetzt: 20, 40, 60, 80, 200, 400, 600, 800, 960, 980, 1000 pg/mg DNA. Folgende Konzentrationen an HPB wurden verwendet, um die Nachweisgrenze festzulegen: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 180, 200 pg/mg DNA. Allen Proben wurden jeweils 50 pg D4-HPB als Interner Standard hinzugefügt. Um mögliche Matrixeffekte ausschließen zu können, wurden 8 Blankwerte der Lachssperma-DNA-Lösung vermessen. Alle Konzentrationen wurden doppelt bestimmt.

#### 2.3.2.2 Präzision und Genauigkeit

Für die Bestimmung der Präzision und Genauigkeit der Methode wurde DNA aus Leber einer weiblichen Wistar-Ratte verwendet, die über das Trinkwasser 4 Wochen lang 30 nmol NNN/kg/Tag erhalten hatte [58]. Die DNA wurde aus 1,3 g Leber extrahiert und in 12 Aliquote aufgeteilt. Für die Tagespräzision wurden 6 Aliquote nacheinander analysiert, für die Wochenpräzision wurden 6 Wiederholungen durchgeführt.

#### 2.3.2.3 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate für den Internen Standard D4-HPB wurde kalkuliert durch Vergleich der Peakflächen für 50 pg D4-HPB in „Elution Buffer D“ (n=8) gegen 50 pg D4-HPB nach reiner Derivatisierung und sofortiger Vermessung per GC/MS (n=8).

#### 2.3.2.4 Datenverarbeitung

Die Identifizierung erfolgte aufgrund der charakteristischen Massenzahlen und der Retentionszeiten, die vergleichend mit einem Tagesstandard (1 pg HPB/µL und 1 pg D4-HPB /µL) übereinstimmen

mussten. Auf eine automatische Integration der Peaks wurde verzichtet, die Peakflächen wurden manuell bestimmt. Dazu wurde die Grundlinie vom Beginn des Peaks an verlängert bis zum Abfallen auf das Niveau der Grundlinie. Beim Auftreten von Schultern wurde das Lot gefällt und die Peakfläche ohne Schulter bestimmt.

### 2.3.3 Statistik

Zur Berechnung der Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD = standard deviation), Standardabweichung vom Mittelwert (SE = standard error) und der Mediane wurden die Programme Microsoft Excel 2002 (Microsoft, Seattle, USA) und GraphPad Prism V.4.01 (GraphPad Inc., San Diego, USA) verwendet. Mit letzterem wurden auch die linearen Regressionen berechnet. Dabei wurde die Quadratsumme aller Messpaare ohne Gewichtung minimiert.

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

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

In den Tierversuchen wurde zu Beginn auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov oder Shapiro-Wilk getestet. Wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  bestimmt, konnte keine Normalverteilung angenommen werden und als weitere Tests wurden der Test nach Mann-Whitney (beim statistischen Vergleich auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen) oder Kruskal-Wallis (bei mehreren ungepaarten Gruppen) durchgeführt. Anschließend wurde zum Vergleich der Untergruppen zueinander der Post-Hoc-Test nach Tamhane verwendet, bei dem keine Varianzgleichheit angenommen wurde. Lag eine Normalverteilung vor, wurden im Anschluss der t-Test (beim statistischen Test auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen) und der two-way ANOVA (bei mehreren ungepaarten Gruppen) gerechnet. Zeigte der F-Test der ANOVA Signifikanz, wurden für den Vergleich der Mittelwerte zwischen Kontrolle und den exponierten Gruppen der Test nach Dunnett verwendet oder für multiple Mittelwertsvergleiche der Tukey's Test als Post-Hoc-Test. Zur Berechnung der statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism verwendet.

In den Humanstudien wurde die Prüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov Test durchgeführt. Bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurde keine Normalverteilung angenommen. Der statistische Vergleich auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde entweder mit dem t-Test (bei Normalverteilung) oder 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 wurde. Zur Berechnung der statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS verwendet.

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 1,5fach außerhalb der Box, Extremwerte (\*) mehr als dreifach. Im Säulendiagramm sind Mittelwert und Standardfehler dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Analytik

#### 3.1.1 Identifizierung der Tabakalkaloide Cotinin, Myosmin und Nicotin

Die Identifizierung der Tabakalkaloide mittels GC-MS Trio 1000 im EI<sup>+</sup>-Modus wurde bereits in der Dissertation von Schütte-Borkovec [212] beschrieben. An dieser Stelle soll nur eine kurze Übersicht über die Fragmentierungsmuster der drei Tabakalkaloide gegeben werden.

##### 3.1.1.1 Fragmentierung von Cotinin

Die Abb. 3–1 zeigt die Hauptfragmente nach Ionisierung durch Elektronenbeschuss von Cotinin mit den Massen 98, 119, 118 und 147. Der Molekülpeak von Cotinin ist m/z 176.

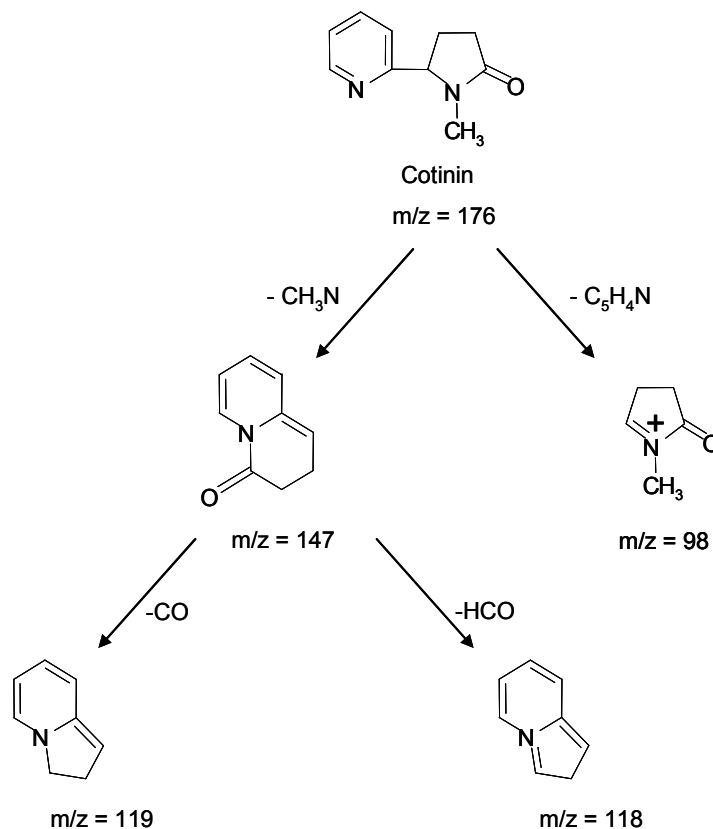
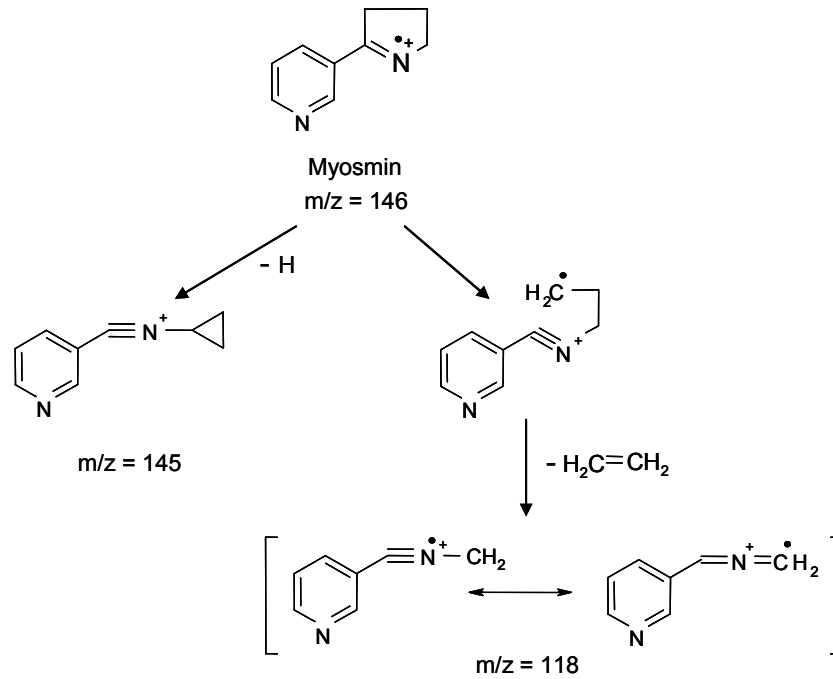


Abb. 3–1 Hauptfragmente von Cotinin

##### 3.1.1.2 Fragmentierung von Myosmin

Durch Elektronenbeschuss zerfällt Myosmin in die Hauptfragmente m/z 146, 145 und 118 [214], was sich dementsprechend im Spektrum von Myosmin widerspiegelt (Abb. 3–2).

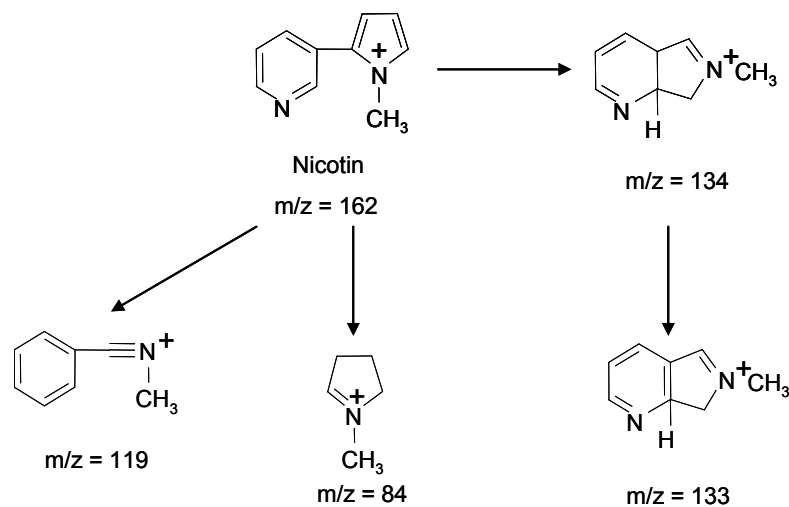


**Abb. 3–2 Fragmentierungsmuster von Myosmin**

In der ersten massenspektrometrischen Analyse ermittelte Duffield [215] 1965 für Myosmin die Massenfragmente  $m/z$  145 und  $m/z$  118 neben dem Basispeaks mit  $m/z$  146. Weniger als zehn Jahre später wurde dann das Myosmin zum ersten Mal von Brown und Ahmad [216] im Tabakrauchkondensat gaschromatographisch nachgewiesen. Mittels Massenspektrometrie konnte darüber hinaus bewiesen werden, dass es sich hierbei wirklich um Myosmin handelte.

### 3.1.1.3 Fragmentierung von Nicotin

Das Fragment des Molekülions weist die Masse 162 auf. Das Hauptfragment des Nicotins hat ein Masse-Ladungs-Verhältnis von 84. Weitere Fragmente von Nicotin werden auf den Massen 119 und 133 beobachtet (Abb. 3–3).



**Abb. 3–3 Fragmentierung von Nicotin**

### 3.1.2 Validierung der Methode zur Bestimmung der Tabakalkaloide in Speichel, Plasma und Zehennägeln

Die zu Grunde liegende Validierung ist in der Dissertationsschrift von Schütte-Borkovec [212] ausführlich dargestellt. Die Wiederfindungsraten, Nachweis- und die Bestimmungsgrenzen sind in Tab. 3–1 und Tab. 3–2 wiedergegeben.

Die Validierung wurde für die Speichel-/Plasmaproben mit Kälberserum, für die Zehennagelproben mit synthetisch hergestelltem Keratin durchgeführt. Es wurden die Tages-, Wochen- und die Messpräzision bestimmt. Die Linearität wurde mit Hilfe des Bestimmtheitsmaß  $r^2$  berechnet, gleichzeitig konnte durch Vergleich der gemessenen Reihe mit der aufgearbeiteten Verdünnung die Wiederfindung bestimmt werden. Die Bestimmtheitsmaße lagen zwischen 0,97-0,99.

**Tab. 3–1 Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze [ng/mL] und Wiederfindungsrate (%) von Cotinin und Myosmin in Speichel und Plasma**

Analyt	Nachweisgrenze (LOD)	Bestimmungsgrenze (LOQ)	Wiederfindung (%)
Cotinin	0,05	0,16	
D3-Cotinin			91±12
Myosmin	0,0012	0,0036	
D4-Myosmin			93±10

**Tab. 3–2 Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze [ng/mL] und Wiederfindungsrate (%) von Cotinin, Myosmin und Nicotin in Zehennägeln**

Analyt	Nachweisgrenze (LOD)	Bestimmungsgrenze (LOQ)	Wiederfindung (%)
Cotinin	35	107	
D3-Cotinin			97±7
Myosmin	10	30	
D4-Myosmin			102±4
Nicotin	21	62	
D3-Nicotin			98±11

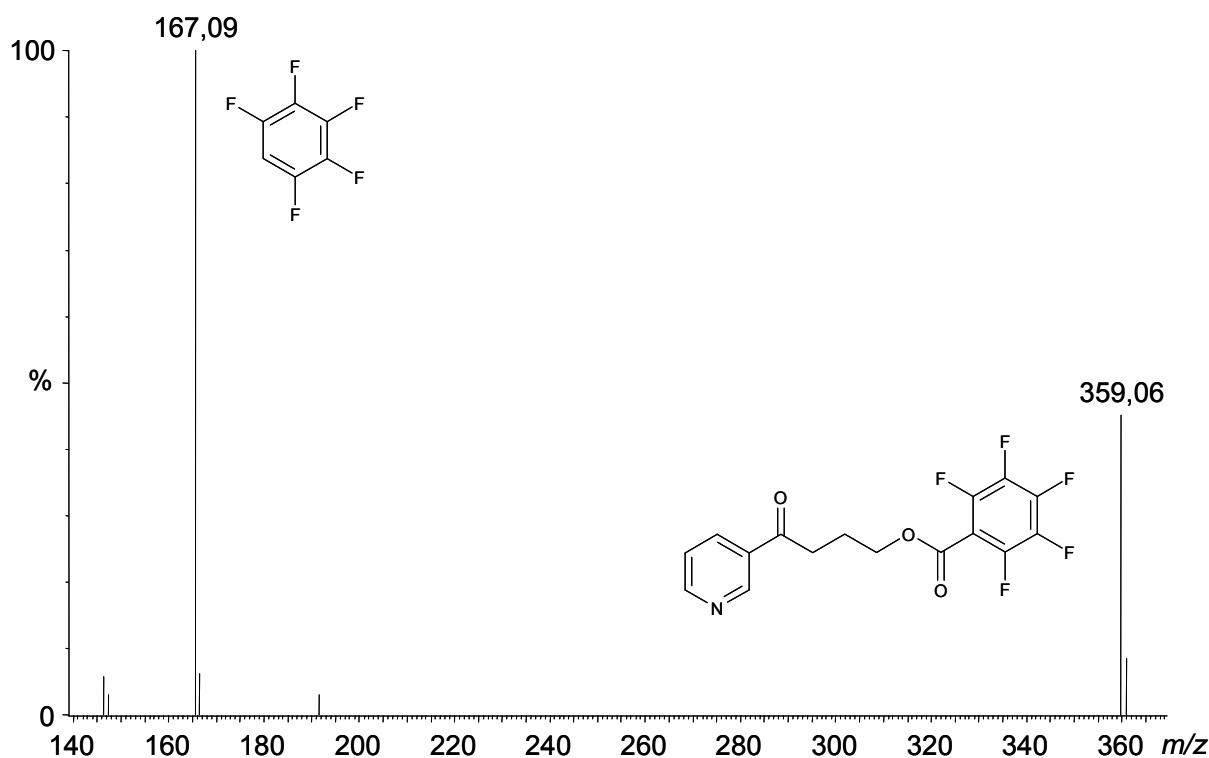
### 3.1.3 Identifizierung von HPB

Um einen Überblick über die Fragmentierung des derivatisierten HPB durch negativ chemische Ionisation zu erhalten, wurde ein Spektrum im Scan Modus aufgenommen. Dazu werden über die gesamte Dauer der Elution in kurzen, regelmäßigen Abständen (0,5 bis 1 sec) Spektren registriert. Der Massenbereich wurde von 100 bis 400 Dalton eingestellt, in dem alle Fragmentationen registriert werden konnten. Das Aufnehmen höherer Massenbereiche ist nur in Ausnahmefällen sinnvoll, weil größere Moleküle sehr langsam über die Trennsäule wandern. Das Scannen von niedrigen Massen mit

Hilfe von Sektorfeldgeräten bereitet ebenfalls Schwierigkeiten, weil es unverhältnismäßig viel Zeit in Anspruch nimmt (exponentieller Scan, 0,5 sec pro Massendekade).

Eine Derivatisierung des HPB mit halogeniertem Pentafluorobenzoylchlorid (PFBC) wurde vorgenommen, um die Elektronendichte und Flüchtigkeit der Verbindung zu erhöhen. Ebenso wurde der zugehörige Standard D4-HPB behandelt (Abb. 2–1). Für die Ermittlung der Fragmente der Ketoalkohole wurden je 200 pg Substanz/ $\mu\text{L}$  verwendet. Die ermittelten Fragmente sind mit der Struktur von HPB vereinbar (Abb. 3–4). Bei dem Fragment  $m/z$  359,0581 handelt es sich um das Molekülion  $\text{M}^-$  des derivatisierten HPB ( $M_r=359,0581$ ). Das Fragment  $m/z$  167 stammt aus dem Derivatisierungsreagenz.

Unter Zuhilfenahme der Retentionszeiten von D0-HPB und D4-HPB konnte die Identifizierung der Fragmente zusätzlich abgesichert werden. Die deuterierte Standardlösung erscheint im SIM mit einer geringen zeitlichen Versetzung.



**Abb. 3–4** Massenspektrum eines derivatisierten HPB-Standards (200 pg/ $\mu\text{L}$ ) mit den charakteristischen Zerfallsfragmenten

### 3.1.4 Validierung der Methode zur Bestimmung HPB-freisetzender DNA-Addukten

#### 3.1.4.1 Kalibrierkurven und Nachweisgrenzen

Die Kalibrierkurve im erwarteten Arbeitsbereich von 20 - 1000 pmol/mg DNA erreichte einen Korrelationskoeffizienten von  $r^2 > 0,99$  (Tab. 3–5).

Für die Ermittlung der Nachweisgrenze (LOD) diente die DIN 32645. Es wurde der Bereich 20 - 200 pmol/mg DNA untersucht. Die errechnete Kalibrierkurve zeigte ebenfalls eine hohe Linearität von  $r^2 > 0,98$ . Die Nachweisgrenze der Standardabweichung der Kurve betrug 92,28 fmol/mg DNA entsprechend 0,76 pg (4,6 fmol) freigesetztes HPB nach der sauren Hydrolyse (Tab. 3–3).

Die Derivatisierung führt zur Entstehung von Artefakten, die im Bereich der Nachweisgrenze der Blindwerte aufzufinden sind. Die Analyse von 8 Blindwerten (ohne gespiktes HPB) zeigte einen Abweichungskoeffizienten von 23%. Diese Abweichung hat einen geringeren Einfluss als die Standardabweichung. Daher wurde die Bestimmungsgrenze (LOQ) als die dreifache LOD ermittelt, also 276,84 fmol/mg DNA entsprechend 2,29 pg (14,9 fmol) freigesetztes HPB nach saurer Hydrolyse. In Proben der Lachssperma-DNA konnte keine signifikante Erhöhung der Blindwerte festgestellt werden als im reinen „Elution Buffer D“.

**Tab. 3–3 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze des freien HPB und des HPB-Addukts**

	freies HPB	HPB-Addukt	
	[pg]	[pg/mg DNA]	[fmol/mg DNA]
Nachweisgrenze (LOD)	0,76	15,24	92,28
Bestimmungsgrenze (LOQ)	2,29	45,73	276,84
Linearität ( $r^2$ )	0,98		

**Tab. 3–4 Blindwert und Wiederfindungsrate des HPB-Addukts**

Blindwert [Fläche $\times 10^6$ ]	1,60 $\pm$ 0,41
Variationskoeffizient [%]	23,75
Wiederfindung [%]	45 $\pm$ 15

### 3.1.4.2 Präzision und Genauigkeit

Die Tages- und die Wochenpräzision wurden mit je 6 Aliquoten der DNA aus Leber einer Wistar-Ratten bestimmt. Es wurde ein Variationskoeffizient von 2,68% bei der Tagespräzision ermittelt und 3,05% bei der Wochenpräzision (Tab. 3–5).

**Tab. 3–5 Maximaler Arbeitsbereich und Präzision der Bestimmung des HPB-Addukts**

	[pg/mg DNA]	[fmol/mg DNA]
max. Arbeitsbereich	20 - 1000	121 - 6053
Linearität ( $r^2$ )	0,99	
Tagespräzision	97,95 $\pm$ 2,62	592,94 $\pm$ 15,89
Variationskoeffizient (%)	2,68	
Wochenpräzision	102,41 $\pm$ 3,12	619,95 $\pm$ 18,90
Variationskoeffizient (%)	3,05	

### 3.1.4.3 Wiederfindung

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für den Internen Standard betrug (45 $\pm$ 15%) (Tab. 3–4).



## 3.2 Tierstudien

Die Zielsetzungen der Tierstudien waren zum Einen die Bestimmung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung für das Ausmaß der DNA-Schädigung in den Zielorganen Leber und Lunge, ausgelöst durch die Gabe von NNK und ihre Modulation durch Ethanol und zum Anderen eine Beurteilung der protektiven Effekte ausgewählter antioxidativer Substanzen auf die Entstehung der DNA-Addukte. Dazu wurden 3 Versuchsreihen mit männlichen Wistar-Ratten eingesetzt.

### 3.2.1 Vorversuch zur Dosisfindung für die NNK-Belastung

Der Vorversuch diente der Bestimmung der benötigten NNK-Menge für eine ausreichende Entstehung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten in den Organen Leber und Lunge. Dazu erhielten die Ratten NNK über 2-4 Wochen über das Trinkwasser in Konzentrationen von 1, 3 und 5 ppm (Tab. 2–1). Zur Bestimmung der NNK-Dosis wurde zweimal wöchentlich die aufgenommene Trinkwassermenge ermittelt. Ab der 2. Behandlungswoche tranken die Ratten, welche die höchste NNK-Dosis bekamen, durchgehend signifikant weniger als die Kontrolltiere (Tab. 3–6). Die niedrigeren NNK-Gaben führten ebenfalls zu einer tendenziell geringeren Wasseraufnahme, jedoch nur in der 2. und 3. Woche.

**Tab. 3–6 Tägliche Wasseraufnahme der Wistar-Ratten [ml]; MW±SD, n=4**

Gruppe	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
1 ppm NNK	45,8±1,5	38,5±3,3	38,2±3,0	46,3±0,1
3 ppm NNK	45,8±2,5	42,6±4,8	38,8±5,0	51,1±1,6
5 ppm NNK	43,9±4,6	33,3±2,2*	37,0±1,4*	43,1±0,2*
Kontrolle	42,2±7,9	44,1±0,3	43,9±1,2	48,3±4,6

\* statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe (one-way ANOVA)

Aus den Mittelwerten für Wasserverzehr und Körpergewicht errechnen sich folgende NNK-Dosen:

45 ml 1 ppm NNK/Ratte (331 g)  $\approx$  0,13 mg NNK/kg KG

39 ml 3 ppm NNK/Ratte (324 g)  $\approx$  0,36 mg NNK/kg KG

45 ml 5 ppm NNK/Ratte (330 g)  $\approx$  0,68 mg NNK/kg KG.

**Tab. 3–7 Tägliche Futteraufnahme der Wistar-Ratten [g]; MW±SD, n=4**

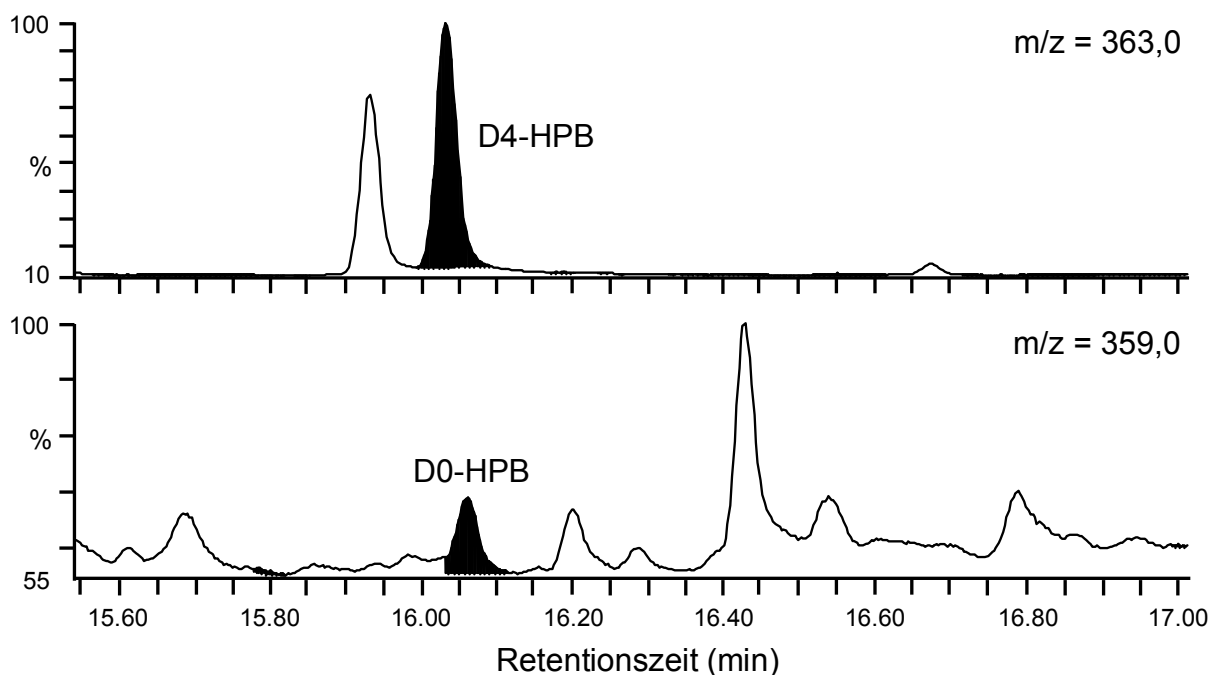
Gruppe	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
1 ppm NNK	23,0±1,3	20,9±2,1	20,3±1,6	22,7±2,9
3 ppm NNK	23,7±1,1	25,5±3,3	19,9±3,1	24,9±4,1
5 ppm NNK	22,8±1,3	24,8±3,9	20,1±1,4	24,8±3,9
Kontrolle	21,5±4,2	24,4±1,3	21,7±2,4	22,8±0,2

In der Aufnahmemenge des Futters traten zwischen der Kontrollgruppe und den mit NNK behandelten Gruppen keine Unterschiede auf (Tab. 3–7). Auch in der Zunahme des Körpergewichtes wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt (Tab. 3–8).

**Tab. 3–8 Körpergewichte der Wistar-Ratten [g]; MW±SD, n=4**

Gruppe	Tag 0	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
1 ppm NNK	283±8	293±17	314±20	344±7	353±8
3 ppm NNK	295±8	304±11	329±12	347±20	379±8
5 ppm NNK	285±10	299±9	320±13	345±16	373±9
Kontrolle	288±13	298±4	332±14	354±6	376±13

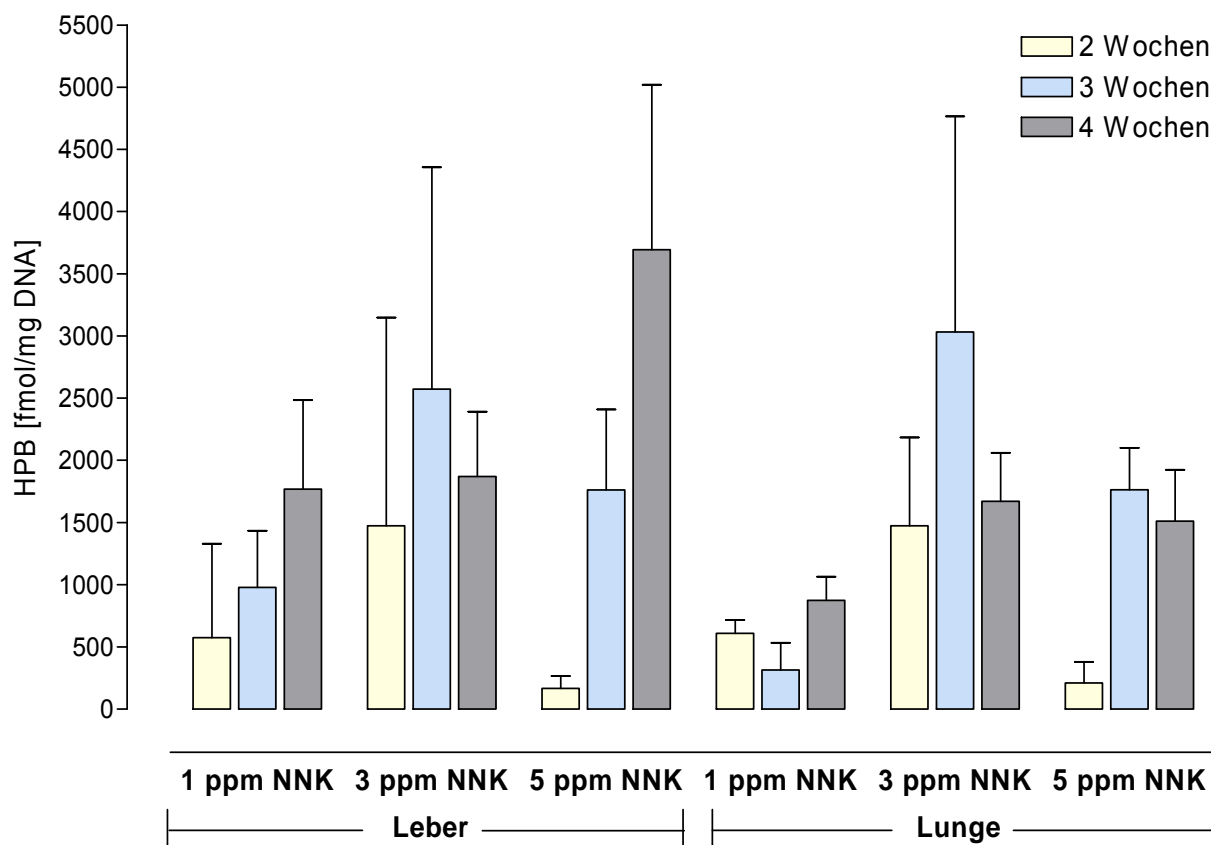
Die Bestimmung der HPB-freisetzenden DNA-Addukte von Leber und Lunge erfolgte am GC-MS-System 1, das mit einem Quadrupol ausgestattet ist. Ein Chromatogramm von Lebergewebe einer über 4 Wochen mit 5 ppm NNK behandelten Ratte ist beispielhaft in Abb. 3–5 gezeigt.



**Abb. 3–5 Chromatogramme des Analyten (m/z = 359,0) und des Internen Standards D4-HPB (m/z = 363,0) von Lebergewebe einer 4 Wochen mit 5 ppm NNK behandelten Ratte**

Die Abb. 3–6 zeigt die Ergebnisse für die NNK-behandelten Ratten. Jede Gruppe bestand aus 4 Tieren. In den unbehandelten Kontrollgruppen konnten weder im Leber- noch im Lungengewebe DNA-Addukte nachgewiesen werden. Es zeigte sich keine Dosisabhängigkeit. Weder die zunehmende Dauer der Behandlung noch die Erhöhung der NNK-Dosis führte zu einem konsistenten Anstieg der HPB-freisetzenden DNA-Addukte. Auch die Unterschiede zwischen Leber und Lunge zeigen kein eindeutiges Muster. Diese Ergebnisse ließen Zweifel an der Zuordnung der isolierten DNA-Proben zu

den jeweiligen Gruppen aufkommen. Als Konsequenz daraus wurden uns für die weiteren Tierstudien Teile der Organe für die DNA-Isolierung zur Verfügung gestellt. Aufgrund der vorliegenden Daten und den Ergebnissen zur Genotoxizität wurde eine vierwöchige Behandlung mit 1 und 5 ppm NNK im Trinkwasser für die nachfolgenden Studien festgelegt.



**Abb. 3-6** HPB-Addukte aus Leber- und Lungengewebe von Wistar-Ratten des Vorversuches. Dargestellt sind die unterschiedlichen Dosen NNK (1-5 ppm) in Abhängigkeit von der Dauer der Anwendung (2-4 Wochen); MW±SE, n=4

### 3.2.2 Interaktion von NNK und Ethanol im Tierversuch

In dieser Studie wurde der Einfluss einer zusätzlichen Alkoholgabe auf die Bildung von HPB-freisetzenden DNA-Addukten durch NNK untersucht. Dazu wurde den Gruppen von je 9 Ratten über vier Wochen Trinkwasser mit 1 ppm bzw. 5 ppm NNK allein oder zusätzlich mit 10% Ethanol verabreicht (Tab. 3-9). Zur Kontrolle bekamen die Ratten entweder reines Trinkwasser oder Trinkwasser mit 10% Ethanol. Alle Tiere bekamen Futter (AIN-93) und Wasser *ad libitum* (Tab. 2-2).

Nachdem die Ratten teilweise zu dritt oder zu zweit je Käfig gehalten wurden, sind keine individuellen Angaben zum Futterverzehr und der Wasseraufnahme vorhanden. Deshalb werden in den Tabellen 3-9 und 3-10 nur die Mittelwerte aus den zweimal pro Woche erhobenen Daten dargestellt und auf eine statistische Auswertung verzichtet.

**Tab. 3–9 Tägliche Wasseraufnahme [ml]; Mittelwerte von 9 Ratten**

Nr.	Gruppe	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
<b>I</b>	Kontrolle	37,9	34,5	37,5	36,1
<b>II</b>	1 ppm NNK	36,9	34,5	37,4	36,0
<b>III</b>	5 ppm NNK	34,0	34,4	37,3	35,8
<b>IV</b>	10% EtOH	19,7	21,7	26,1	26,4
<b>V</b>	10% EtOH + 1 ppm NNK	19,3	25,0	26,8	27,6
<b>VI</b>	10% EtOH + 5 ppm NNK	20,7	22,2	24,0	24,5

Die durchschnittlichen täglichen Aufnahmemengen von NNK berechnen sich, basierend auf dem Wasserverzehr und den Körpergewichten, wie folgt:

Gruppe II: 36 ml 1 ppm NNK/Ratte (320 g)  $\approx$  0,11 mg NNK/kg KG

Gruppe III: 35 ml 5 ppm NNK/Ratte (322 g)  $\approx$  0,56 mg NNK/kg KG

Gruppe V: 25 ml 1 ppm NNK/Ratte (330 g)  $\approx$  0,076 mg NNK/kg KG

Gruppe VI: 23 ml 5 ppm NNK/Ratte (325 g)  $\approx$  0,35 mg NNK/kg KG.

**Tab. 3–10 Tägliche Futteraufnahme [g]; Mittelwerte von 9 Ratten**

Nr.	Gruppe	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
<b>I</b>	Kontrolle	20,8	21,5	22,4	22,3
<b>II</b>	1 ppm NNK	21,6	21,3	23,0	22,5
<b>III</b>	5 ppm NNK	20,7	21,3	22,9	22,8
<b>IV</b>	10% EtOH	17,3	15,3	17,2	17,2
<b>V</b>	10% EtOH + 1 ppm NNK	13,9	15,0	16,5	16,2
<b>VI</b>	10% EtOH + 5 ppm NNK	15,5	14,5	16,7	17,1

**Tab. 3–11 Körpergewicht der Wistar-Ratten [g]; MW $\pm$ SD, n=9**

Gruppe	Tag 0	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
Kontrolle	300 $\pm$ 7	318 $\pm$ 7	330 $\pm$ 8	283 $\pm$ 9	347 $\pm$ 9
1 ppm NNK	299 $\pm$ 7	317 $\pm$ 11	283 $\pm$ 8	329 $\pm$ 15	344 $\pm$ 9
5 ppm NNK	301 $\pm$ 8	320 $\pm$ 9	314 $\pm$ 20	333 $\pm$ 13	344 $\pm$ 13
10 % EtOH	313 $\pm$ 6	321 $\pm$ 8	329 $\pm$ 12	343 $\pm$ 13	361 $\pm$ 14
10 % EtOH/ 1 ppm NNK	302 $\pm$ 8	335 $\pm$ 10	320 $\pm$ 13	348 $\pm$ 14	359 $\pm$ 14
10 % EtOH/ 5 ppm NNK	324 $\pm$ 10	309 $\pm$ 12	332 $\pm$ 14	333 $\pm$ 6	346 $\pm$ 8

Während NNK den Wasserverzehr nicht beeinflusste, erniedrigte der Ethanolzusatz bei allen Gruppen die Aufnahmemenge in der ersten Woche auf die Hälfte. Im weiteren Versuchsverlauf nahm der Wasserverzehr etwas zu und erreichte im Vergleich zu den Kontrollen etwa zwei Drittel bis drei Viertel (Tab. 3–9).

Auch die Futtermengeaufnahme war in den Ethanol-behandelten Ratten auf drei Viertel der Kontrollwerte erniedrigt. Die NNK-Behandlung hatte keinen Einfluss auf den Futtermengeverzehr (Tab. 3–10). Bei den Körpergewichten waren keine behandlungsbedingten Unterschiede feststellbar (Tab. 3–11),

**Tab. 3–12 Isolierung der DNA aus Leber und Lunge von Wistar-Ratten (MW±SD, n=54)**

	Einwaage [mg]	DNA- Konzentration [mg/mL]	DNA-Gehalt [mg]	DNA-Gehalt [% der Einwaage]
Leber	168,1±22,6	0,889±0,335	0,445±0,167	0,261±0,092
Lunge	153,9±30,8	0,943±0,500	0,471±0,250	0,305±0,148

Nach Isolierung der DNA aus den Leber- und Lungenproben (Tab. 3–12) wurden die Konzentrationen der HPB abspaltenden Addukte mit dem GC-MS-System 1 bestimmt. In den Organen der Kontrollgruppe und der reinen Ethanol-Gruppe konnten keine HPB-Addukte nachgewiesen werden (Tab. 3–13). In den NNK-behandelten Gruppen hatte das Lungengewebe etwa 2fach höhere Adduktlevel als das Lebergewebe. Die 5fach höhere Dosis an NNK führte in beiden Organen nur zu einer Verdoppelung der DNA-Addukte. In einfacher Näherung können die Werte einer Sättigungskurve der Formel

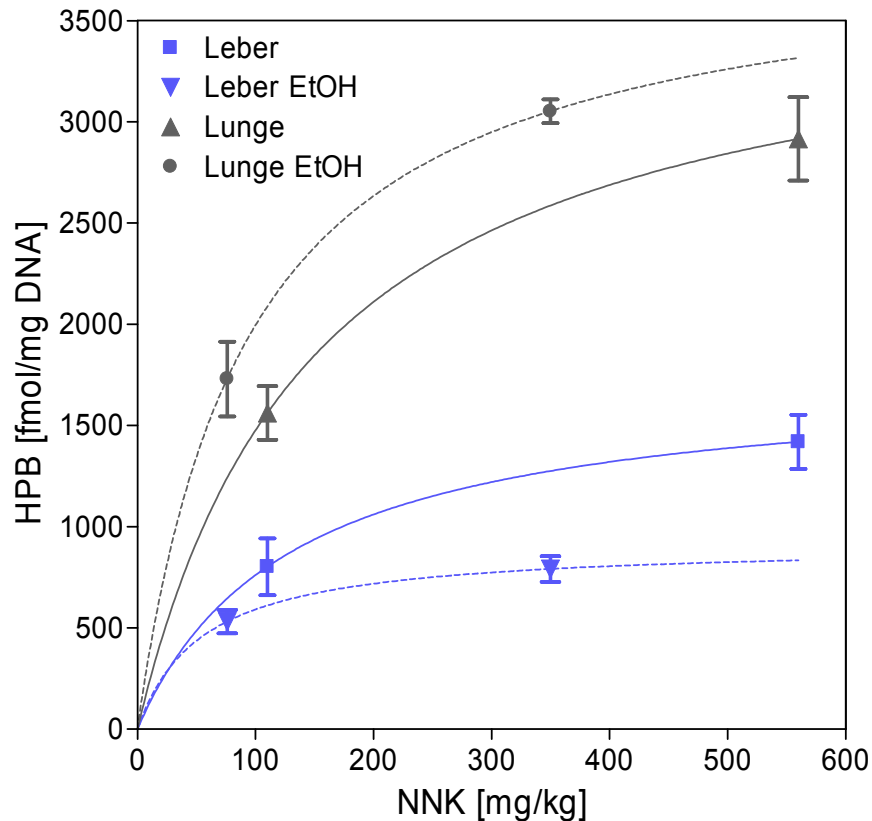
$$3-1: C[\text{fmol}/\text{mg DNA}] = \frac{C_{\text{max}} \times \text{Dosis}}{k + \text{Dosis}}$$

angepasst werden (Abb. 3–7).

**Tab. 3–13 HPB-freisetzende Addukte in Leber und Lunge von Wistar-Ratten aus der Interaktionsstudie [fmol HPB/mg DNA]; MW±SD, n=9; die in Klammern gesetzten Werte bei den EtOH-Gruppen sind auf die Dosis korrigiert**

Gruppe	Leber	Lunge	Le/Lu	Signifikanzen*: p<	
				1/5 ppm	NNK/NNK+EtOH
Kontrolle	n.d.	n.d.			
1 ppm NNK	802±420	1561±397	0,01		
5 ppm NNK	1419±399	2915±617	0,001	Le: 0,01 Lu: 0,001	
10% EtOH	n.d.	n.d.			
10% EtOH + 1 ppm NNK	531±164 (610±189)	1729±552 (2085±666)	0,001		Le: n.s. (0,06) Lu: n.s.
10% EtOH + 5 ppm NNK	791±191 (834±201)	3052±176 (3317±191)	0,001	Le: 0,01 Lu: 0,001	Le: 0,001 Lu: n.s. (0,08)

\*Die Vergleiche zwischen Lunge und Leber wurden mit dem gepaarten, alle anderen Vergleiche mit dem ungepaarten 2-seitigen t-Test berechnet. Für die EtOH-Gruppen wurden die korrigierten Daten herangezogen.



**Abb. 3-7** HPB-freisetzende DNA-Addukte in Leber und Lunge der Wistar-Ratten aus der Interaktionsstudie zwischen NNK und Ethanol;  $MW \pm SE$ ,  $n=9$ ; die Kurvenanpassung erfolgte mit der Gleichung 3-1

Der Zusatz von 10%-igem Ethanol reduzierte die Wasseraufnahme und damit die aufgenommene NNK-Menge. Dies muss bei der Bewertung der Änderungen der Adduktlevel in Leber und Lunge berücksichtigt werden. Die Abb. 3-7 zeigt, dass durch Ethanol die HPB-freisetzenden Addukte in der Leber deutlich reduziert werden, sich dagegen in der Lunge erhöhen. Die Unterschiede in den Adduktleveln von Leber und Lunge steigen dadurch bei der NNK-Belastung mit 1 und 5 ppm auf das drei- bis vierfache an (Tab. 3-13). Gleichzeitig nimmt die Dosisabhängigkeit vor allem in der Leber deutlich ab. Die fünffach höhere NNK-Dosis führt in der Leber nicht mehr zu einer Verdopplung der HPB-Addukte, sondern nur noch zu einer 1,5fachen Erhöhung. Alle Unterschiede zwischen den beiden Organen und hinsichtlich der Dosisabhängigkeit erreichen Signifikanzniveau. Auch nach Ethanolbehandlung lässt sich der dosisabhängige Anstieg der Adduktkonzentrationen bei Leber und Lunge der in Formel 3-1 gezeigten Sättigungskurve anpassen (Abb. 3-7). Mit Hilfe dieser Kurve wurden die Adduktlevel geschätzt, die sich in Leber und Lunge bei der NNK-Dosis der Tiere ohne Ethanolbelastung ergeben hätten. Der statistische Vergleich ergibt nur bei der hohen Dosis (5 ppm = 0,56 mg/kg KG) in der Leber einen signifikanten Unterschied. Bei der niedrigen Dosis (1 ppm = 0,11 mg/kg KG) wird bei der Leber das Signifikanzniveau knapp verpasst. Die Unterschiede bei der Lunge sind nicht signifikant.

### 3.2.3 Chemopräventionsstudie: Einfluss von Antioxidantien auf die DNA-Adduktbildung durch NNK und ihre Modulation durch Ethanol

In dieser Studie sollte der Einfluss antioxidativer Substanzen auf die Schädigung der DNA in Leber- und Lungengewebe durch NNK bzw. durch die gemeinsame Gabe von NNK und Ethanol erforscht werden. Insgesamt kamen 13 Gruppen zu je 9 Tieren zum Einsatz. Die in anderen Chemopräventionsstudien bereits getesteten Substanzen Ellagsäure (EA; 7 g/kg Futter; Gruppen III/VII/XI), Chlorophyllin (CP; 3 g/kg, IV/VIII/XII) und Vitamin E (VE; 10 g/kg, V/IX/XIII) wurden Wistar-Ratten über 5 Wochen mit dem Futter verabreicht. Eine Woche nach Beginn der Behandlung erhielten die Ratten in den restlichen 4 Wochen 5 ppm NNK (II-V und X-XIII) und/oder 10% Ethanol (Et; VI-XIII) im Trinkwasser. Zusätzlich wurde die Analytik auf das empfindlichere GC-MS-System 3 umgestellt.

Die Ratten wurden jeweils zu zweit in den Käfigen gehalten, es gibt keine individuellen Angaben zu Futtermittelverzehr und Wasserverbrauch. Deshalb werden nur die Mittelwerte aus den zweimal pro Woche erhobenen Daten dargestellt und auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Während NNK und die Chemopräventiva den Wasserverzehr nicht beeinflussten, erniedrigte der Zusatz von 10% Ethanol zum Trinkwasser bei allen Gruppen die Aufnahmemenge in der ersten Woche im Mittel auf 75% der Kontrolle und im weiteren Versuchsverlauf noch zunehmend bis auf durchschnittlich 63% der Kontrolle in den beiden letzten Behandlungswochen (Tab. 3–14).

Die NNK-Behandlung hatte auch keinen Einfluss auf den Futterverzehr (Tab. 3–15). Ethanol verminderte die Futtermittelaufnahme um 10-30%, wobei der Effekt in der ersten Versuchswoche durch die Chemopräventiva noch abgeschwächt bis aufgehoben war.

**Tab. 3–14 Tägliche Wasseraufnahme [ml]; Mittelwerte von 9 Ratten.**

Nr.	Gruppe	Versuchswoche					
		-2	-1	1	2	3	4
<b>I</b>	Kontrolle	41,2	33,8	28,9	30,0	34,1	33,3
<b>II</b>	NNK	41,4	32,1	32,7	30,9	30,2	32,4
<b>III</b>	NNK+EA	42,9	31,6	27,8	28,8	27,5	27,8
<b>IV</b>	NNK+CP	44,6	31,7	32,1	31,1	30,4	30,0
<b>V</b>	NNK+VE	39,3	30,7	32,8	28,5	28,3	29,1
<b>VI</b>	Et	40,7	34,7	21,1	21,9	20,9	19,7
<b>VII</b>	Et+EA	41,3	36,9	20,5	23,8	24,2	22,8
<b>VIII</b>	Et+CP	43,9	32,9	22,3	19,6	20,8	20,2
<b>IX</b>	Et+VE	40,8	33,4	23,6	19,1	19,8	20,6
<b>X</b>	NNK+Et	39,4	36,3	18,6	19,3	20,5	22,4
<b>XI</b>	NNK+Et+EA	38,8	32,7	21,8	22,0	21,3	21,1
<b>XII</b>	NNK+Et+CP	43,6	28,3	22,2	21,5	22,1	20,2
<b>XIII</b>	NNK+Et+VE	40,3	29,4	24,3	19,9	20,4	20,3

Die durchschnittlichen täglichen Aufnahmemengen von NNK berechnen sich, basierend auf dem Wasserverzehr und den Körpergewichten, wie folgt:

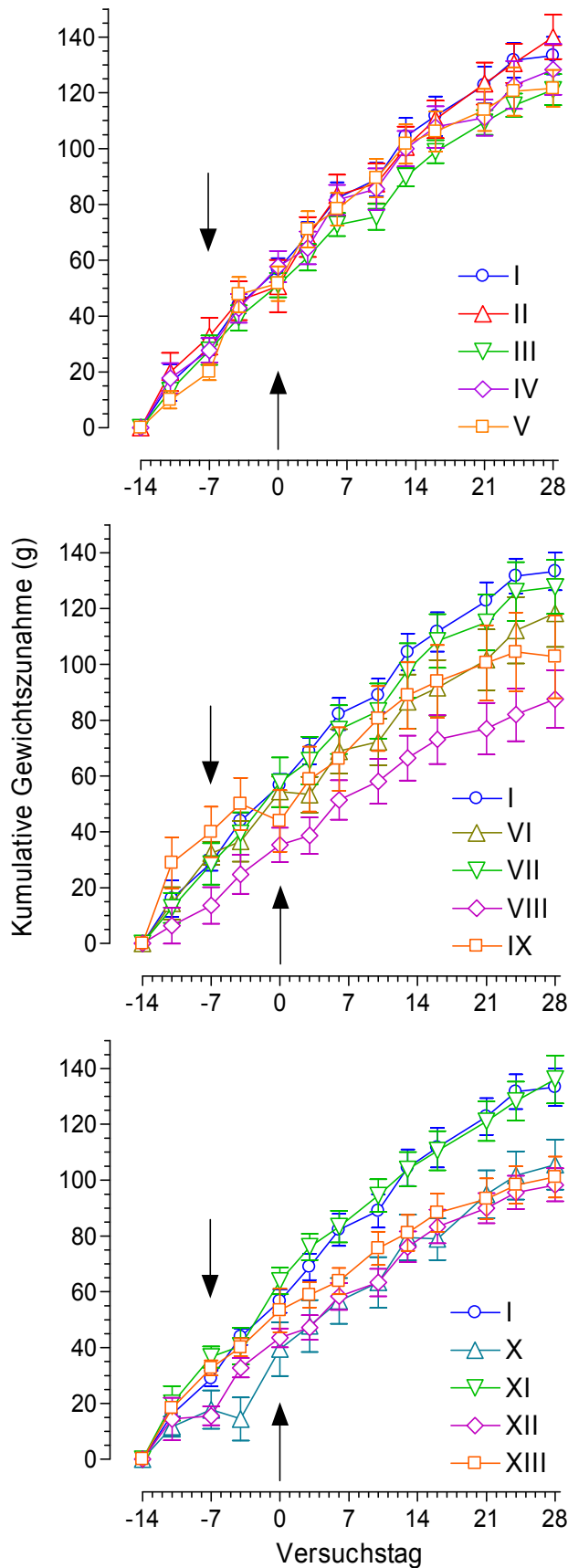
Gruppe II:	32 ml 5 ppm NNK/Ratte (342 g) $\approx$ 0,46 mg NNK/kg KG
Gruppe III:	28 ml 5 ppm NNK/Ratte (315 g) $\approx$ 0,44 mg NNK/kg KG
Gruppe IV:	31 ml 5 ppm NNK/Ratte (343 g) $\approx$ 0,45 mg NNK/kg KG
Gruppe V:	30 ml 5 ppm NNK/Ratte (362 g) $\approx$ 0,41 mg NNK/kg KG
Gruppe X:	20 ml 5 ppm NNK/Ratte (325 g) $\approx$ 0,31 mg NNK/kg KG
Gruppe XI:	22 ml 5 ppm NNK/Ratte (360 g) $\approx$ 0,30 mg NNK/kg KG
Gruppe XII:	22 ml 5 ppm NNK/Ratte (339 g) $\approx$ 0,32 mg NNK/kg KG
Gruppe XIII:	21 ml 5 ppm NNK/Ratte (359 g) $\approx$ 0,30 mg NNK/kg KG

**Tab. 3–15 Tägliche Futterraufnahme [g]; Mittelwerte von 9 Ratten.**

Nr.	Gruppe	Versuchswoche					
		-2	-1	1	2	3	4
<b>I</b>	Kontrolle	21,7	20,6	18,5	19,7	18,7	17,8
<b>II</b>	NNK	22,7	22,0	19,0	20,1	18,9	18,2
<b>III</b>	NNK+EA	20,8	20,6	17,4	19,3	17,3	16,8
<b>IV</b>	NNK+CP	19,6	21,3	20,9	19,5	18,4	18,6
<b>V</b>	NNK+VE	20,2	21,8	21,8	18,5	17,8	17,4
<b>VI</b>	Et	22,3	21,3	14,9	15,6	14,4	14,5
<b>VII</b>	Et+EA	22,5	21,9	16,7	16,1	16,2	15,0
<b>VIII</b>	Et+CP	20,9	19,3	18,8	16,0	14,4	13,9
<b>IX</b>	Et+VE	19,8	18,8	18,4	16,0	15,1	15,0
<b>X</b>	NNK+Et	23,7	22,9	14,1	14,4	13,3	13,9
<b>XI</b>	NNK+Et+EA	23,9	21,5	17,1	18,0	15,1	14,6
<b>XII</b>	NNK+Et+CP	20,6	19,8	18,8	15,0	14,7	13,9
<b>XIII</b>	NNK+Et+VE	22,0	18,8	17,9	14,6	14,7	14,7

Die Ratten der Gruppen IV, VIII und XII wurden eine Woche, jene der Gruppen V, IX und XIII zehn Tage später in den Versuch genommen als die restlichen Gruppen. Wegen der höheren Anfangsgewichte in diesen Gruppen wird auf einen statistischen Vergleich der Körpergewichte verzichtet und es werden nur die Körpergewichtszunahmen ausgewertet (Abb. 3–8; Tab. 3–16). Hier zeigt sich kein Effekt durch NNK, jedoch eine Abnahme um 11% durch Ethanol und um 21% durch die gemeinsame Gabe von Ethanol und NNK. Die Einschränkung der Gewichtszunahme durch Ethanol allein und Ethanol + NNK wurde durch Ellagsäure weitgehend aufgehoben, aber durch Chlorophyllin (-35% und -26%) und Vitamin E (-23% und -24%) noch verstärkt. Im Gruppenvergleich mit dem Tukey-Test nach einseitiger ANOVA erreichte nur die Abnahme durch die Fütterung mit Chlorophyllin bei gleichzeitiger Ethanolgabe statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,05$ ).





**Abb. 3–8** Körpergewichtszunahme im Chemopräventionsversuch, MW±SE, n=9; die Pfeile nach unten: Umstellung des Futters auf Ellagsäure (EA; III/VII/XI), Chlorophyllin (CP; IV/VIII/XII) oder Vitamin E (VE; V/IX/XIII); Pfeile nach oben: Trinkwasserzugabe von 5 ppm NNK (II-V/X-XIII) und/oder 10% Ethanol (Et; VI-XIII)

**Tab. 3–16** Körpergewichtszunahme [g]; MW±SD, n=9

Nr.	Gruppe	Zunahme
I	Kontrolle	133±20
II	NNK	140±24
III	NNK+EA	121±17
IV	NNK+CP	128±27
V	NNK+VE	122±20
VI	Et	118±36
VII	Et+EA	128±29
VIII	Et+CP	88±31*
IX	Et+VE	103±44
X	NNK+Et	106±27
XI	NNK+Et+EA	136±26
XII	NNK+Et+CP	98±18
XIII	NNK+Et+VE	101±22

\*statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe (one-way ANOVA)

Aufgrund der höheren Nachweisempfindlichkeit des GC-MS-Systems 3 wurde eine Grundbelastung mit HPB-freisetzenden DNA-Addukten bereits in der Kontrollgruppe nachgewiesen, die in der Lunge etwa doppelt so hoch war wie in der Leber (Abb. 3–9; Tab. 3–17). Die Behandlung mit NNK führte zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Addukte in beiden Geweben, die Adduktlevel waren in der Lunge 2,5fach höher als in der Leber. Dagegen konnten in Leber und Lunge aller Ratten, die lediglich mit Ethanol behandelt wurden, keine HPB-freisetzenden DNA-Addukte nachgewiesen werden.

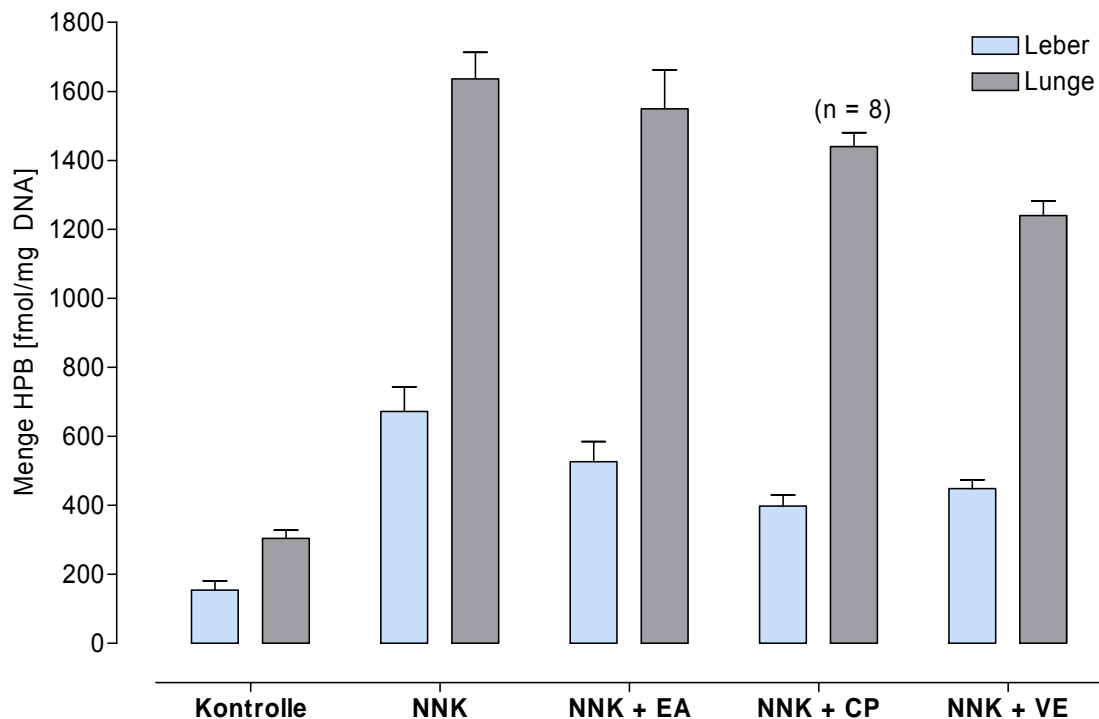
Im Folgenden werden die Ergebnisse mit den NNK-behandelten Ratten dargestellt. Nachdem der Test nach Shapiro-Wilk für die Ergebnisse aller Gruppen keine Signifikanz ( $p > 0,05$ ) ergab, d.h. Normalverteilung vorlag, konnte die einseitige ANOVA mit anschließendem Tukey's Test für multiple Mittelwertvergleiche herangezogen werden. Die statistische Bewertung der Effekte der Testsubstanzen erfolgte getrennt nach den Organen und den beiden Behandlungsarmen, NNK alleine oder NNK mit Ethanol. Der direkte Vergleich der Adduktlevel in Leber und Lunge innerhalb einer Gruppe erfolgte mit dem gepaarten zweiseitigen t-Test.

**Tab. 3–17 HPB-Addukte [fmol/mg DNA] in Leber und Lunge von Wistar-Ratten, die 4 Wochen 5 ppm NNK im Trinkwasser und 5 Wochen 7 g/kg Ellagsäure (EA), 3 g/kg Chlorophyllin (CP) oder 10 g/kg Vitamin E (VE) im Futter erhalten hatten; MW $\pm$ SD, n=9**

Gruppe	Leber	Lunge	Signifikanzen*: p<		
			Le/Lu	NNK/Ko	NNK+/NNK
Kontrolle	154 $\pm$ 80	305 $\pm$ 71	0,01		
NNK	673 $\pm$ 213	1636 $\pm$ 231	0,0001	Le: 0,001	
NNK + EA	526 $\pm$ 176	1550 $\pm$ 340	0,0001	Le: 0,001	Le: n.s. Lu: n.s.
NNK + CP	398 $\pm$ 96	1440 $\pm$ 113 <sup>#</sup>	0,0001	Le: 0,001	Le: 0,01 Lu: n.s.
NNK + VE	449 $\pm$ 75	1240 $\pm$ 124	0,0001	Le: 0,001	Le: 0,05 Lu: 0,01

Die Vergleiche zwischen Lunge und Leber wurden mit dem gepaarten t-Test, die Effekte der Testsubstanzen auf die Addukte in Leber bzw. Lunge mit ANOVA und Tukey's Post-hoc Test berechnet, <sup>#</sup> n=8

Im ersten Behandlungsarm mit NNK ohne Ethanolzusatz (Abb. 3–9; Tab. 3–17) führten alle 3 Chemopreventiva in beiden Organen zu tendenziell niedrigeren HPB-Addukten. Die Behandlung mit Ellagsäure führte nur zu einer geringen Abnahme der Adduktlevel in Leber (-22%; n.s.), die Abnahme in der Lunge (-5%; n.s.) entspricht der um ebenfalls 5% verringerten NNK-Aufnahme über das Trinkwasser. Chlorophyllin hatte keinen Einfluss auf die NNK-Dosis und bewirkte eine deutliche Reduktion in der Leber (-41%;  $p < 0,01$ ), in der Lunge (-12%; n.s.) war der Effekt geringer ausgeprägt. Die Behandlung mit Vitamin E reduzierte zwar die NNK-Dosis am stärksten (-11%), die Abnahme der DNA-Adduktlevel ging aber in Leber (-33%,  $p < 0,05$ ) und Lunge (-25%;  $p < 0,01$ ) deutlich darüber hinaus.



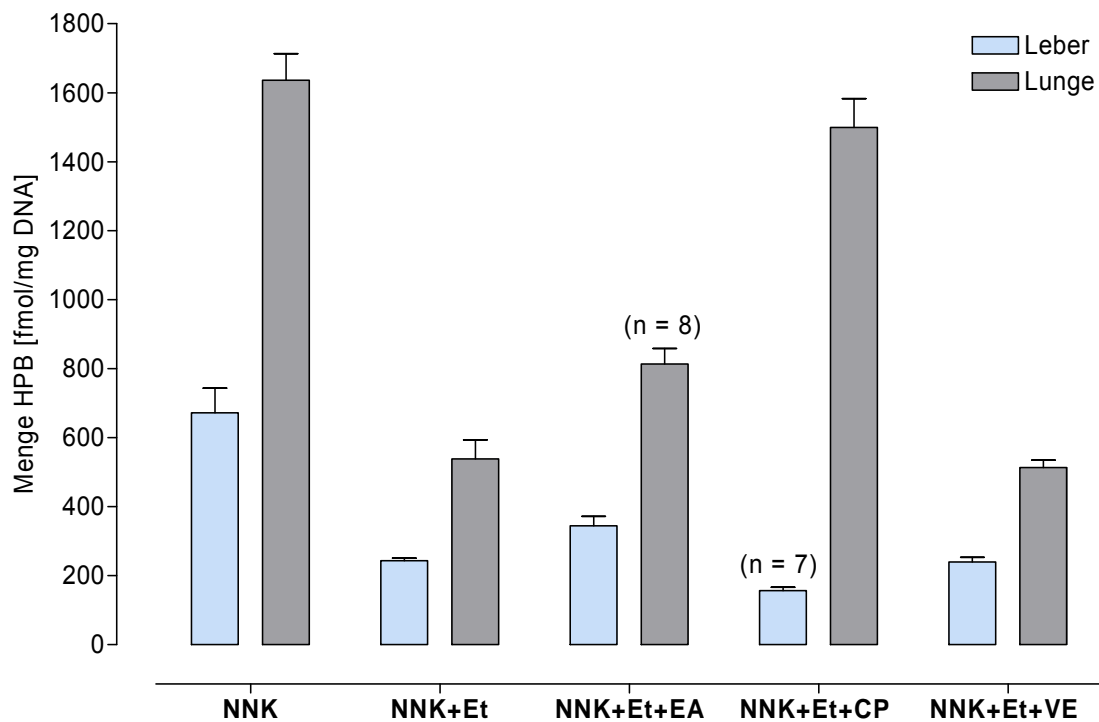
**Abb. 3-9** HPB-Addukte in Leber und Lunge von Wistar-Ratten, die 4 Wochen 5 ppm NNK im Trinkwasser und 5 Wochen 7 g/kg Ellagsäure (EA), 3 g/kg Chlorophyllin (CP) oder 10 g/kg Vitamin E (VE) im Futter erhalten hatten; MW±SE, n=9

**Tab. 3-18** HPB-Addukte [fmol/mg DNA] in Leber und Lunge von Wistar-Ratten, die 4 Wochen entweder nur 5 ppm NNK oder 5 ppm NNK + 10% Ethanol (Et) im Trinkwasser und 5 Wochen 7 g/kg Ellagsäure (EA), 3 g/kg Chlorophyllin (CP) oder 10 g/kg Vitamin E (VE) im Futter erhalten hatten; MW±SD, n=9

Gruppe	Leber	Lunge	Signifikanzen*: p<	
			Le/Lu	NNK+ET+/NNK+ET
Kontrolle	154±80	305±71	0,01	
NNK	673±213	1636±231	0,0001	
NNK+Et	243±24	539±166	0,001	
NNK+Et+EA	345±82	814±126 <sup>#</sup>	0,0001	Le: 0,01 Lu: 0,01
NNK+Et+CP	157±27 <sup>†</sup>	1500±249	0,0001	Le: 0,05 Lu: 0,001
NNK+Et+VE	240±43	516±65	0,0001	Le: n.s. Lu: n.s.

\* Die Vergleiche zwischen Lunge und Leber wurden mit dem gepaarten t-Test, die Effekte der Testsubstanzen auf die Addukte in Leber bzw. Lunge mit ANOVA und Tukey's Post-hoc Test berechnet, <sup>†</sup> n=7; <sup>#</sup> n=8

Der Zusatz von 10% Ethanol reduzierte die Trinkwasseraufnahme und damit auch die NNK-Dosis auf zwei Drittel im Vergleich zu den nur mit NNK behandelten Ratten. Die Reduktion der HPB-Addukte in Leber (-64%;  $p < 0,001$ ) und Lunge (-67%;  $p < 0,001$ ) ging jedoch weit über das Maß der Dosisreduktion hinaus (Abb. 3–10; Tab. 3–18). Die statistische Auswertung der Effekte einer Behandlung mit den Chemopreventiva wurde auf den Vergleich mit der Gruppe beschränkt, die ebenfalls 10% Ethanol zu trinken bekam. Der Zusatz von Ellagsäure führte in Leber (+42%;  $p < 0,01$ ) und Lunge (+51%;  $p < 0,01$ ) zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Adduktlevel. Die Chlorophyllinbehandlung reduzierte die Adduktlevel in der Leber auf zwei Drittel des Kontrollwerts ( $p < 0,05$ ) erhöhte sie aber im Lungengewebe hoch signifikant um das 2,8fache ( $p < 0,0001$ ). Vitamin E hatte in den Ethanol-belasteten Tieren keinerlei Einfluss auf die HPB-Addukte.



**Abb. 3–10** HPB-Addukte in Leber und Lunge von Wistar-Ratten, die 4 Wochen entweder nur 5 ppm NNK oder 5 ppm NNK + 10% Ethanol (Et) im Trinkwasser und 5 Wochen 7 g/kg Ellagsäure (EA), 3 g/kg Chlorophyllin (CP) oder 10 g/kg Vitamin E (VE) im Futter erhalten hatten; MW $\pm$ SE, n=9

### 3.3 Ergebnisse der Humanstudie

Die vorliegende Studie diente der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von HPB-freisetzenden DNA-Addukten in der Mundschleimhaut und dem Konsum unterschiedlicher Tabakwaren. Die Probanden lebten zum Zeitpunkt der Untersuchung im Umkreis von München, in Helsingborg, Schweden und in Lodz, Polen. Alle für diese Studien durchgeführten Probenentnahmen und Befragungen wurden von den jeweiligen Ethikkommissionen genehmigt.

Die Probanden wurden während eines Zeitraumes von einem Jahr (09/2006 bis 09/2007) in die Studie eingeschlossen. Vor der Probenentnahme wurden sie über den Zweck der Studie unterrichtet und mit Hilfe eines Fragebogens (s. Anhang) zu den Themen soziodemographische Faktoren, Rauchstatus, Ess- und Trinkgewohnheiten befragt. Sie erklärten mit ihrer Unterschrift ihr Einverständnis zur Probennahme. Diese umfasste je 2 nicht invasiv gewonnene Proben der Mundschleimhaut der rechten und linken Seite, eine Entnahme von Speichel, bei einem ausgewählten Probandenpool die Abgabe von Abschnitten der Zehennägel und bei den polnischen Rauchern eine Blutprobe.

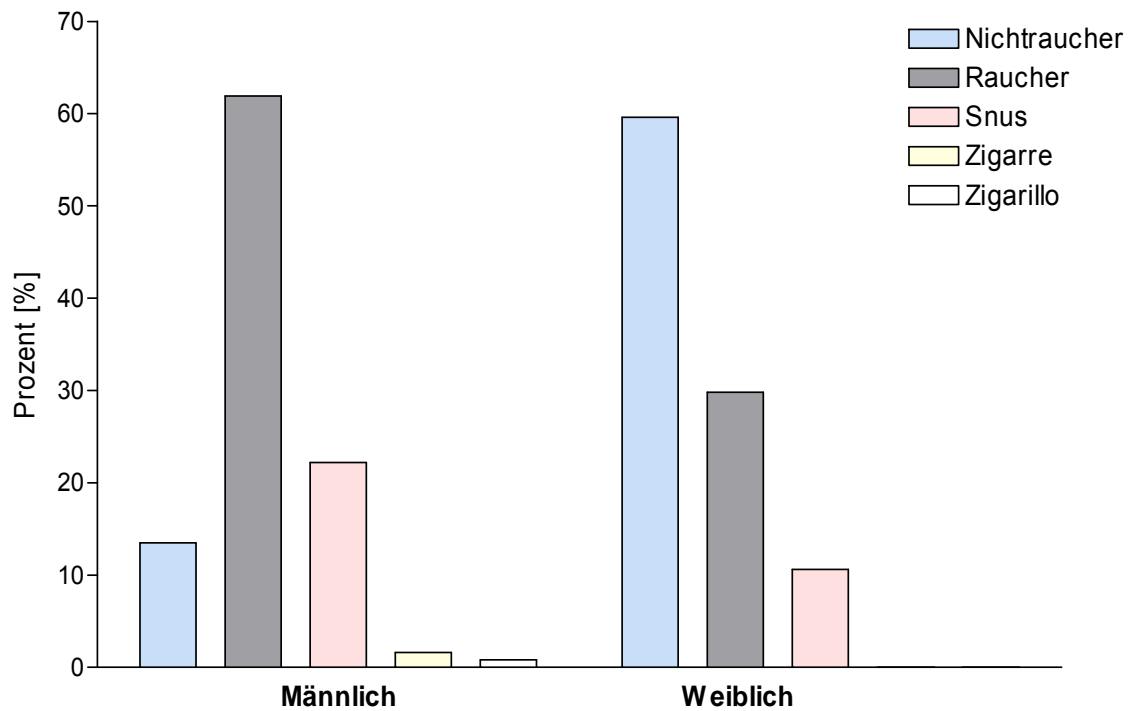
#### 3.3.1 Einteilung der Probanden

Die Studie umfasst 173 Probanden, darunter 27% Frauen (n=47) und 73% Männer (n=126). Das mittlere Alter der Probanden lag bei 40,9±15,0 Jahren in einem Altersbereich von 16 bis 85 Jahren (Tab. 3–19).

**Tab. 3–19 Geschlechtsspezifische Altersverteilung der Probanden**

Altersgruppe	Frauen	[%] ♀	Männer	[%] ♂	Gesamt	[%] ♀♂
16 – 20 a	2	4,3	2	1,6	4	2,3
21 – 30 a	16	34,0	39	31,0	55	31,9
31 – 40 a	11	23,4	24	19,0	35	20,2
41 – 50 a	4	8,5	24	19,0	28	16,2
51 – 60 a	10	21,3	24	19,0	34	19,6
61 – 70 a	1	2,1	11	8,7	12	6,9
71 – 80 a	1	2,1	2	1,6	3	1,7
81 – 90 a	2	4,3	0	0	2	1,2
Insgesamt	47	100	126	100	173	100

Jeder Teilnehmer wurde entsprechend seinen Angaben zum Rauchverhalten als Nichtraucher, Raucher oder als Konsument von Snus, Zigarren oder Zigarillo eingeordnet. Dieser Status wurde mit Hilfe der Bestimmung von Cotinin im Speichel kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Die Verteilung der Geschlechter nach dem Konsumverhalten ist in Abb. 3–11 und Tab. 3–20 dargestellt.



**Abb. 3-11** Prozentuale Angabe des Rauchstatus in Abhängigkeit vom Geschlecht

**Tab. 3-20** Einteilung nach Geschlecht und Konsumverhalten von Tabakprodukten

Geschlecht	NR	Raucher	Snus	Zigarre	Zigarillo	Gesamt
weiblich	28	14	5	0	0	47
männlich	17	78	28	2	1	126
zusammen	45	92	33	2	1	173

NR: Nichtraucher

62% der Probanden (n=107) gaben Informationen zu ihrem höchsten Schulabschluss und ihrer beruflichen Ausbildung an. Davon hatten 45% eine Lehrausbildung, 9% waren Abgänger einer Fachhochschule (FH) und 46% Absolventen einer Universität. Die Unterteilung nach Rauchstatus und Ausbildung ist Tab. 3-21 zu entnehmen.

**Tab. 3-21** Rauchstatus im Vergleich zur Ausbildung

Rauchstatus	Lehre	[%]	FH	[%]	Uni	[%]	Gesamt
Nichtraucher	12	15	7	26	27	59	46
Raucher	11	44	3	12	11	44	25
Snus	24	73	0	0	9	27	33
Zigarre	1	50	0	0	1	50	2
Zigarillo	0	0	0	0	1	100	1
Insgesamt	48	45	10	9	49	46	107

FH: Fachhochschule

### 3.3.2 Bestimmung von Tabakalkaloiden in Speichel und Plasma

Insgesamt konnten Tabakalkaloide in Proben von 150 der 173 Probanden (85%) bestimmt werden. Speichelproben wurden von 84 Probanden bereitgestellt, das entspricht 52% aller Studienteilnehmer. Cotinin und Myosmin wurden in Proben von 32 Nichtrauchern (71%), 19 Rauchern (21%), 30 Benutzern von Snus (91%), 2 Zigarrenrauchern und dem Zigarilloraucher bestimmt. Plasmaproben wurden von den 66 polnischen Rauchern auf Cotinin, Nicotin und Myosmin untersucht.

Die Messung der Cotininwerte in Speichel und Plasma dient der Überprüfung des aktuellen Rauchstatus. In der Literatur findet man Grenzwerte für die Unterteilung zwischen Nichtrauchern und Rauchern, die bei 15 ng/ml Speichel oder Plasma liegen [217,218]. Der Cotininwert in den Speichelproben der Nichtraucher lag unterhalb dieser Grenze. Bei 2 der 19 Raucher, die Speichelproben zur Verfügung stellten war kein Cotinin bestimmbar. Sie wurden deshalb von weiteren Auswertungen ausgeschlossen. Im Speichel aller anderen Raucher lagen die Cotininkonzentrationen über dem Grenzwert. In Plasmaproben von 4 der 66 polnischen Raucher lag das Cotinin deutlich unterhalb des cut off-Werts von 15 ng/ml. Nachdem die HPB-Addukte dieser Probanden alle im mittleren Konzentrationsbereich der Raucher lagen, wurden sie in der Auswertung belassen.

Cotinin erreichte bei Rauchern 79fach höhere Konzentrationen im Speichel als bei Nichtrauchern (85,56 vs. 1,08 ng/mL;  $p < 0,001$ ). Verwender von Snus weisen einen 1,4fach erhöhten Wert im Vergleich zu Rauchern auf (117,9 vs. 85,56 ng/mL;  $p < 0,05$ ). Auch der Unterschied zwischen Benutzern von Snus und Nichtrauchern ist hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Auffällig sind der sehr hohe Wert des Zigarillorauchers mit 237 ng/mL und der niedrige Wert von einem der beiden Zigarrenraucher, der unter dem Grenzwert für aktives Rauchen liegt. Die gesamten Werte sind in Abb. 3–12 dargestellt.

Myosmin konnte in allen Speichelproben qualitativ und quantitativ bestimmt werden (Abb. 3–13). Die Konzentrationen lagen bei Rauchern 4fach höher als bei Nichtrauchern (3,34 vs. 0,84 ng/mL;  $p < 0,01$ ), bei Verwendern von Snus konnte eine 6fache Erhöhung gegenüber Nichtrauchern festgestellt werden ( $p < 0,0001$ ). Die Werte von Rauchern und Verwendern von Snus unterschieden sich nicht signifikant. Der Zigarilloraucher hatte auch für das Myosmin eine relativ hohe Konzentration im Speichel (11,7 ng/mL).

Betrachtet man die Ergebnisse mit allen Probanden, dann zeigt sich zwar eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen von Myosmin und Cotinin (Abb. 3–14;  $p < 0,0001$ ), die jedoch für Raucher alleine betrachtet sehr viel schwächer ausfällt ( $p < 0,05$ ), bei Verwendern von Snus keine Signifikanz mehr erreicht ( $p = 0,073$ ) und bei Nichtrauchern ( $p = 0,829$ ) vollständig fehlt (Abb. 3–15).

In allen Plasmaproben der Raucher aus Polen konnten Cotinin und Myosmin nachgewiesen werden, die Nicotinkonzentration lag nur bei einem Probanden unterhalb der Nachweisgrenze (Tab. 3–22). Im Spearman Rank Test ergeben sich hochsignifikante Korrelationen zwischen Cotinin und Nicotin ( $p < 0,0001$ ) und zwischen Nicotin und Myosmin ( $p < 0,0001$ ). Auch zwischen Cotinin und Myosmin besteht eine signifikante Korrelation ( $p < 0,01$ ).

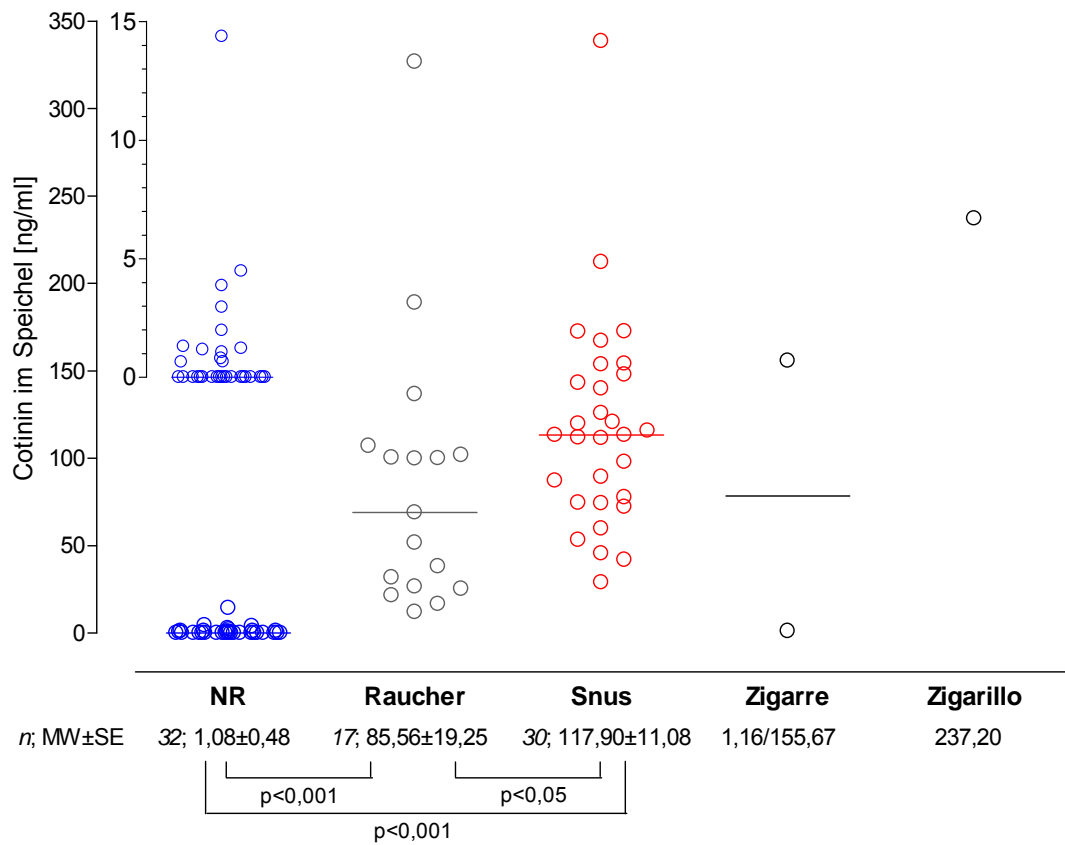


Abb. 3–12 Cotinin im Speichel von Nichtrauchern (NR), Rauchern, Benutzern von Snus, Zigarren und Zigarillos (Linien stellen den Medianwert dar)

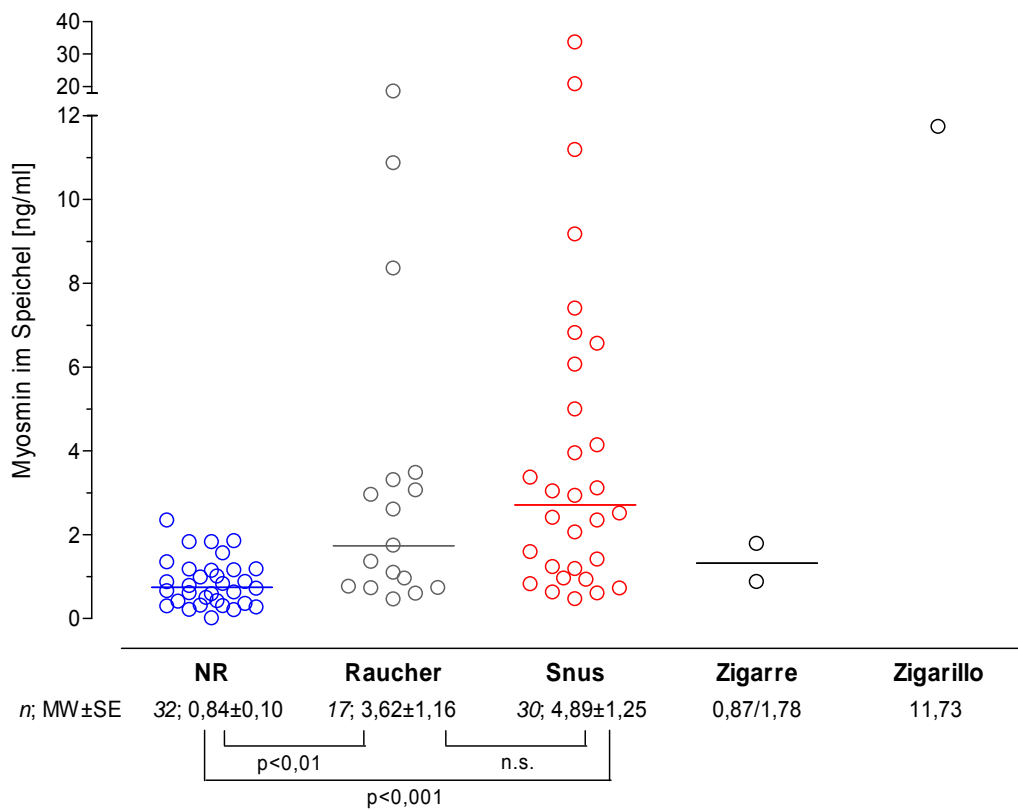


Abb. 3–13 Myosmin im Speichel von Nichtrauchern (NR), Rauchern, Benutzern von Snus, Zigarren und Zigarillos (Linien stellen Medianwert dar)



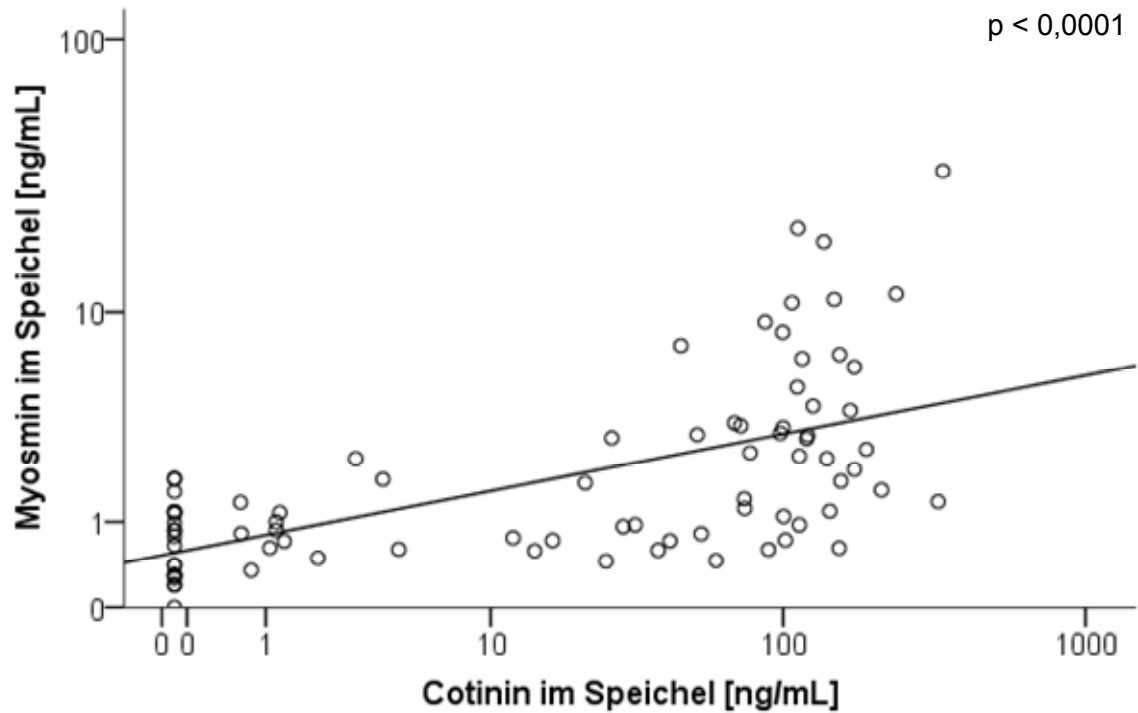


Abb. 3–14 Korrelation von Myosmin und Cotinin im Speichel aller Probanden (die Linie stellt die lineare Korrelation dar, die Werte das Ergebnis des Spearman Rank Tests)

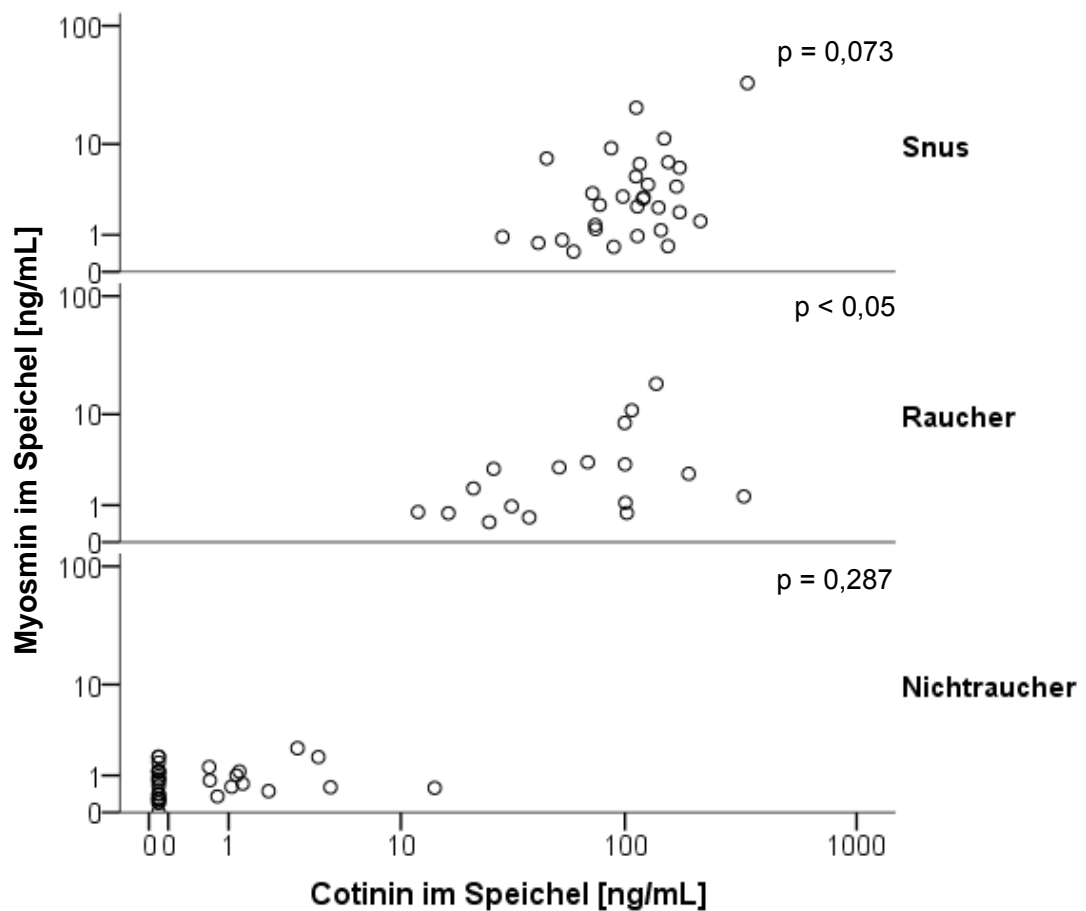


Abb. 3–15 Logarithmische Darstellung der Korrelation von Myosmin und Cotinin im Speichel, unterteilt nach der Verwendung von Tabakprodukten

Mit der Anzahl gerauchter Zigaretten/Tag ergaben sich im Spearman Rank Test signifikante Korrelationen für Cotinin ( $p < 0,001$ ), Nicotin ( $p < 0,005$ ) und Myosmin ( $p < 0,005$ ) im Plasma.

**Tab. 3–22 Tabakalkaloide im Plasma von Rauchern aus Polen; MW±SD**

Alkaloid	n	Konzentration (ng/ml)	Signifikanzen versus*, p<	
			Myosmin	Nicotin
Myosmin	66	0,59± 0,29		
Nicotin	65	16,09±10,86	0,001	
Cotinin	66	148,49±77,74	0,001	0,001

\* Die Vergleiche wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple Comparison Test berechnet

### 3.3.3 Konzentration von Myosmin, Nicotin und Cotinin in Zehennägeln

Proben von Zehennägeln standen von 59 Probanden zur Verfügung, das sind 34,1% des Probandenpools. Cotinin, Myosmin und Nicotin wurde bei 12 Nichtrauchern (27%), 14 Rauchern (15%), 31 Verwendern von Snus (94%) und den beiden Zigarrenrauchern bestimmt, ein Raucher wurde von der Auswertung ausgeschlossen, weil kein Cotinin im Speichel nachweisbar war (Abb. 3–16).

Cotinin konnte in allen Zehennagelproben von Rauchern und Verwendern von Snus nachgewiesen werden, aber nur bei einem Nichtraucher. Bei allen anderen Nichtrauchern lag die Cotininkonzentration unter dem LOD von 35 ng/g. Die Konzentrationen von Cotinin waren in den Zehennägeln der Raucher durchschnittlich 16mal höher als bei Nichtrauchern (1321 ng/g vs. 83,6 ng/g;  $p < 0,001$ ), bei Verwendern von Snus fast 30fach (2452 ng/g;  $p < 0,0001$ ). Auch der knapp 2fache Unterschied zwischen Rauchern und Verwendern von Snus war signifikant ( $p < 0,01$ ). Die Werte der Zigarrenraucher (235 und 2988 ng/g) lagen im Streubereich der Zigarettenraucher.

Nicotin konnte bei allen Rauchern und Verwendern von Snus nachgewiesen werden und auch bei 10 der 12 Nichtraucher. Raucher (1870 ng/g) hatten 9fach, Verwender von Snus (3774 ng/g) 18fach höhere Belastungen als Nichtraucher (213 ng/g;  $p < 0,0001$ ). Der Unterschied zwischen Rauchern und Snus-Benutzern erreichte kein Signifikanzniveau. In den Zehennägeln der beiden Zigarrenraucher fand sich mit 284 und 1834 ng/g eine sehr unterschiedliche Nicotinbelastung.

Die Myosminkonzentrationen erreichten in den Zehennägeln deutlich niedrigere Werte und sind im Insert der Abb. 3–15 vergrößert dargestellt. Myosmin war bei allen Verwendern von Snus und bei 12 von 13 Rauchern nachweisbar, dagegen nur bei 4 von 12 Nichtrauchern. Bei dem Raucher und bei 7 Nichtrauchern lag die Myosminkonzentration noch oberhalb des LOD. Die Unterschiede zwischen Nichtrauchern (22,1 ng/g) und Rauchern (67,9 ng/g) bzw. Verwendern von Snus (102,8 ng/g) waren signifikant ( $p < 0,01$ ), aber in ihrem Ausmaß (3fach bzw. 5fach) deutlich geringer als bei den beiden anderen Tabakalkaloiden. Raucher und Verwender von Snus unterschieden sich nicht signifikant, bei den Zigarrenrauchern lagen nur einer auf Höhe des LOQ (30 ng/g), der andere unterhalb des LOD. Es ergaben sich hochsignifikante Korrelationen sowohl zwischen den Konzentrationen von Cotinin und

Nicotin (Abb. 3–17), als auch zwischen der Nicotin- und Myosminkonzentration (Abb. 3–18) und ebenso für die Cotinin- und Myosminkonzentration (Abb. 3–19).

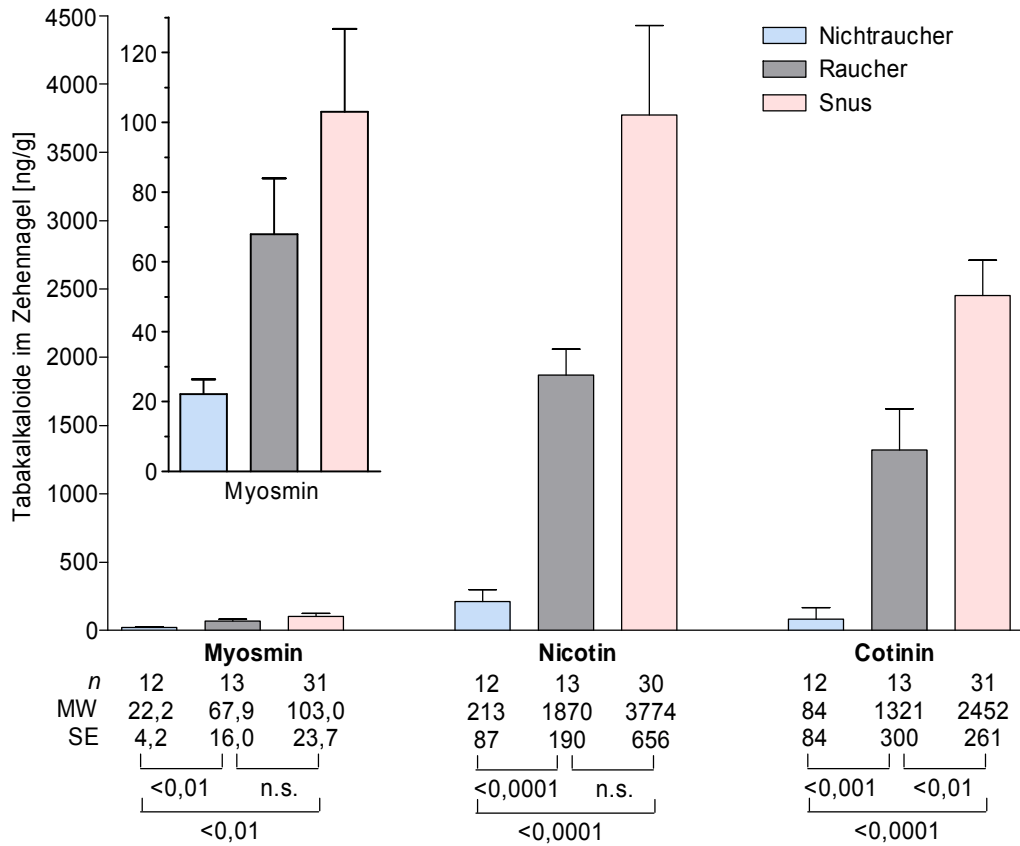


Abb. 3–16 Konzentrationen von Myosmin, Nicotin und Cotinin in Zehennagelproben von Nichtrauchern (blau), Rauchern (grau) und Verwendern von Snus (rot); MW±SE

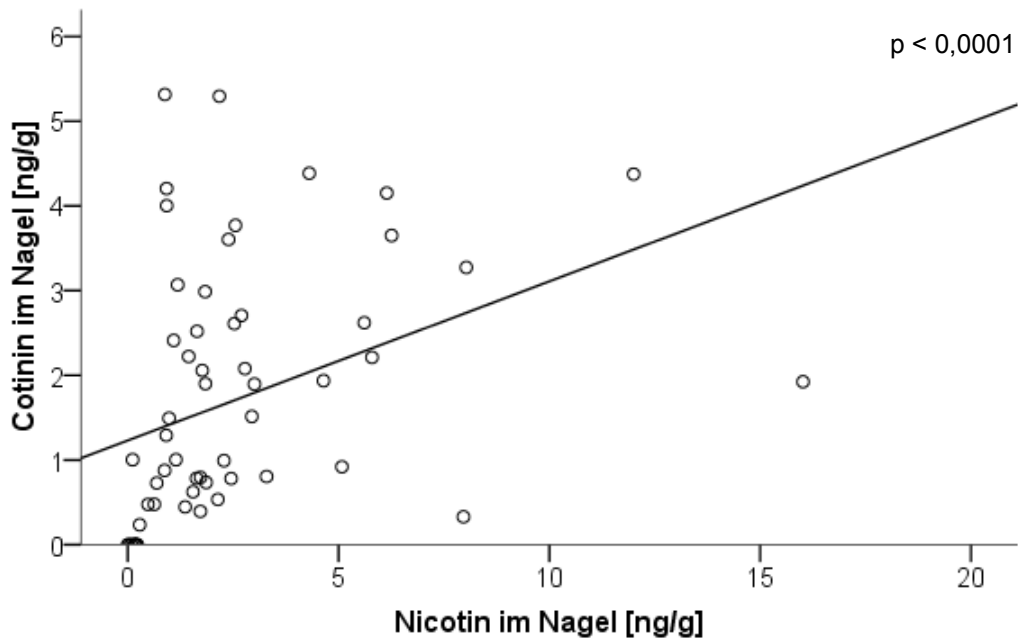
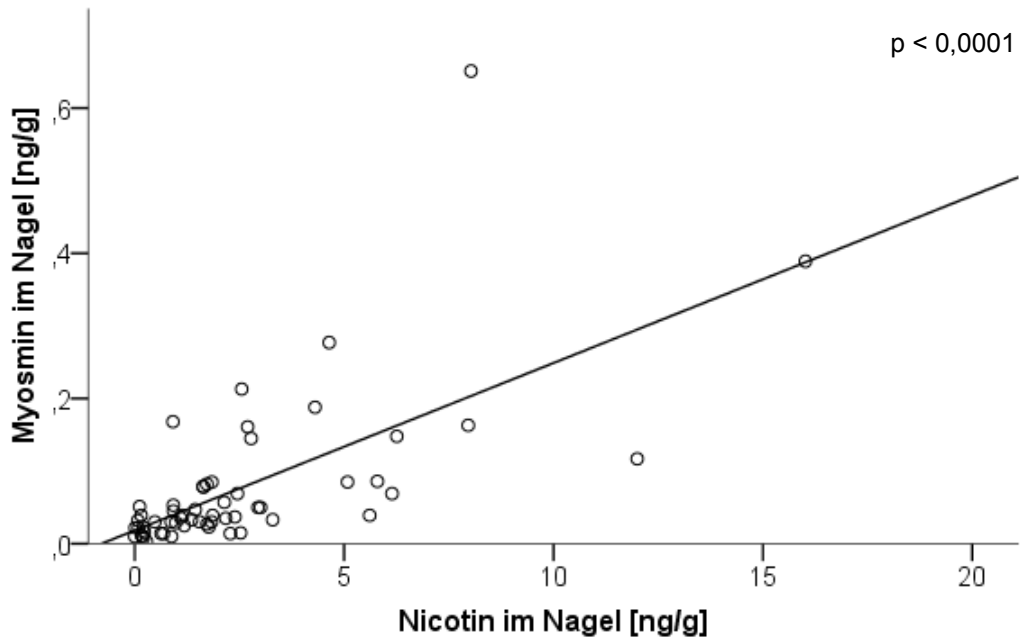
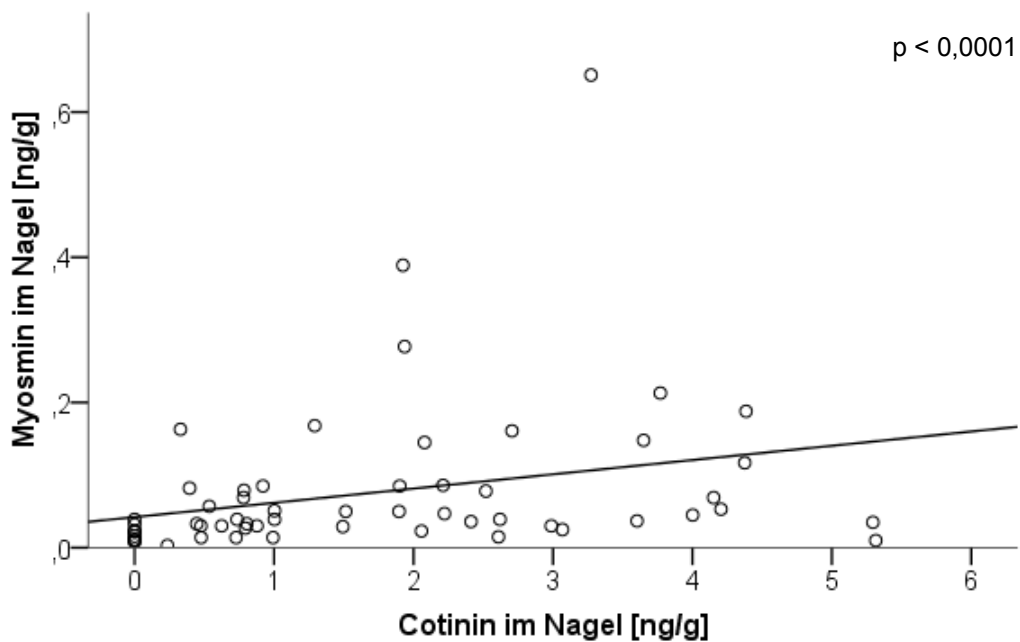


Abb. 3–17 Korrelation von Cotinin und Nicotin in Zehennägeln (die Linien zeigen die lineare Korrelation, die Werte das Ergebnis des Spearman Rank Tests)



**Abb. 3–18** Korrelation von Myosmin und Nicotin in Zehennägeln (die Linien zeigen die lineare Korrelation, die Werte das Ergebnis des Spearman Rank Tests)



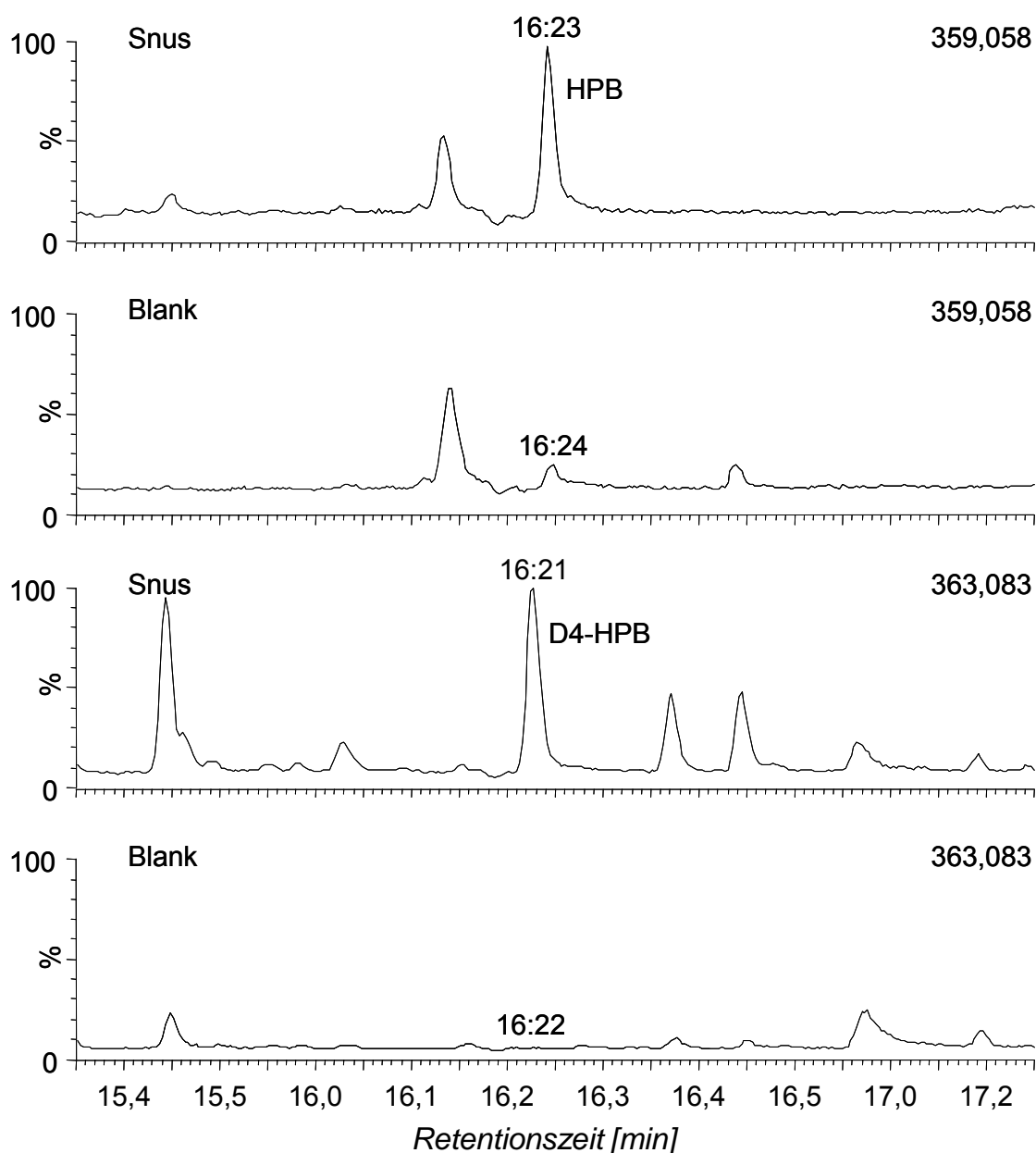
**Abb. 3–19** Korrelation von Myosmin und Cotinin in Zehennägeln (die Linien zeigen die lineare Korrelation, die Werte das Ergebnis des Spearman Rank Tests)

Es ergaben sich hochsignifikante Korrelationen sowohl zwischen den Konzentrationen von Cotinin und Nicotin (Abb. 3–17), als auch zwischen der Nicotin- und Myosminkonzentration (Abb. 3–18) und ebenso für die Cotinin- und Myosminkonzentration (Abb. 3–19).

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

Es konnten alle 173 Probanden auf HPB-freisetzende DNA-Addukte untersucht werden, 171 wurden nach Bestimmung des Cotinins ausgewertet (vgl. Kap. 3.3.2). Dazu wurde orale Mucosa der rechten und linken Wangeninnenseite verwendet. Bei 32 der 33 Benutzer von Snus (97%) wurde zusätzlich eine Probe aus dem Bereich entnommen, in den der Snus üblicher Weise platziert wurde, meist zwischen der oberen Lippe und dem Lippenbändchen.

Die Abb. 3–20 zeigt beispielhaft Chromatogramme eines Blindwerts (Blank) und der Probe eines Verwenders von Snus, welche mit Hilfe von GC/MS erstellt wurden. Im SIM-Modus wurden die Massenspuren des Analyten (HPB,  $m/z = 359,058$ ) und des dazu gehörigen deuterierten Internen Standards (D4-HPB,  $m/z = 363,083$ ) aufgenommen.



**Abb. 3–20** GC/MS Chromatogramme eines Leerwertes und eines Benutzers von Snus auf den Massenspuren von HPB ( $m/z = 359,0581$ ) und D4-HPB ( $m/z = 363,0828$ )

Mit Hilfe des Internen Standards wurde für jede Probe der Gehalt an HPB berechnet. Nach Division der HPB-Gehalte durch die DNA-Menge ergibt sich die Adduktkonzentration.

Von den insgesamt vermessenen 374 Proben (139 Doppel- und 32 Dreifachproben je Proband) lagen nur 4 Proben von Nichtrauchern unterhalb der Nachweisgrenze von 15 pg/mg DNA und wurden daher als nicht detektierbar (n.d.) gewertet. Bei den 90 Nichtraucherproben lagen 9 weitere Proben unterhalb der Bestimmungsgrenze von 46 pg/mg DNA, aber über der Nachweisgrenze. 361 Proben lagen oberhalb der Bestimmungsgrenze (97%). Nachdem in allen Untergruppen, Nichtrauchern, Rauchern und Verwendern von Snus, keine Unterschiede in den mittleren Adduktbelastungen zwischen der rechten und linken Seite bestand und bei den Verwendern von Snus auch an der Stelle der Platzierung des Tabaks keine Erhöhung der Adduktlevel zu verzeichnen war, wurden für jeden Proband der Mittelwert aus den erhaltenen Proben der Mucosa errechnet und für die weitere statistische Auswertung verwendet. Bei den 4 Proben unterhalb der Nachweisgrenze waren jeweils in der Probe der kontralateralen Seite die HPB-Addukte messbar. In diesem Fall wurde nicht gemittelt, sondern nur der gemessene Wert der zweiten Seite verwendet.

Wegen der geringen DNA-Mengen in den einzelnen Mundschleimhautproben konnten keine Doppelbestimmungen durchgeführt werden. Die Streuung der zwei Werte von der linken und rechten Wangenseite bei den Nichtrauchern und Rauchern, sowie der 3 Werte bei den Verwendern von Snus (Tab. 3–23) zeigen im Durchschnitt jedoch keine Abweichungen, die über das zu erwartende Mass bei einer hochsensitiven Rückstandsanalytik hinausgehen.

**Tab. 3–23 Prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Konzentrationen der HPB-freisetzen- den DNA-Addukte in den zwei bis drei Entnahmestellen der Mundschleimhaut**

	NR	Raucher	Snus	Zigarre	Zigarillo
Anzahl	41	90	33	2	1
MW±SD	25,6±21,3	6,5±8,2	17,3±12,8	19,3	17,6
Min.	0,2	0,1	0,1	2,4	
Max.	81,5	43,9	35,3	36,2	

### 3.3.5 Auswertung der DNA-Addukte

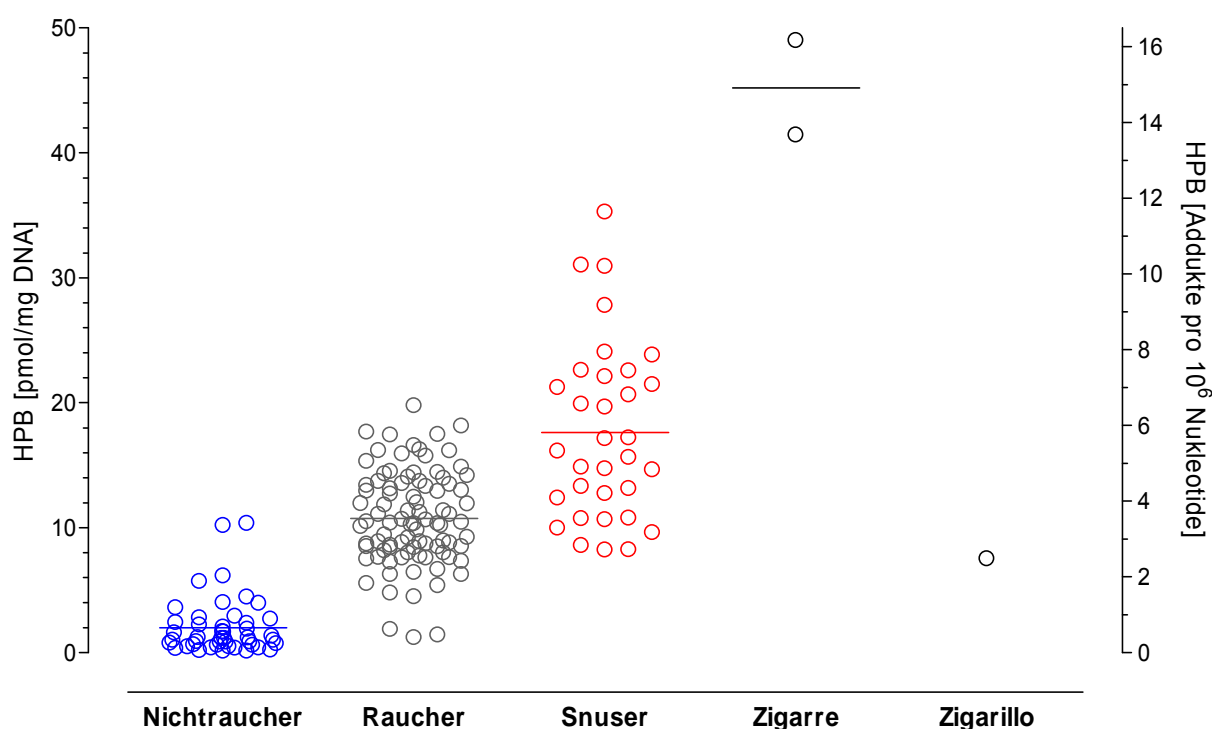
Im Vordergrund der Auswertung stand die Abhängigkeit der Adduktlevel vom Rauchverhalten. Daneben wurde der Einfluss des Alters und Geschlechts untersucht. Hier lagen uns Daten von allen Probanden vor. Fragebögen mit Angaben zu Ernährungs- und Trinkverhalten lagen dagegen nur von 105 Probanden (61%) vollständig ausgefüllt. Es wurden außerdem die Werte der 2 Zigarrenraucher und des Zigarillorauchers aus der weiteren Auswertung genommen.

### 3.3.5.1 HPB-Addukte in Abhängigkeit von Rauchstatus, Alter und Geschlecht

Die mittlere Adduktkonzentration der Raucher lag mit 10,7 pmol HPB/mg DNA um das 5fache, die Werte der Benutzer von Snus mit 17,6 pmol/mg um das 9fache über jenen der Nichtraucher (NR; 2,0 pmol/mg). Die Zigarrenraucher hatten mit 41,4 und 49,0 pmol/mg die höchsten Belastungen in der Mundschleimhaut, der Zigarilloraucher lag mit 7,5 pmol/mg im Bereich der Raucher (Tab. 3–24 und Abb. 3–21).

**Tab. 3–24 HPB-freisetzende DNA-Addukte in der Mundschleimhaut [pmol HPB/mg DNA]**

	NR	Raucher	Snus	Zigarre	Zigarillo
Anzahl	45	90	33	2	1
MW±SD	2,00±2,31	10,74±3,80	17,61±7,10	45,19±5,35	7,51
Min.	0,11	1,18	8,21	41,41	
Max.	10,33	19,75	35,26	48,97	



**Abb. 3–21 HPB-freisetzende DNA-Addukte in der Mundschleimhaut von Nichtrauchern, Rauchern, Benutzern von Schwedischem Snus, Zigarrenrauchern und einem Zigarilloraucher.**

Die Prüfung auf Normalverteilung der Werte mit dem Test von Kolmogorov-Smirnoff ergab für Raucher und Verwender von Snus ein positives Ergebnis ( $p > 0,1$ ) wurde aber für die Nichtraucher ( $p < 0,0001$ ) abgelehnt. Für die statistische Auswertung auf Unterschiede zwischen diesen Gruppen fand deshalb der nicht parametrische Test nach Kruskal-Wallis Anwendung. Demnach unterscheiden sich die Gruppen nach Rauchstatus insgesamt hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Der Post-Hoc-Test nach Tamhane ergab, dass sich alle 3 Gruppen signifikant mit  $p < 0,001$  voneinander unterscheiden.

Die Analysen zur Korrelation der HPB-Addukte mit der Belastung des Speichels mit Cotinin und Myosmin gibt nur für die gesamte Gruppe signifikante Zusammenhänge. Die Einzelauswertung der Nichtraucher, Raucher und Verwender von Snus ergibt dagegen keinerlei Zusammenhang. Bei den Rauchern aus Polen fehlt ebenfalls jeglicher Zusammenhang mit den Tabakalkaloiden (Tab. 3–25). Auch die Abhängigkeit von der Anzahl der gerauchten Zigaretten/Tag ( $n=90$ ; Spearman  $r=0,172$ ; n.s.) und der Snusportionen/Tag ( $n=33$ ; Spearman  $r=0,075$ ; n.s.) gab nur sehr schwache Zusammenhänge und erreichte keine statistische Signifikanz.

**Tab. 3–25 Korrelation HPB-freisetzender DNA-Addukte mit Tabakalkaloiden im Spearman Rank Test**

Gruppe	Cotinin in Speichel/Plasma			Myosmin in Speichel/Plasma			Nicotin in Plasma		
	n	r	p<	n	r	p<	n	r	p<
Alle	79	0,779	0,0001	78	0,507	0,0001			
Nichtraucher	32	0,015	n.s.	31	0,027	n.s.			
Raucher ohne Polen	17	0,002	n.s.	17	0,059	n.s.			
Raucher aus Polen	66	-0,199	n.s.	66	-0,099	n.s.	65	-0,090	n.s.
Verwender von Snus	30	0,254	n.s.	30	0,158	n.s.			

Die zusätzliche Auswertung getrennt nach Geschlecht ergab in allen Gruppen geringere Adduktlevel bei den weiblichen Probandinnen. Die Unterschiede zu den männlichen Probanden verfehlten bei den Nichtraucherinnen (-44%,  $p=0,0507$ ) knapp das Signifikanzniveau und waren bei den Raucherinnen (-50%,  $p<0,0001$ ) hochsignifikant, aber bei den wenigen Verwenderinnen von Snus (-15%: n.s.) nur gering ausgeprägt (Abb. 3–22, Tab. 3–26).

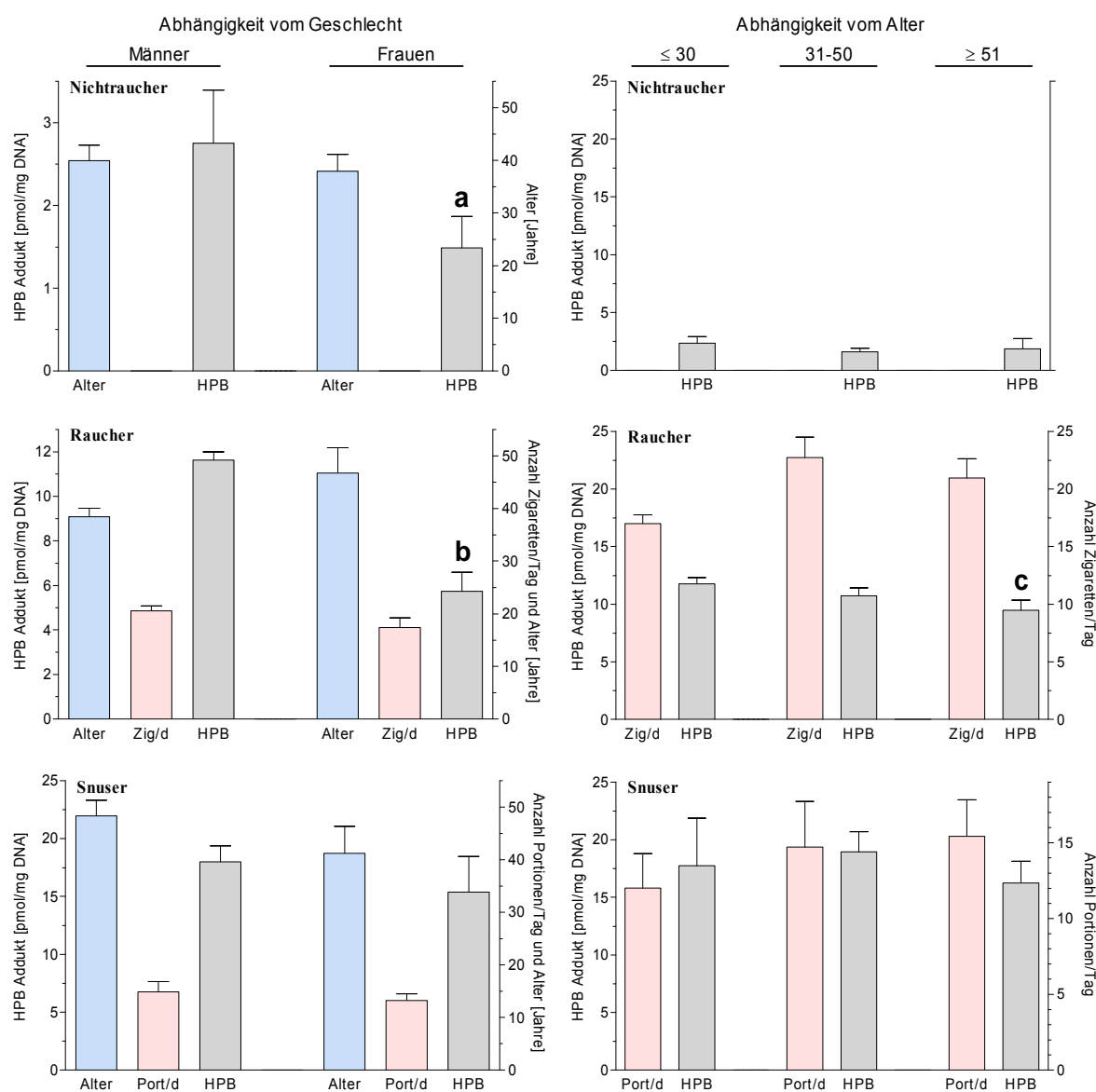
**Tab. 3–26 DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit von Rauchstatus, Geschlecht und Alter; N, MW±SD**

Rauchstatus	Männer	Frauen	≤ 30 Jahre	31-50 Jahre	≥ 51 Jahre
Nichtraucher	17 2,75±2,65	28 1,49±2,01	20 2,35±2,53	14 1,59±1,25	11 1,86±2,95
Raucher	76 11,65±3,19	14 5,77±2,95	33 11,75±3,11	30 10,73±3,76	25 9,48±4,41
Snus	28 18,01±7,18	5 15,38±6,88	5 17,73±9,24	14 18,94±6,56	14 16,24±7,13

Die Korrelationsanalysen mit dem Spearman Rank Test ergeben für Nichtraucher ( $n=45$ ,  $r=-0,144$ , n.s.) und Verwendern von Snus ( $n=33$ ,  $r=-0,158$ , n.s.) keinen signifikanten Zusammenhang. Bei den Rauchern (unter Auslassung der beiden Gelegenheitsraucher mit 1 oder 2 Zigaretten/Tag) nehmen die Addukte dagegen mit zunehmenden Alter signifikant ab ( $n=88$ ,  $r=-0,273$ ;  $p<0,01$ ), obwohl der Zigarettenkonsum mit dem Alter signifikant zunimmt ( $n=88$ ,  $r=-0,332$ ;  $p<0,005$ ). Die HPB-Addukte pro

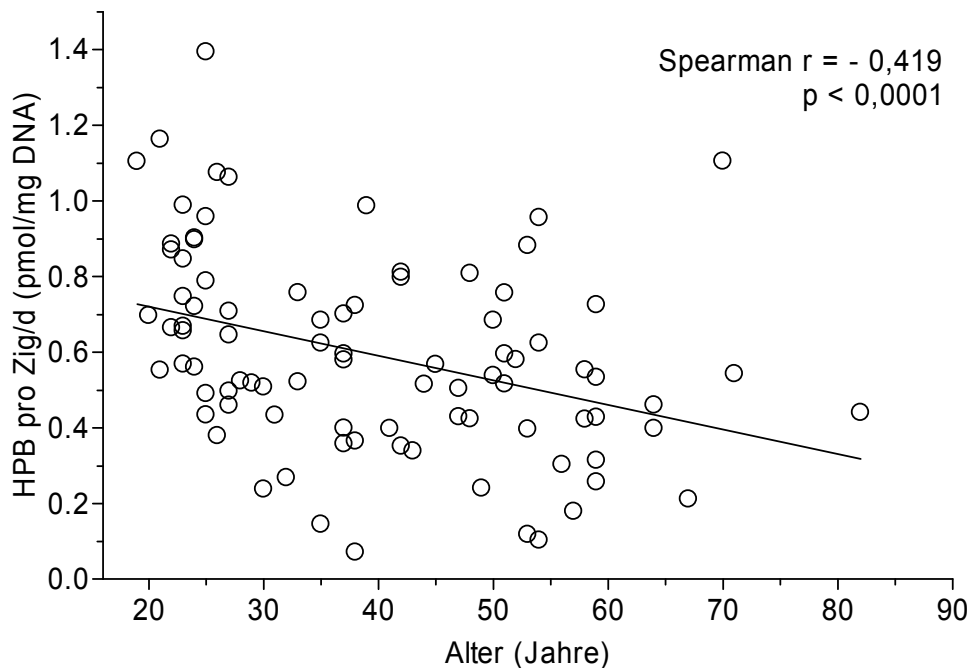


täglich gerauchter Zigarette nehmen dementsprechend mit dem Alter noch stärker ab ( $n=88$ ,  $r=-0,419$ ,  $p<0,0001$ ) (Abb. 3–23).



**Abb. 3–22 HPB-freisetzende DNA-Addukte in der Mundschleimhaut von Nichtrauchern, Rauchern und Benutzern von Schwedischem Snus in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter; MW $\pm$ SE, a,b: Signifikanz gegenüber Männern im Mann-Whitney Test,  $p=0,507$  (a) und  $p<0,0001$  (b); c: signifikant gegenüber den  $\leq 30$ -Jährigen,  $p<0,05$  im Friedman Test mit Posthoc Analyse nach Dunn**

Der gegenläufige Trend zwischen Alter und HPB-Addukten zeigt sich auch, wenn man die Probanden in drei Altersklassen unterteilt (Abb. 3–22, Tab. 3–26). Hier ergibt bei den Rauchern der Friedman-Test zwischen den Altersgruppen einen hoch signifikanten Unterschied in den HPB-Addukten und in dem täglichen Zigarettenkonsum (jeweils  $p<0,0001$ ). In der Posthoc Analyse nach Dunn sind aber nur die HPB-Addukte der ältesten Gruppe im Vergleich zur jüngsten Gruppe signifikant ( $p<0,05$ ). Alle anderen Unterschiede erreichen kein Signifikanzniveau.



**Abb. 3–23 Korrelation von HPB-freisetzenden DNA-Addukten pro täglich gerauchter Anzahl von Zigaretten mit dem Alter (die Linie zeigt die lineare Korrelation)**

### 3.3.5.2 Ernährungsgewohnheiten

Insgesamt haben 107 von 173 Probanden den gleichen Fragebogen ausgefüllt. Von den 66 polnischen Rauchern liegen keine vergleichbaren Daten vor. Sie wurden von den nachfolgenden Analysen ebenso ausgeschlossen wie 2 Raucher mit fraglichem Rauchstatus und die beiden Zigarren- und der Zigariloraucher. Zur Auswertung kamen demnach die Angaben von 102 Probanden.

Einleitend wurde nach Hauptmahlzeiten und der Häufigkeit von Zwischenmahlzeiten gefragt. 66 Probanden nahmen als Hauptmahlzeiten Frühstück, Mittag- und Abendessen ein (64,7%), darunter waren 34 Nichtraucher, 14 Raucher und 18 Benutzer von Snus. Für 11 Probanden (10,8%) stellten Frühstück und Abendessen die Hauptmahlzeiten dar. 8 Probanden (7,8%) gaben an, dass Mittag- und Abendessen für sie die wichtigsten Mahlzeiten sind, 4 Probanden (3,9%) gaben Frühstück und Mittagessen als Hauptmahlzeiten den Vorrang. 8 Probanden (7,8%) bevorzugten das Abendessen als Hauptmahlzeit. 3 Probanden (2,9%) gaben Frühstück als alleinige Hauptmahlzeit an und lediglich 2 nahmen als Hauptmahlzeit nur Mittagessen (2,0%) ein. Die Werte sind in Tab. 3–27 dargestellt.

Die Frage nach der Einnahme von Zwischenmahlzeiten beantworteten 47 Probanden mit „ja“ (46,1%), dagegen gaben 58 Probanden an, keine Zwischenmahlzeiten zu verwenden (56,9%). Es zeigte sich keine Abhängigkeit in Bezug auf die DNA-Adduktlevel (Tab. 3–28).

Es wurde auch erfragt, wie häufig salzige Speisen von den Probanden in der Ernährung verwendet wurden (Tab. 3–29). 41 Probanden gaben „selten“ an (40,2%), 45 Probanden antworteten mit „gelegentlich“ (44,1%) und 19 Probanden verwenden salzige Speisen „sehr häufig“ (18,6%). Es konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

**Tab. 3–27 Angaben zu den Hauptmahlzeiten (Anzahl/Kategorie) unterteilt nach Rauchstatus**

Hauptmahlzeiten	Alle	Nichtraucher	Raucher	Snus
Frühstück	3	1	1	1
Mittag	2	2	0	0
Abendessen	8	0	3	5
Alles	66	34	14	18
Frühstück + Mittag	4	2	0	2
Frühstück + Abendessen	11	5	2	4
Mittag + Abendessen	8	1	4	3

**Tab. 3–28 HPB-freisetzende DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Verzehr von Zwischenmahlzeiten**

Zwischenmahlzeiten	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
ja	Nichtraucher	19	2,54±2,99	1,57
	Raucher	9	6,89±2,53	7,23
	Snus	19	17,80±5,66	17,12
nein	Nichtraucher	26	1,60±1,59	1,13
	Raucher	15	7,71±4,48	7,49
	Snus	14	17,36±8,92	14,72

**Tab. 3–29 HPB-freisetzende DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Verzehr salziger Speisen**

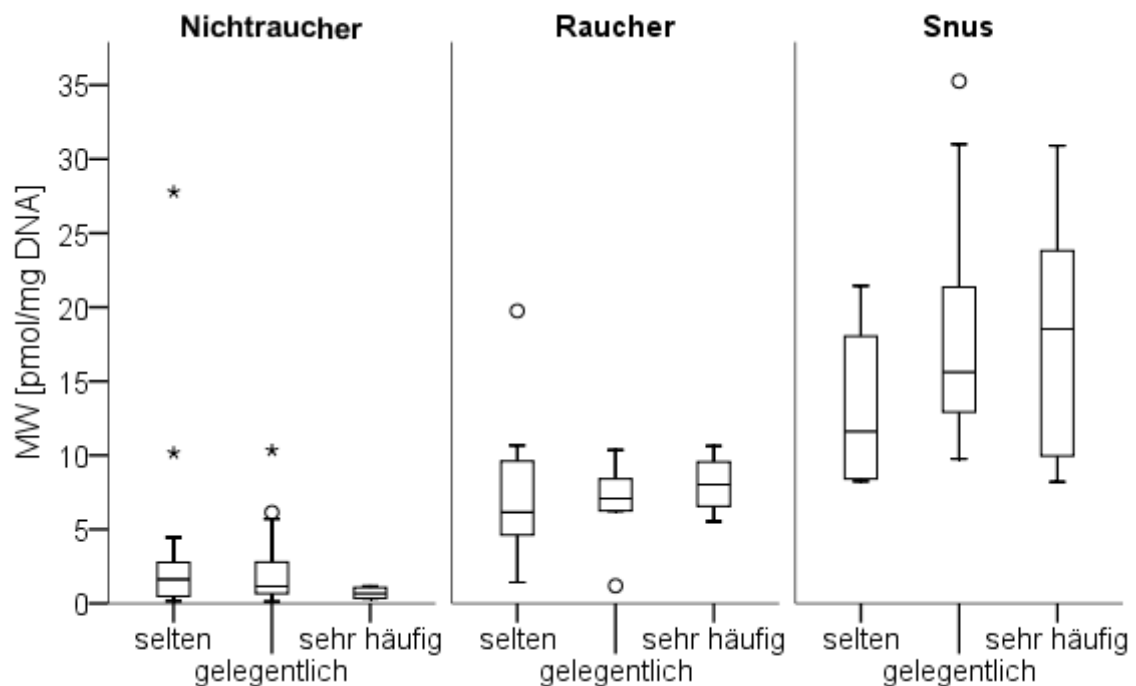
salzige Speisen	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
selten	Nichtraucher	17	1,56±1,62	0,88
	Raucher	11	8,09±4,65	7,23
	Snus	11	17,42±7,27	14,71
gelegentlich	Nichtraucher	22	2,51±2,86	1,66
	Raucher	10	5,92±2,82	6,53
	Snus	12	19,31±8,21	20,13
sehr häufig	Nichtraucher	6	1,35±1,32	0,86
	Raucher	3	9,82±1,17	10,36
	Snus	10	15,78±5,50	15,47

Den Verzehr von scharfen Speisen gaben 18 Probanden mit „sehr häufig“ an (17,6%), 59 Probanden verwendeten scharfe Speisen „gelegentlich“ (57,8%) und 28 „selten“ bis „gar nicht“ (27,5%). Auffällig ist der 3fach niedrigere Mittelwert bei Nichtrauchern, die scharfe Speisen sehr häufig verzehrten im Vergleich zu Nichtrauchern, die scharfe Speisen nur „selten“ oder „gelegentlich“ aßen (Abb. 3–24,

Tab. 3–30). Allerdings ist die Anzahl von 4 Nichtrauchern in dieser Gruppe nicht aussagekräftig, so dass diese Erniedrigung auch keine statistische Signifikanz erreicht.

**Tab. 3–30 HPB-freisetzende DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Essen scharfer Speisen**

scharfe Speisen	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
selten	Nichtraucher	13	2,14±2,69	1,57
	Raucher	10	7,47±5,38	6,29
	Snus	5	16,13±8,45	14,62
gelegentlich	Nichtraucher	28	2,11±2,28	1,17
	Raucher	10	7,07±2,57	7,06
	Snus	18	17,97±6,86	15,87
sehr häufig	Nichtraucher	4	0,71±0,43	0,67
	Raucher	4	8,05±2,11	8,02
	Snus	10	17,71±7,55	18,53

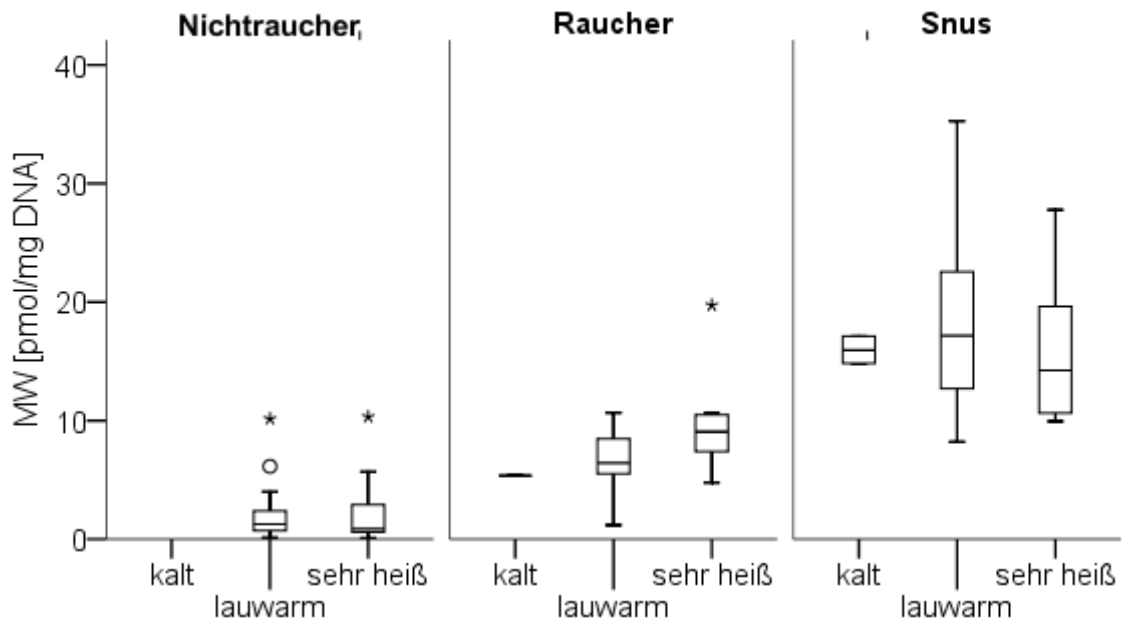


**Abb. 3–24 HPB-freisetzende DNA-Addukte in Abhängigkeit vom Essen scharfer Speisen**

Der Einfluss der Temperatur der Speisen auf die DNA-Adduktlevel wurde ebenfalls untersucht. 3 Probanden gaben an, hauptsächlich kalte Speisen zu essen (2,9%), 69 Probanden nahmen ihre Mahlzeiten eher lauwarm ein (67,6%) und 33 Probanden (32,4%) bevorzugten sehr heißes Essen. Bei Rauchern zeigte sich mit steigender Temperatur eine Zunahme der DNA-Adduktlevel, die jedoch nicht signifikant ausfiel. Dieser Trend konnte bei den Verwendern von Snus nicht bestätigt werden (Abb. 3–25, Tab. 3–31).

**Tab. 3–31 HPB-freisetzende DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit der Temperatur der Speisen**

Temperatur	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
selten	Nichtraucher	0		
	Raucher	1	5,35	5,35
	Snus	2	15,97±1,62	15,97
gelegentlich	Nichtraucher	28	1,93±2,11	1,24
	Raucher	16	6,47±3,04	6,53
	Snus	25	18,11±7,51	17,18
sehr häufig	Nichtraucher	17	2,10±2,66	0,85
	Raucher	7	9,81±4,81	8,40
	Snus	6	16,08±6,79	14,24



**Abb. 3–25 HPB-Addukte in Abhängigkeit zur Temperatur des Essens**

Die Einteilung nach den am häufigsten verwendeten Brotsorten, Weißbrot, Schwarzbrot oder Vollkornbrot, ergab keine signifikanten Unterschiede in der Adduktbelastung (Tab. 3–32). 8 Probanden bevorzugten Weißbrot (7,8%), 27 Probanden aßen regelmäßig Schwarzbrot (26,5%), 52 bevorzugten Vollkornbrot (51,0%) und 18 gaben an, alle Brotsorten zu essen (17,6%). Nichtraucher, die angaben, alle Brotsorten zu essen, wiesen doppelt so hohe DNA-Adduktlevel auf wie Verwender von Weißbrot oder Schwarzbrot allein. Dagegen wurden geringere DNA-Adduktlevel bei Rauchern und Snusern nachgewiesen, die alle Brotsorten essen im Vergleich zu den einzelnen Brotsorten.

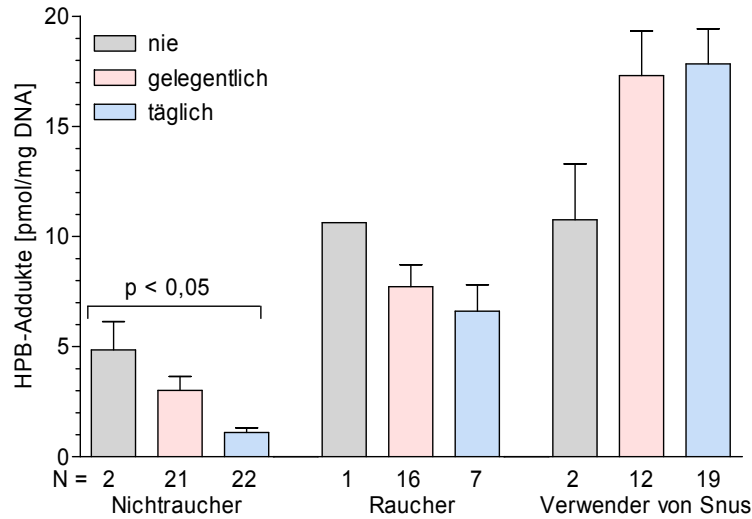
**Tab. 3–32 HPB-freisetzende DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit der Präferenz zu verschiedenen Brotsorten**

<b>Brotsorte</b>	<b>Rauchstatus</b>	<b>n</b>	<b>MW±SD</b>	<b>Median</b>
Weißbrot	Nichtraucher	2	1,57±1,70	1,57
	Raucher	2	8,07±3,60	8,07
	Snus	4	20,78±9,37	22,00
Schwarzbrot	Nichtraucher	14	1,56±1,21	1,24
	Raucher	6	7,39±1,63	6,53
	Snus	4	18,86±11,28	17,18
Vollkornbrot	Nichtraucher	21	1,90±2,38	0,97
	Raucher	8	7,82±5,45	6,73
	Snus	23	16,99±6,41	15,62
alles	Nichtraucher	8	3,11±3,52	1,77
	Raucher	8	6,82±3,71	7,02
	Snus	2	15,91±1,70	15,91

Die Häufigkeit des Verzehrs von Obst und Gemüse wird mit einem erniedrigten Krebsrisiko für die Mundhöhle in Zusammenhang gebracht [219]. Nur 5 Probanden gaben an, kein Obst oder Gemüse im täglichen Ernährungsplan zu verwenden (4,9%). 51 Probanden ernährten sich mehrmals pro Woche von Obst oder Gemüse (50,0%), 49 Probanden aßen täglich frisches Obst und Gemüse (48,0%). Der zunehmende Verzehr von Obst und Gemüse führte bei Nichtrauchern zu einer signifikanten Abnahme der DNA-Adduktlevel ( $p < 0,05$ ), die sich bei Rauchern nur tendenziell zeigte (n.s.) und bei Verwendern von Snus nicht zu sehen war (Abb. 3–26, Tab. 3–33).

**Tab. 3–33 HPB-freisetzende DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Verzehr von Obst und Gemüse**

<b>Obst/Gemüse</b>	<b>Rauchstatus</b>	<b>n</b>	<b>MW±SD</b>	<b>Median</b>
nie	Nichtraucher	2	4,86±1,82	4,86
	Raucher	1	10,62	10,62
	Snus	2	10,67±3,58	10,76
gelegentlich	Nichtraucher	21	2,65±2,91	1,68
	Raucher	16	7,54±4,17	6,94
	Snus	12	18,40±7,58	16,62
täglich	Nichtraucher	22	1,11±0,96	0,93
	Raucher	7	6,62±3,14	7,62
	Snus	19	17,83±6,93	17,18

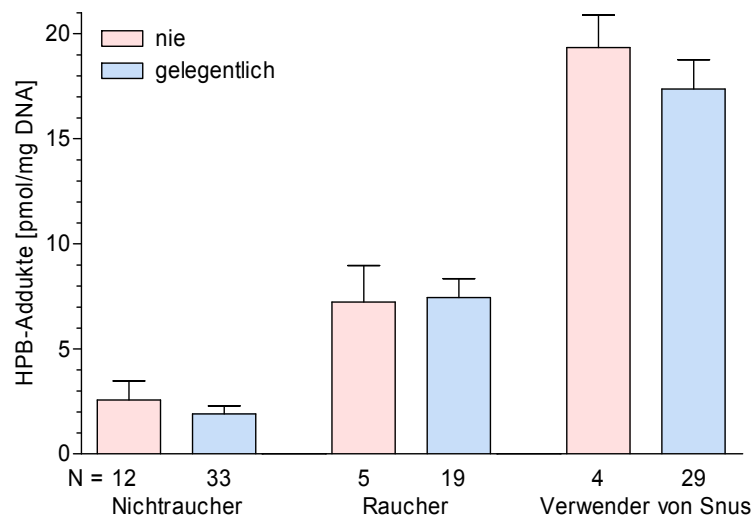


**Abb. 3–26 HPB-Addukte in Abhängigkeit vom Rauchstatus und der Verzehrmenge an Obst und Gemüse; MW±SE**

22 Probanden gaben an, keinen Fisch zu essen (21,6%). Dagegen haben 83 Probanden gelegentlich bis mehrmals pro Woche Fisch auf ihrem Speiseplan stehen (81,4%). Kein Proband aß täglich Fisch. Der gelegentliche Fischverzehr reduzierte statistisch nicht signifikant die DNA-Adduktlevel bei Nichtrauchern um 30%. bei Verwendern von Snus um 10%, aber nicht bei Rauchern.

**Tab. 3–34 HPB-freisetzende DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Fischverzehr**

Fisch	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
nie	Nichtraucher	12	2,57±3,15	1,03
	Raucher	5	7,23±3,87	8,40
	Snus	4	19,34±3,09	20,55
gelegentlich	Nichtraucher	33	1,79±3,15	1,14
	Raucher	19	7,45±3,91	7,23
	Snus	29	17,37±7,49	15,62



**Abb. 3–27 HPB-Adduktlevel in Abhängigkeit vom Fischverzehr; MW±SE**

Den täglichen Genuss von Fleisch gaben 10 Probanden an (9,8%), 90 Probanden konsumierten mehrmals pro Woche Fleisch (88,2%) und 5 ernährten sich fleischlos (4,9%). Bei Rauchern zeigte sich mit zunehmender Häufigkeit des Fleischkonsums eine deutliche Erhöhung der DNA-Addukte, die aber keine statistische Signifikanz erreichte (Tab. 3–35). Unter den Verwendern von Snus gab es keinen Vegetarier. Bei täglichem Verzehr von Fleisch erhöhten sich auch hier die Adduktlevel (+18%, n.s.). Bei Nichtrauchern ist der Unterschied zwischen Vegetariern und Fleischkonsumenten gering, obwohl die drei Nichtraucher, die täglich Fleisch aßen auffallend niedrige Adduktwerte hatten. Die vergleichende Betrachtung von Vegetariern und Fleischessern zeigt gering erhöhte Adduktlevel durch Fleischverzehr bei Nichtrauchern (+13%, n.s.) und etwas größere Unterschiede bei den Rauchern (+30%, n.s.) (Abb. 3–28).

**Tab. 3–35 HPB-freisetzende DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Fleischverzehr**

<b>Fleisch</b>	<b>Rauchstatus</b>	<b>n</b>	<b>MW±SD</b>	<b>Median</b>
nie	Nichtraucher	3	1,86±1,85	0,88
	Raucher	2	5,79±0,62	5,79
	Snus	0		
gelegentlich	Nichtraucher	39	2,10±2,42	1,19
	Raucher	21	7,40±4,00	7,49
	Snus	27	17,05±7,12	14,82
täglich	Nichtraucher	3	0,83±0,35	0,85
	Raucher	1	10,62	10,62
	Snus	6	20,15±7,01	20,66

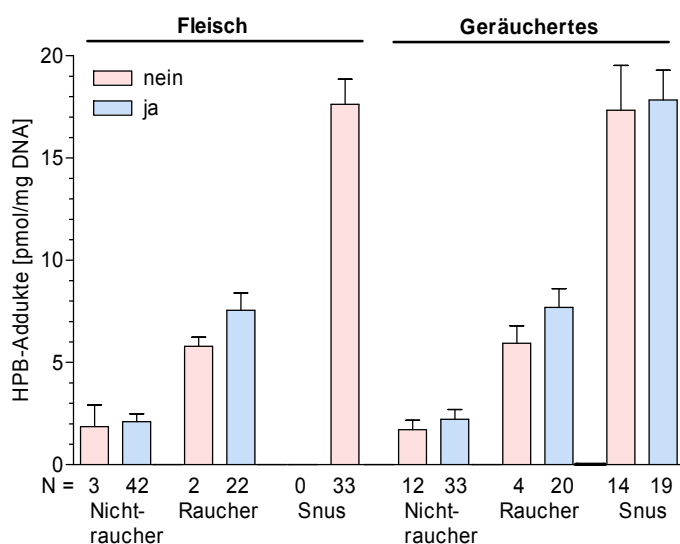
Den Genuss von Geräuchertem gaben 72 Probanden an (70,6%), 32 Probanden konsumierten keine geräucherten Waren (31,4%). Ein Verwender von Snus gab den täglichen Gebrauch von geräucherten Lebensmitteln an. Wie mit dem Fleischverzehr, steigen die Addukte auch mit dem Wurstverzehr bei Nichtrauchern (+30%, n.s.) und Rauchern (+30%, n.s.) an. Bei Verwendern von Snus zeigt sich kein Einfluss (Abb. 3–28, Tab. 3–36).

Die überwiegende Mehrheit der Probanden gab an Schokolade gelegentlich bis mehrmals in der Woche zu genießen (n=75, 73,5%) (Tab. 3–37). Nur 18 Probanden (19,6%) aßen keine Schokolade, darunter kein Nichtraucher und nur 4 Raucher. Am geringsten war die Zahl der Probanden, die täglich nicht auf Schokolade verzichten können (n=11, 10,8%), davon 7 Nichtraucher. Im Vergleich zu gelegentlichem Verzehr erhöhte der tägliche Konsum von Schokolade bei Nichtrauchern die DNA-Adduktlevel auf fast das Doppelte (+77%, p<0,05). Dagegen hatten Raucher (+33%, n.s.) und Benutzer von Snus (+21%, n.s.), die ganz auf Schokolade verzichteten, höhere Adduktwerte als solche die gelegentlich Schokolade verzehrten.



**Tab. 3–36 HPB-freisetzende DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Verzehr geräucherter Fleischwaren**

Geräuchertes	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
nie	Nichtraucher	12	1,71±1,62	0,93
	Raucher	4	5,94±1,71	5,44
	Snus	14	17,32±8,22	14,72
gelegentlich	Nichtraucher	33	2,10±2,53	1,17
	Raucher	20	7,69±4,08	7,53
	Snus	18	17,49±6,39	17,15
täglich	Nichtraucher	0		
	Raucher	0		
	Snus	1	23,80	23,80



**Abb. 3–28 Einfluss des Verzehrs von Fleischprodukten und Geräuchertem auf HBP-Addukte**

**Tab. 3–37 HPB-freisetzende DNA-Adduktlevel [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Genuss von Schokolade**

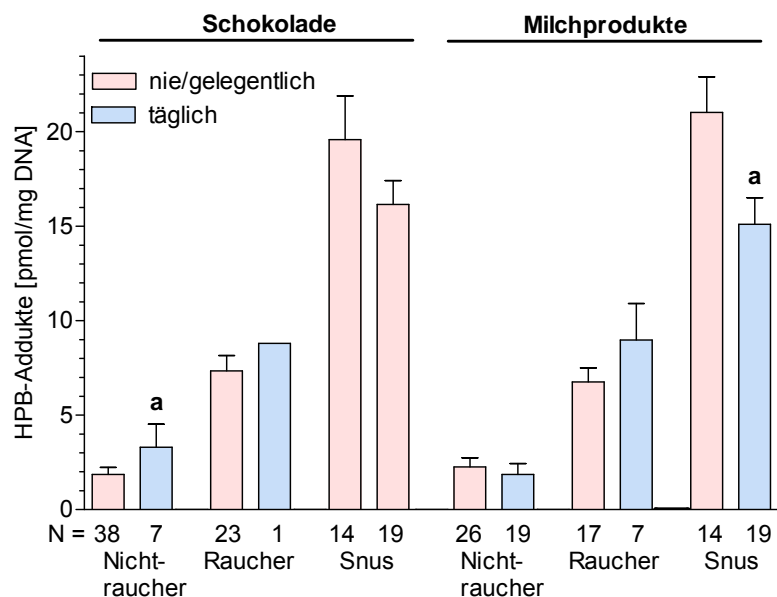
Schokolade	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
nie	Nichtraucher	0		
	Raucher	4	10,06±7,56	9,54
	Snus	14	19,59±8,64	21,76
gelegentlich	Nichtraucher	38	1,86±2,27	0,93
	Raucher	19	6,77±2,65	6,64
	Snus	16	16,19±5,62	15,87
täglich	Nichtraucher	7	3,30±3,23	2,20
	Raucher	1	8,80	8,80
	Snus	3	15,94±6,06	14,62

Für die überwiegende Mehrzahl der Probanden gehörten Milchprodukte täglich (n=45, 44,1%) oder gelegentlich (n=53; 52%) zum Speiseplan. Nur 7 Probanden (6,9%) gaben an, keine Milchprodukte zu verwenden. Mit zunehmendem Verzehr von Milchprodukten zeigte sich bei Nichtrauchern ein geringfügiger Rückgang der DNA-Adduktlevel (-5% und -15%, n.s.), bei Verwendern von Snus fiel diese Abnahme (-29% und -45%;  $p<0,05$ ) wesentlich deutlicher aus (Tab. 3–38). Die Adduktlevel der Raucher wurden stiegen dagegen bei täglichem Genuss von Milchprodukten nicht signifikant an (+33%).

Die Abb. 3–29 zeigt die Adduktwerte bei täglichem Verzehr von Schokolade und Milchprodukten im Vergleich zu der Gruppe von Probanden, die nie oder nur gelegentlich diese Produkte zu sich nahmen.

**Tab. 3–38 HPB-freisetzende DNA-Addukte [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Konsum von Milchprodukten**

Milchprodukte	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
nie	Nichtraucher	4	2,19±2,65	1,01
	Raucher	0		
	Snus	3	27,29±6,94	24,04
gelegentlich	Nichtraucher	22	2,08±2,19	1,62
	Raucher	17	6,75±3,11	7,23
	Snus	11	19,31±6,30	19,64
täglich	Nichtraucher	19	1,86±2,50	0,97
	Raucher	7	8,97±5,11	7,57
	Snus	19	15,10±6,17	13,29



**Abb. 3–29 Einfluss des Konsums von Schokolade und Milchprodukten auf HPB-Addukte; MW±SE, (a) signifikant verschieden von der Gruppe "nie/gelegentlich" ( $p<0,05$ )**

### 3.3.5.3 Trinkverhalten

Auf die Frage nach der täglichen Trinkmenge gaben 13 Probanden an, weniger als 1,5 Liter zu trinken (12,7%). 58 Probanden tranken täglich zwischen 1,5 und 2 Liter (56,9%) und 34 Probanden erklärten eine Trinkmenge von über 2 Litern am Tag (33,3%). Die DNA-Adduktlevel der Probanden, die weniger als 1,5 Liter und mehr als 2 Liter am Tag tranken unterscheiden sich bei allen Gruppen, Nichtrauchern, Rauchern und Verwendern von Snus nur geringfügig, sind aber bei einer täglichen Trinkmenge zwischen 1,5 Litern und 2 Litern generell um 30 bis 55% erhöht, ohne dass diese Unterschiede statistische Signifikanz erreichten Tab. 3–39. Fasst man die Probanden in zwei Gruppen zusammen, dann zeigt sich, dass eine hohe tägliche Trinkmenge von >2 Liter die HPB-Addukte in allen Gruppen um etwa 20% erniedrigt (Abb. 3–30).

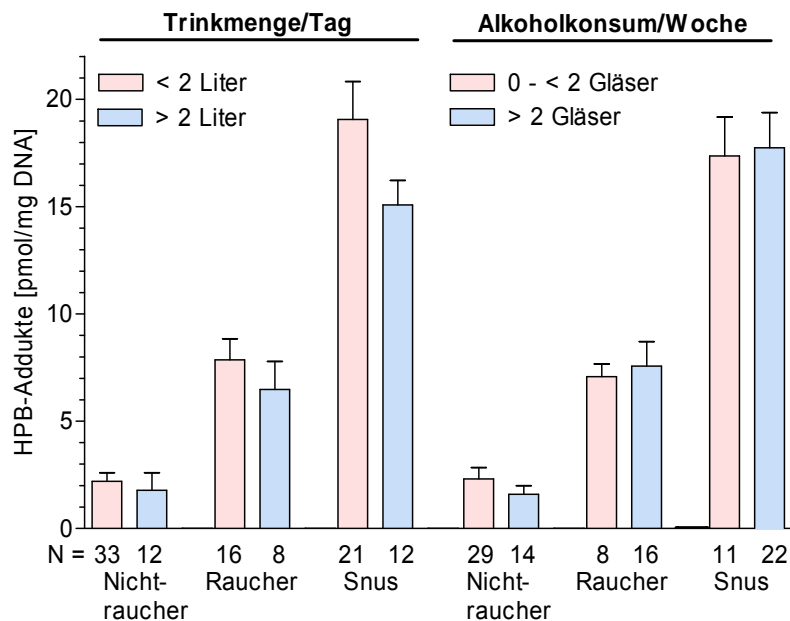
**Tab. 3–39 HPB-freisetzende DNA-Adduktlevel [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit von der täglichen Gesamttrinkmenge]**

Trinkmenge	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
< 1,5 Liter	Nichtraucher	4	1,44±0,90	1,05
	Raucher	3	6,13±0,56	6,23
	Snus	5	15,25±6,85	12,37
1,5 L– 2 Liter	Nichtraucher	29	2,17±2,22	1,63
	Raucher	13	8,26±4,27	7,62
	Snus	16	20,25±8,31	20,25
> 2 Liter	Nichtraucher	12	1,77±2,88	0,77
	Raucher	8	6,49±3,68	7,53
	Snus	12	15,08±3,95	14,77

**Tab. 3–40 HPB-freisetzende DNA-Adduktlevel [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom wöchentlichen Alkoholkonsum**

Alkohol	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
niemals	Nichtraucher	5	1,25±1,57	0,84
	Raucher	1	5,53	5,53
	Snus	4	13,92±2,18	14,66
< 2 Gläser	Nichtraucher	26	2,36±2,73	1,44
	Raucher	7	7,30±1,69	6,64
	Snus	7	19,32±6,77	19,87
> 2 Gläser	Nichtraucher	14	1,59±1,51	1,07
	Raucher	16	7,45±4,58	7,53
	Snus	22	17,74±7,71	15,47

Auf die Frage nach dem Alkoholkonsum gaben nur 10 Probanden an, keinen Alkohol zu trinken (9,6%), darunter lediglich ein Raucher. 41 Probanden tranken weniger als 2 Gläser Alkohol pro Woche (40,2%) und 54 tranken mehr als 2 Gläser pro Woche (52,9%). Bei Nichtrauchern und Verwendern von Snus fällt wie bei der Trinkmenge eine Erhöhung der DNA-Adduktlevel in der mittleren Kategorie von weniger als 2 Gläsern pro Woche auf. (maximal +89%). Auch diese Unterschiede erreichten kein Signifikanzniveau (Tab. 3–40). Vergleicht man die Probanden, die mehr als 2 Gläser Alkohol pro Woche tranken mit allen anderen Probanden, dann gehen die Unterschiede weitgehend verloren. Nur bei den Nichtrauchern ist noch eine leichte Abnahme der Adduktlevel (-31%) zu verzeichnen (Abb. 3–30).



**Abb. 3–30 Einfluss des Trinkverhaltens und des Alkoholkonsums auf HBP-Addukte; MW±SE**

Es wurde erfragt, ob die Probanden Tee tranken. Mit dieser Frage wurde keine Unterscheidung zwischen der Verwendung von Grün- oder Schwarztee getroffen. 35 Probanden beantworteten die Frage mit „ja“ (34,3%), 67 dagegen mit „nein“ (65,7%). In den Gruppen der Nichtraucher (-38%, n.s.) und der Raucher (-22%, n.s.) ist eine Tendenz zu niedrigeren DNA-Adduktleveln bei Teetrinkern zu verzeichnen. Unter den Verwendern von Snus führte der Genuss von Tee zu keinerlei Veränderungen (Abb. 3–31 und Tab. 3–41).

Auch Kaffeegenuss hatte keinen signifikanten Einfluss auf die DNA-Addukte (Tab. 3–42). Insgesamt gaben nur 8 Probanden (7,8%) an, keinen Kaffee zu trinken. Von den 94 Kaffeetrinkern genossen 28 weniger als 2 Tassen pro Tag (27,5%), 57 Probanden tranken täglich zwischen 2 und 5 Tassen Kaffee (55,9%) und 12 Probanden mehr als 5 Tassen (11,8%). Innerhalb dieser Kategorien von Kaffeetrinkern zeigte sich mit zunehmenden Kaffeegenuss eine nicht signifikante Abnahme der Adduktlevel um 8% und 36% bei Nichtrauchern und um 10% und 28% bei den Verwendern von Snus. Auch die Raucher, die täglich 2-5 Tassen Kaffee statt weniger als 2 Tassen tranken wiesen um 20% niedrigere

Adduktwerte auf. Gegenüber den wenigen Probanden, die keinen Kaffee tranken, ließ sich diese Tendenz nicht erkennen (Abb. 3–31 und Tab. 3–42).

**Tab. 3–41 HPB-freisetzende DNA-Adduktlevel [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Tee-genuss**

<b>Tee</b>	<b>Rauchstatus</b>	<b>n</b>	<b>MW±SD</b>	<b>Median</b>
nein	Nichtraucher	27	2,46±2,87	1,17
	Raucher	13	8,24±4,04	7,23
	Snus	27	17,55±7,33	15,62
ja	Nichtraucher	32	1,52±1,62	0,71
	Raucher	11	6,40±3,46	7,57
	Snus	6	17,90±6,55	20,92

**Tab. 3–42 HPB-freisetzende DNA-Adduktlevel [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Kaffee-genuss**

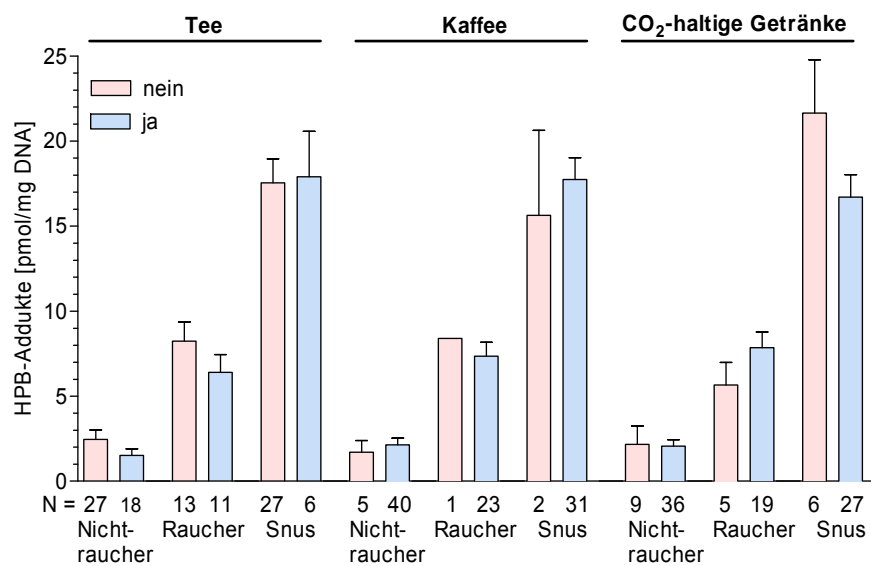
<b>Kaffee</b>	<b>Rauchstatus</b>	<b>n</b>	<b>MW±SD</b>	<b>Median</b>
nein	Nichtraucher	5	1,70±1,53	1,63
	Raucher	1	8,40	8,40
	Snus	2	15,63±7,06	15,63
ja	Nichtraucher	40	2,13±2,56	1,14
	Raucher	23	7,35±3,90	7,23
	Snus	31	17,74±7,20	16,12
<2 Tassen	Nichtraucher	17	2,17±1,97	1,86
	Raucher	5	8,71±1,81	8,47
	Snus	6	20,59±9,88	22,62
2-5 Tassen	Nichtraucher	21	1,99±2,83	0,97
	Raucher	18	6,98±4,27	6,44
	Snus	15	18,54±7,36	16,12
>5 Tassen	Nichtraucher	2	1,38±1,44	1,38
	Raucher	0		
	Snus	10	14,82±4,26	14,66

Hinsichtlich kohlenensäurehaltiger Getränke gaben 65 Probanden an diese Getränke „gelegentlich“ (63,7%), 19 Probanden sie „sehr häufig“ (18,6%) zu genießen, während 21 Probanden auf diese Getränke verzichteten (20,6%). Bei Verwendern von Snus zeigte sich im Bezug auf den Genuss kohlenensäurehaltiger Getränke eine Tendenz (n.s.) zur Abnahme der DNA-Adduktlevel mit zunehmendem Genuss, gegenüber Nichttrinkern um 19% bei gelegentlichem und um 38% bei sehr häufiger

Anwendung (Tab. 3–43). Bei Nichtrauchern gibt es diesen Abfall erst bei häufigem Trinken kohlen-säurehaltiger Getränke sichtbar, der dann aber sehr deutlich ausfiel (-75%,  $p < 0,05$ ). Bei Rauchern wiesen dagegen die 5 Probanden, die auf den Genuss kohlen-säurehaltiger Getränke verzichteten, die niedrigsten Adduktlevel (-28%, n.s.) (Abb. 3–31).

**Tab. 3–43 HPB-freisetzende DNA-Adduktlevel [pmol/mg DNA] in Abhängigkeit vom Konsum kohlen-säurehaltiger Getränke**

CO <sub>2</sub> -haltig	Rauchstatus	n	MW±SD	Median
nie	Nichtraucher	9	2,17±3,24	0,83
	Raucher	5	5,66±2,95	5,53
	Snus	6	21,64±7,69	22,74
gelegentlich	Nichtraucher	27	2,35±2,25	1,63
	Raucher	15	7,86±4,34	7,49
	Snus	22	17,45±7,18	16,37
sehr häufig	Nichtraucher	9	0,76±0,52	0,58
	Raucher	4	7,85±2,49	8,02
	Snus	5	13,47±3,51	13,12



**Abb. 3–31 Einfluss nicht alkoholischer Getränke auf HPB-Addukte; MW±SE**

## 4 Diskussion

### 4.1 Tierstudien

Ein Vorversuch mit wenigen Ratten diente der Etablierung von Aufarbeitungs- und Messmethoden in den verschiedenen beteiligten Arbeitsgruppen, um die benötigte Dosis von NNK für die geplanten Hemmversuche mit Ethanol und den chemopräventiven Substanzen festzulegen. Die verwendeten Konzentrationen von 1, 3 und 5 ppm NNK im Trinkwasser orientierten sich dabei an dem Versuch von Boysen et al. [220], bei dem die chemopräventive Wirkung von Isothiocyanaten untersucht wurde. In diesem Versuch hatten die Ratten 2 ppm NNK über 8 und 16 Wochen im Trinkwasser erhalten, gleichzeitig noch Benz[a]pyren im Futter (2 ppm) und die Isothiocyanate Benzylisothiocyanat (1  $\mu\text{mol/g}$ ) und Phenethylisothiocyanat (3  $\mu\text{mol/g}$ ) alleine oder gemeinsam ebenfalls über das Futter. Neben anderen Biomarkern wurden HPB-freisetzende Addukte in der DNA von Leber und Lunge der Ratten bestimmt und es zeigte sich kein Unterschied zwischen der 8- und 16-wöchigen Behandlung. Der eigene Vorversuch ergab, dass bereits nach 2 Wochen HPB-Addukte bei allen verwendeten NNK-Konzentrationen nachweisbar waren. Bei der Zuordnung der DNA-Proben zu den einzelnen Gruppen und Geweben sind offensichtlich Fehler unterlaufen. Im Gegensatz zu den weiteren Ergebnissen, die in Übereinstimmung mit Arbeiten anderer Forschungsgruppen [71,220] standen, wurden nur in diesem Versuch in der DNA der Leber höhere Adduktbelastungen gemessen als in der Lunge. Auf die Ergebnisse des Vorversuchs wird deshalb an dieser Stelle nicht weiter eingegangen. Die Ergebnisse der anderen Arbeitsgruppen zur DNA-Methylierung, DNA-Ethylierung, oxidativen DNA-Schäden und Mikrokernbildung liegen uns noch nicht oder nur unvollständig vor. Deshalb beschränkt sich die Diskussion auf die eigenen Ergebnisse zu den HPB-freisetzenden DNA-Addukten in Leber und Lunge.

In beiden Tierversuchen wurden sowohl NNK als auch Ethanol über das Trinkwasser verabreicht. Die hohe Kalorienzufuhr mit Ethanol über das Trinkwasser führte in diesen Gruppen zu einem deutlichen Rückgang der Futteraufnahme (Tab. 3–10 und Tab. 3–15) und damit auch der Wasseraufnahme (Tab. 3–9 und Tab. 3–14), während die Körpergewichtsentwicklung im ersten Versuch nicht (Tab. 3–11) und im Chemopräventionsversuch (Tab. 3–16) weniger als die Wasseraufnahme beeinträchtigt wurde. Die geringere Wasseraufnahme hatte zur Folge, dass die NNK-Dosis in den Ethanol-behandelten Ratten deutlich geringer ausfiel. Dies erschwert den direkten Vergleich der Adduktwerte, zumal sich bei den zwei Konzentrationen des ersten Versuchs (1 und 5 ppm NNK) keine lineare Dosisabhängigkeit zeigte, sondern bei 5 ppm bereits eine Sättigung der DNA-Adduktbildung zu sehen war (Abb. 3–7). Dies stimmt mit Ergebnissen von Staretz et al. [221] überein, die bei Ratten nach subkutaner Injektion mit steigenden NNK-Dosen ebenfalls keine lineare Abhängigkeit der HPB-freisetzenden Addukte in der Lunge gefunden haben und damit frühere Ergebnissen mit radioaktiv markiertem NNK bestätigten [222]. Um die Unterschiede in den Adduktwerten der Ratten mit und ohne Ethanolbehandlung besser vergleichbar zu machen, wurden die Ergebnisse an eine Sättigungskurve angepasst. Dies war bei dem

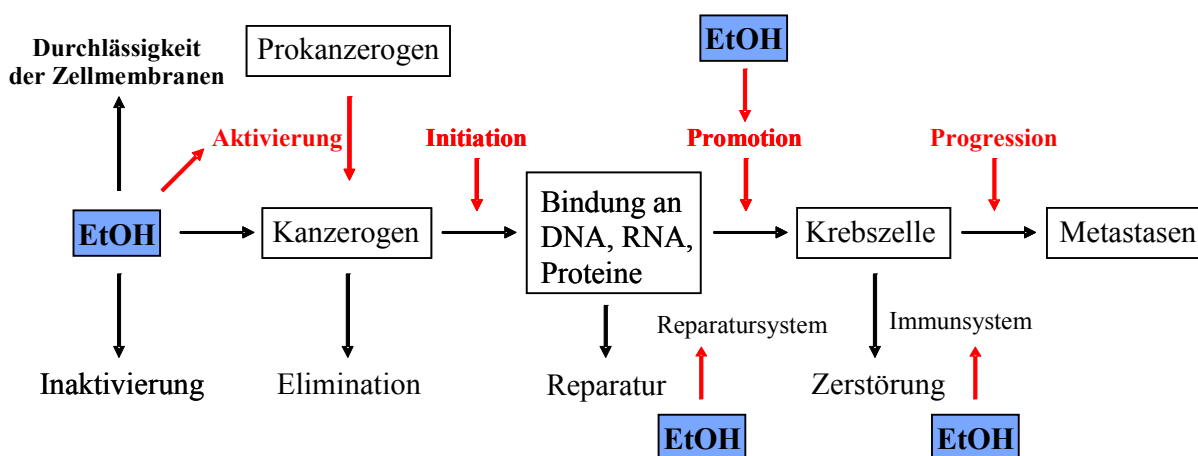
Chemopräventionsversuch mit nur einer NNK-Dosis nicht möglich. Deshalb wird auf eine eingehende Beurteilung des reinen Ethanoleffekts in diesem Versuch verzichtet, es werden im Wesentlichen nur die Veränderungen durch die Chemopreventiva innerhalb der beiden verschiedenen Behandlungsarme, NNK alleine und NNK plus Ethanol, besprochen. Es fällt jedoch auf, dass die HPB-freisetzenden Addukte im Chemopräventionsversuch niedrigere Werte erreichten, die eher mit der Trinkwasserkonzentration von 1 ppm als der von 5 ppm übereinstimmten (Tab. 3–13 und Tab. 3–17). Ein möglicher Grund für diese Unterschiede könnte in der Verwendung verschiedener Messgeräte liegen. Das hochauflösende Massenspektrometer ermöglichte nicht nur die Bestimmung von Hintergrundwerten der HPB-Addukte in Kontrollratten, sondern hat durch seine höhere Spezifität eventuell auch geringere absolute Werte für Gewebe der NNK-behandelten Ratten ergeben.

Der Nachweis von HPB-freisetzenden DNA-Addukten in Leber und Lunge von Kontrollratten des Chemopräventionsversuchs stärkt unsere Hypothese, dass es andere Quellen neben den TSNA für diese Addukte gibt. Das in Polen verwendete Rattenfutter wurde nicht auf Myosmin untersucht. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es ebenso wie das in der Dissertation von Schütte-Borkovec [212] analysierte Schweinefutter Myosmin enthält, zumal Myosmin bereits in verschiedenen Grundstoffen, insbesondere Cerealien, die auch Grundlage für Rattenfutter darstellen, nachgewiesen wurde [118]. In einem Rattenversuch mit Myosmin und Nitrit wurden bereits bei unbehandelten Ratten Hämoglobinaddukte nachgewiesen, die bei alkalischer Hydrolyse HPB freisetzen. Nach Behandlung mit Myosmin im Futter und gleichzeitiger Nitritzufuhr über das Trinkwasser erhöhten sich diese Addukte signifikant [223,224]. Dagegen fanden Hecht et al. [225] mit einer nicht ausreichend empfindlichen GC-MS-Methode keine HPB-freisetzenden DNA-Addukte in Leber und Lunge von Ratten, die ebenfalls mit Myosmin und Nitrit behandelt worden waren. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Quellen der HPB-Addukte in der Ratte aufzuklären und den Beitrag von Myosmin über die Bildungsmechanismen Nitrosierung und Peroxidation (Abb. 1–21) [129,131] zu erforschen.

#### **4.1.1 Interaktion von NNK und Ethanol**

Unter Einfluss von Ethanol kam es zu einer deutlichen Verringerung der HPB-Addukte in der Leber. Ethanol ist selbst ein Kanzerogen [226] und wird von der WHO im Zusammenhang mit der Einnahme alkoholischer Getränke in die Klasse 1 der Humankanzerogene eingestuft [227]. Von der deutschen MAK-Kommission wurde Ethanol in die Kategorie 5 der "Stoffe mit Krebs erzeugender und genotoxischer Wirkung" eingeordnet, deren "Wirkungsstärke jedoch als so gering erachtet wird, dass unter Einhaltung des MAK- und BAT-Wertes kein nennenswerter Beitrag zum Krebsrisiko für den Menschen zu erwarten ist" [228]. Neben dieser schwachen direkten kanzerogenen Wirkung fördert Ethanol auf verschiedene Weise die Kanzerogenese (vgl. 1.1.3, Abb. 4–1). So kann Ethanol z.B. durch Bildung sauerstofffreier Radikale im Rahmen seines oxidativen Metabolismus über CYP2E1 als Tumorpromoter wirken [229], das DNA-Reparatursystem stören und die Immunabwehr schwächen [226].





**Abb. 4–1 Einfluss von Ethanol auf die Tumorentwicklung (rote Pfeile) im Mehrstufenmodell der chemischen Kanzerogenese [230]**

Im Zusammenhang mit der Aktivierung von Prokanzerogenen, wie dem NNK, ist jedoch der Eingriff in den mikrosomalen hepatischen Metabolismus von besonderer Bedeutung. Ethanol führt zu einer starken Induktion von CYP2E1 in Leber und extrahepatischen Organen [231-233]. In Ratten führt eine chronische Behandlung mit Ethanol neben der Aktivierung von CYP2E1 auch zur Induktion anderer Isoenzyme, CYP2B1/2B2 [234] und CYP1A2 [235], die NNK auch metabolisch aktivieren [52].

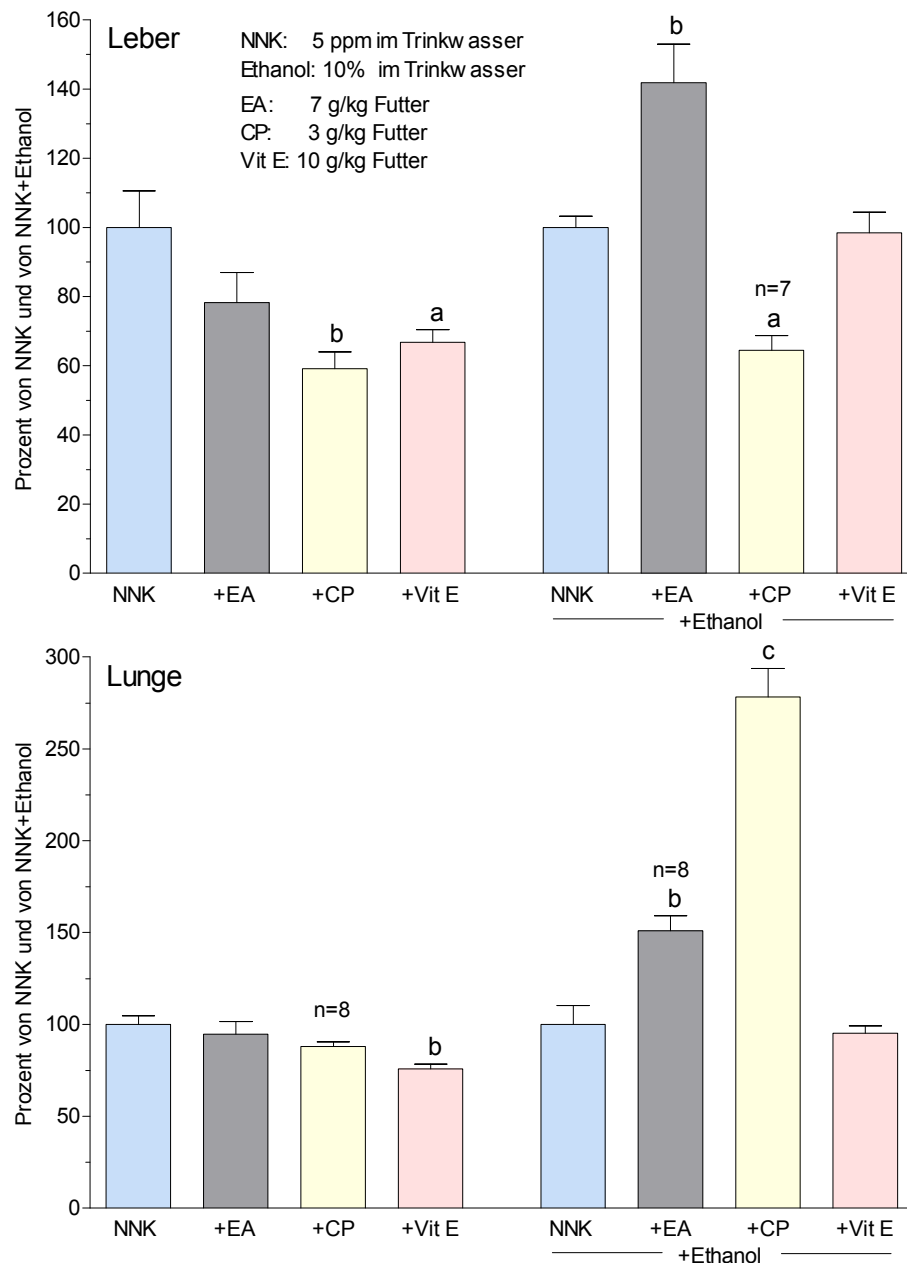
Während die chronische Aufnahme von Ethanol durch die Induktion einen erhöhten NNK-Metabolismus zur Folge haben kann, ist bei gleichzeitiger Gabe großer Mengen Ethanol mit einer kompetitiven Hemmung des NNK-Metabolismus zu rechnen. Die hier gezeigte deutliche Reduktion der HPB-freisetzenden Addukte in der Leber bei gleichzeitiger Gabe von NNK und Ethanol (Abb. 3–7; Tab. 3–13) ist ein Hinweis darauf, dass CYP2E1 in der Leber ein wichtiges Enzym für die Aktivierung von NNK durch  $\alpha$ -Hydroxylierung am Methylenkohlenstoff ist. Die Hemmung des Metabolismus in der Leber führt zu höherer Verfügbarkeit von NNK in extrahepatischen Geweben, beispielsweise der Lunge, in denen CYP2E1 offensichtlich nicht das Hauptenzym für die NNK-Aktivierung darstellt. Andere durch Ethanol nicht gehemmte Enzyme, z.B. CYP2A13, können in diesen Organen folgerichtig zu erhöhten Adduktleveln führen, wie sich dies hier zumindest tendenziell für das Lungengewebe gezeigt hat. Auch die  $\alpha$ -Hydroxylierung an der Methylgruppe des NNK wird durch Ethanol entsprechend beeinflusst. Die resultierenden  $O^6$ -Methylguaninaddukte erhöhten sich bei gleichzeitiger Ethanolgabe in extrahepatischen Geweben von laktierenden Ratten und ihren Säuglingen [236]. Gleiche Effekte wurden mit NDMA bei Mäusen, Ratten und Affen gesehen [236-238].

Im Tierversuch wurde eine Verlagerung der organotropen kanzerogenen Wirkung der Nitrosamine von der Leber in extrahepatische Organe durch Ethanol bereits frühzeitig für NDMA und NDEA nachgewiesen [239,240]. Gleichzeitige orale Gaben von NNN und Ethanol führten in Ratten zu einer Erhöhung von Nasentumoren und einer Reduktion der Ösophagustumoren [241]. Das Forschungsteam von Lucie Anderson zeigte in einer Vielzahl von Experimenten an Mäusen mit NDMA, NDEA und NPYR eine Verschiebung der Organotropie durch Ethanol zur Lunge [242-244], dessen Mechanismus

möglicherweise mit der kompetitiven Hemmung des NDMA-Metabolismus in der Leber erklärt werden kann und nicht der Promotion dieser Tumoren zuzuordnen ist.

#### 4.1.2 Chemopräventionsstudie

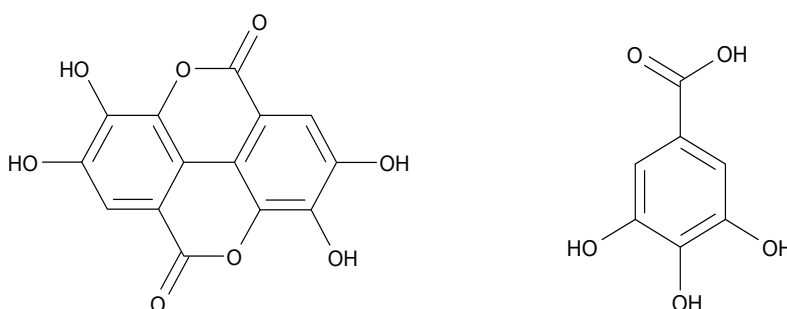
Mit NNK wurden bereits unzählige Versuche mit chemopräventiven Substanzen und Nahrungsinhaltsstoffen gemacht [245]. Dies reicht von den am häufigsten verwendeten Isothiocyanaten [246] bis hin zu Beerenextrakten [247].



**Abb. 4-2** HPB-Addukte in Leber und Lunge von Ratten in Prozent der Ergebnisse nach 4 Wochen Belastung mit NNK alleine (linke Seite) oder mit NNK + Ethanol (rechte Seite) über das Trinkwasser und 5 Wochen Gabe von Ellagsäure (EA), Chlorophyllin (CP) oder Vitamin E mit dem Futter; MW±SE, n=9, signifikant verschieden von NNK bzw. von NNK+EtOH, p<0,05 (a), p<0,01 (b) und p<0,001 (c)

Für die vorliegenden Chemopräventionsstudie wurden drei Substanzen ausgewählt, deren protektive Wirkung auf die Krebsentstehung bereits mit NNK als Modellschubstanz getestet wurden. Die meisten Untersuchungen wurden mit der Ellagsäure (EA) durchgeführt, die im Tiermodell der A/J Maus mit NNK die Entwicklung von Lungentumoren hemmte [248-251]. Auch Vitamin E hat in diesem Modell, ebenso wie in Frettchen, die Inzidenz von Lungentumoren durch NNK reduziert [252,253]. Beide Substanzen hemmten auch die NNK-Aktivierung [254-256]. Die dritte Substanz, Chlorophyllin, wurde in Zusammenhang mit NNK nur in Mutagenesetests geprüft [257]. Die Abb. 4-2 gibt eine Übersicht der eigenen Ergebnisse.

Ellagsäure ist ein stabiles Molekül, das leicht löslich in organischen Lösemitteln und DMSO und relativ unlöslich in Wasser ist (Abb. 4-3). Chemisch betrachtet ist die Ellagsäure ein tetrahydroxyliertes Dilacton. Als hydrolysierbarer Ester, dem Ellagitannin, tritt die Ellagsäure in vielen Pflanzen und Gehölzen auf. Durch saure Hydrolyse zerfällt das Ellagitannin u.a. in Ellagsäure. Dieser Zerfall findet auch im Verdauungstrakt unter dem Einfluss der HCl des Magens statt. Mit Gallussäure (Abb. 4-3) verestert tritt Ellagsäure vorwiegend in Rosengewächsen auf. Ellagsäure findet sich in verschiedenen Früchten, z.B. Erdbeeren (*Fragaria ananassa*), Himbeeren (*Rubus ideaus*), Brombeeren (*Rubus ursinus*) und Moosbeeren (*Vaccinium spec.*), in Nüssen, z.B. Walnüssen (*Juglans nigra*), Pecanüssen (*Caryna illinoensis*) und in Gemüse [258]. Freie Ellagsäure tritt auch im Rotwein auf und stammt aus dem Holz des Eichenfasses. Die Konzentration an ungebundener Säure dient als Indikator für den Ausbau des Weines im Barrique-Fass. Ellagsäure wurde als eine nichtalkoholische Komponente mit einem Gehalt von 20 µg/mL in Whisky nachgewiesen [259]. Eine vergleichende Studie fand heraus, dass die schädigende Wirkung von Whisky auf die Magenschleimhaut von geringerem Ausmaß ist, als der korrespondierende Ethanolanteil vermuten lässt [260]. Eine schützende Wirkung auf die Magenschleimhaut durch Whisky im Vergleich zu anderen hochprozentigen Alkoholika könnte mit der antioxidativen Wirkung der Ellagsäure erklärbar sein [261]. Ellagsäure fängt Superoxid-Anionen und Hydroxylradikale ab, welche in der Pathogenese von Ethanol-induzierten gastrischen Läsionen eine wichtige Rolle spielen [259,262]. Zusätzlich wirken endogene Faktoren, z.B. die Prostaglandine (PG), NO und Sulfhydrylgruppen cytoprotektiv [263-265]. Das Spannungspotenzial des durch Alkoholeinfluss verletzten Gewebes wird unter dem Einfluss der Ellagsäure schneller wieder hergestellt [259].

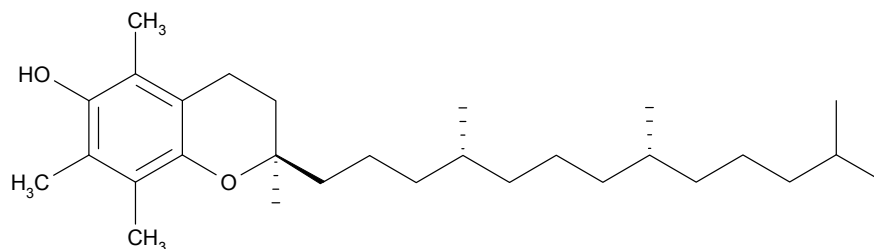


**Abb. 4-3** Strukturformeln von Ellagsäure (links) und Gallussäure (rechts)

Ellagsäure hat eine sehr geringe Toxizität für Mensch und Versuchstiere, weist eine geringe systemische Bioverfügbarkeit auf und wird schlecht im Gastrointestinaltrakt resorbiert. Trotzdem gilt sie als pharmakologisch aktiv und greift in die Blutgerinnungskaskade ein, indem sie den Hageman-Faktor (Faktor XII) aktiviert [266]. Bei der Untersuchung von synthetischen Analoga der Ellagsäure waren polyhydroxylierte Derivate gegenüber Benz[a]pyrendiolepoxyd potentere Antimutagene als dihydroxylierte Derivate.

Bei gleichzeitiger Gabe mit NNK verringert Ellagsäure die Inzidenz von Lungentumoren in den speziell sensitiven A/J-Mäusen [248-251]. Neben Anthocyaninen werden die Ellagitannine wesentlich für die chemopräventive Wirkung von Beerenextrakten verantwortlich gemacht [247]. Obwohl die Ellagsäure in vitro auch den NNK-Metabolismus hemmt [254,255,267], wurde die Bildung von HPB-Addukten in den vorliegenden Versuchen nur geringfügig in der Leber und nicht in der Lunge gehemmt (Abb. 4-2). Dies könnte bedeuten, dass die Ellagsäure in der Ratte weniger gut chemopräventiv wirkt als in der A/J-Maus. Es gibt Hinweise aus der Literatur, dass bei der Maus im Gegensatz zur Ratte die Pyridyloxobutylierung im Vergleich zur Methylierung für die NNK-Kanzerogenese eine geringere Rolle spielt [50]. Unter Einfluss von Ethanol wurde die Adduktbildung in beiden Geweben signifikant gesteigert (Abb. 4-2), d.h. die ausgeprägte Hemmwirkung der Ethanolbehandlung ging teilweise verloren (Abb. 3-10).

Als weitere antioxidative Substanz wurde Vitamin E verwendet, dessen am besten erforschter Bestandteil das  $\alpha$ -Tocopherol darstellt (Abb. 4-4). Es handelte sich hierbei um die aktivste Form. Hauptnahrungsquellen des fettlöslichen Vitamins sind Getreide, Nüsse, Samen, Pflanzenöle, Milch und Eier. Der Bedarf für den Menschen liegt bei maximal 15 mg  $\alpha$ -Tocopherol-Äquivalente/Tag [268]. Der menschliche Körper ist zur Speicherung des Vitamins in der Lage. Die Hauptfunktion von Vitamin E liegt im Schutz der in Membranlipiden, Lipoproteinen und Depotfett vorkommenden ungesättigten Fettsäuren vor einer Oxidation (Lipidperoxidation). Freie Radikale würden die Doppelbindungen der Fettsäuren der Zell- und Organellmembranen angreifen. Tocopherol wirkt als Radikalfänger, indem es selbst zu einem reaktionsträgen, da mesomeriestabilisierten Radikal wird. Das Tocopherolradikal wird unter Bildung eines Ascorbatradikals reduziert. Das Ascorbatradikal wird mit Hilfe von Glutathion (GSH) regeneriert. Dabei kommt es zur Bildung des Disulfids GSSG.



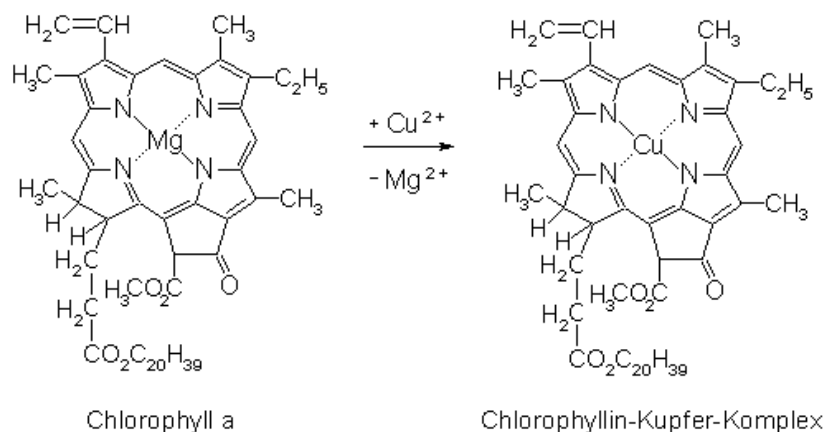
**Abb. 4-4 Strukturformel von  $\alpha$ -Tocopherol**

Trotz einer Reihe von experimentellen und epidemiologischen Hinweisen auf eine Risikoreduktion für die Krebsentstehung unter Supplementierung mit  $\alpha$ -Tocopherol, speziell bei Lungenkrebs [269,270],

hat eine groß angelegte Interventionsstudie bei Rauchern, die Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study (ATBC Study) bei Rauchern (50-69 Jahre), die täglich 50 mg  $\alpha$ -Tocopherol einnahmen und mindestens 5 Zigaretten pro Tag über einen Studienzeitraum von fünf bis acht Jahren rauchten, keine Risikoreduktion für Lungenkrebs ergeben [271]. Die Studie musste abgebrochen werden, weil sich in dem zweiten Behandlungsarm mit 20 mg  $\beta$ -Carotin/Tag das Lungenkrebsrisiko sogar erhöhte (RR=1,16, 95%-CI 1,02-1,33). In der gleichen Studie ergab sich eine Steigerung des Risikos für kolorektale Adenome durch  $\alpha$ -Tocopherol (RR=1,66, 95% CI 1,19-2,32) und kein Effekt durch  $\beta$ -Carotin [272]. Auch das Magenkrebsrisiko wurde durch die Vitamingaben nicht vermindert [273]. Nachdem die Einnahme von 50 mg  $\alpha$ -Tocopherol/Tag in dieser Studie das Risiko für hämorrhagische Hirninfarkte erhöhte [274], empfiehlt das Bundesinstitut für Risikoforschung keine zusätzliche Supplementierung mit Vitamin E über den maximalen Tagesbedarf von 15 mg hinaus [268].

In der vorliegenden Arbeit zeigte Vitamin E eine signifikante Hemmung der HPB-Adduktbildung durch NNK in Leber und Lunge, die aber nach gleichzeitiger Ethanolgabe nicht mehr über das durch Ethanol allein erzielte Maß hinausging (Abb. 4–2 und Abb. 3–10). In anderen Versuchen schützte Vitamin E gegen genotoxische und kanzerogene Wirkungen von NNK [252,253,256,275,276]. Dagegen konnte in einer sechsmonatigen Interventionsstudie, in der die Hälfte der Probanden täglich zweimal 250 mg Vitamin C, 200 IU  $\alpha$ -Tocopherol und 6 mg  $\beta$ -Carotin einnahmen, keinerlei Effekt auf PAK-Addukte und oxidative Schäden in der DNA der Mundschleimhaut verifiziert werden [277].

Chlorophyll a und b sind die lipophilen grünen Farbstoffe der Blätter. Sie sind sehr instabil, bei genügend langem Kochen wird das Magnesium des Porphyrinrings im Chlorophyll entfernt und durch Wasserstoff ersetzt [278]. Aus den Chlorophyllen werden Phaeophytine von olivgrauer Farbe. Um der farbgebenden Struktur mehr Stabilität zu verleihen, wird das Magnesium im Chlorophyll durch Kupfer ersetzt, es entsteht das semisynthetische Chlorophyllin (Abb. 4–5). Chlorophyllin wird zur Geruchs-beseitigung als Desodorant bei Mundgeruch, schlechtem Atem oder störender Schweißabsonderung verwendet [279]. Unerwünschte Wirkungen wurden bisher nicht beobachtet, außer einer harmlosen Grünverfärbung von Zunge und Zähnen, wenn es im Mund aufgelöst und nicht ganz geschluckt wird.



**Abb. 4–5 Strukturformeln von Chlorophyll a und dem Chlorophyllin-Kupfer-Komplex**

Im Zusammenhang mit der chemopräventiven Wirkung von Chlorophyllin werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Chlorophyllin bildet stabile Komplexe mit einer Reihe von Stoffen, die kanzerogene Eigenschaften haben, z.B. mit PAH, heterocyclischen Aminen und Aflatoxinen. Durch Neutralisation relevanter Oxidantien kann Chlorophyllin oxidative Schäden durch Fremdstoffe und Strahlung mindern. Schließlich reduziert Chlorophyllin die Aktivität von Cytochrom P450-Enzymen und erhöht die Aktivität von Phase II-Enzymen. Die hier gezeigte signifikante Reduktion der HPB-freisetzenden DNA-Addukte in der Leber und tendenziell auch in der Lunge von Ratten (Abb. 4–2) stimmt mit Ergebnissen überein, die für 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) und für Aflatoxin B<sub>1</sub> berichtet wurden [280,281]. Wie wenig verlässlich die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse in Modellversuchen an Ratten auf die Verhältnisse beim Menschen sein können, zeigt der Interaktionsversuch mit Ethanol. Die Hemmung der Adduktbildung in der Leber blieb zwar erhalten, aber in der Lunge, dem wichtigsten Zielorgan der NNK-Kanzerogenese, erhöhte sich der Adduktwert gegenüber der Ethanolkontrolle um fast das Dreifache und ist gegenüber NNK alleine nicht mehr reduziert (Abb. 3–10 und Abb. 4–2).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass keine der drei untersuchten Substanzen eine überzeugende Hemmwirkung auf HPB-freisetzende Addukte im Zielorgan Lunge aufwies. Dies steht im Gegensatz zu den Versuchen von Boysen et al. [220], die nach gleichzeitiger Gabe von Phenethylisothiocyanat im Futter und NNK im Trinkwasser eine selektive Hemmung der HPB-Adduktbildung um mehr als 50% in der Lunge, aber nicht in der Leber ergeben haben.

## 4.2 Humanstudien

### 4.2.1 Cotinin und Myosmin im Speichel

Die Cotininkonzentration im Speichel dient als quantitativer Marker für die Nicotinaufnahme. Die Konzentration von 15 ng/mL Speichel oder Plasma gilt als Grenzwert für die Unterteilung zwischen Nichtrauchern und aktiven Rauchern (Tab. 1–4) [217,218,282].

Speichel kann auf einfache Art nicht invasiv gewonnen werden. Diese Körperflüssigkeit fand daher für das Biomonitoring von Tabakalkaloiden neben Blut und Haaren Eingang in die Analytik. Problematisch wird die Verwendung von Speichel dann, wenn Substanzen untersucht werden, deren Membrangängigkeit stark von ihrer Ionisierbarkeit abhängt. Es kann zu einer Anreicherung von schwach basischen Verbindungen kommen [283], weil der pH-Wert von Speichel normalerweise etwas niedriger liegt als der von Plasma. Im Falle des Nicotins wurden im Speichel bis zu 100fach höhere Konzentrationen gemessen als im Blut [84,147,284]. Aufgrund des schwankenden pH-Wertes des Speichels kann sich das Speichel/Plasma-Verhältnis von Substanzen ändern. Einerseits fällt der pH während der Nahrungsaufnahme auf Werte von 5,5 ab, andererseits kann der pH-Wert des Speichels durch Stimulation auf Werte von 7,4 bis 8,0 ansteigen [285].

Für das weniger pH-abhängig ionisierbare Cotinin spielt der pH-Wert des Speichels eine untergeordnete Rolle. Der Rauchstatus lässt sich gut über Cotinin im Speichel bestimmen und macht dieses Tabakalkaloid im Speichel zu einem anerkannten Biomarker für das Rauchen und die Passivrauchbelastung [217]. Cotinin ist wegen seiner längeren Halbwertszeit von durchschnittlich 18 Stunden auch in dieser Hinsicht besser geeignet als das Nicotin, welches wegen der kurzen Halbwertszeit von 1-2 Stunden großen tageszeitlichen Schwankungen unterliegt [83]. Aber auch Cotinin kann bei unregelmäßigem Konsumverhalten oder bewusstem Verzicht auf nicotinhaltige Produkte vor der Probenahme zu falsch negativen Ergebnissen führen. In der Untergruppe von Rauchern, die aus München und Umgebung stammten, lag in zwei Speichelproben der Cotininwert deutlich unterhalb des Grenzwertes für Raucher. Der niedrige Wert eines der beiden Zigarrenraucher erklärt sich aus dessen Angabe, dass er 3 Tage vor der Probennahme keine Zigarre geraucht hatte. Generell liegen die in dieser Studie erhaltenen Mittelwerte für Cotinin bei Rauchern mit 86 ng/ml Speichel deutlich niedriger als in anderen Studien mit Mittelwerten zwischen 150 und 350 ng Cotinin/ml Speichel [217].

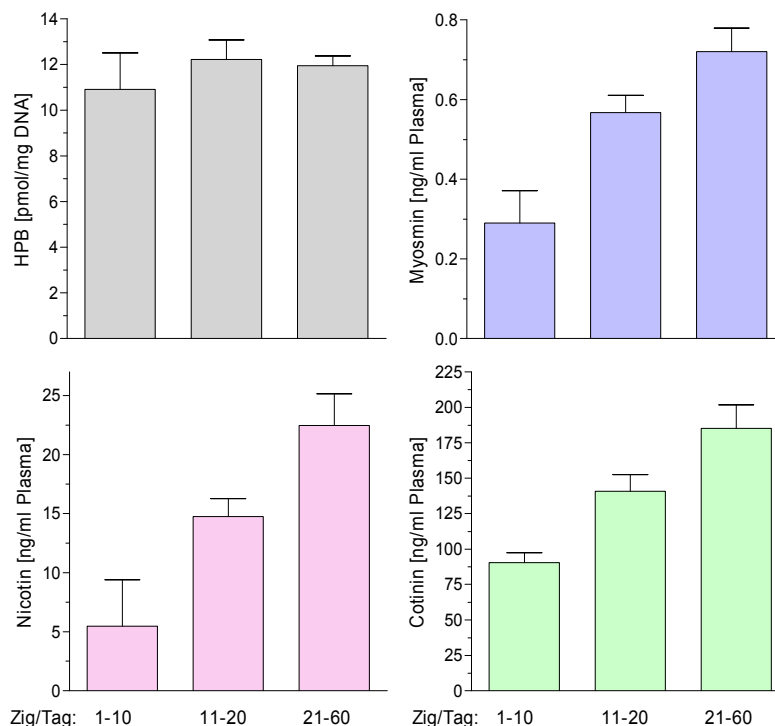
Die Verwender von Snus hatten mit durchschnittlich 118 ng/mL Speichel zwar einen 1,4fach erhöhten Cotininwert im Vergleich zu Rauchern, aber auch diese Konzentration ist deutlich geringer als die von Ferketich et al. [286] mit 460 ng/mL für amerikanische Verwender rauchfreier Tabakprodukte und die von Boswell et al. [287] für schwedische Benutzer von Snus mit 261 ng/mL berichteten mittleren Konzentrationen. Die Unterschiede im Nicotiningehalt aktuell benutzter amerikanischer und schwedischer Marken sind zu gering, um diese Unterschiede zu erklären [288].

Zu Myosmin im Speichel liegen noch keine Studien anderer Arbeitsgruppen vor. Die Konzentration von Myosmin im Speichel unterlag in einem Vorversuch von Schütte-Borkovec [212] einer erheblichen tageszeitlichen Schwankung. Deshalb können die Einzelwerte von nicht unter standardisierten Bedingungen gewonnenen Speichelproben auch nicht als Maß für die tägliche Belastung angesehen werden. In einer ersten orientierenden Studie an wenigen Probanden fanden Maier et al. [289] im Speichel keinen Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Die Mittelwerte lagen mit 1,6-1,9 ng/ml aber genau zwischen den in der vorliegenden Studie gemessenen Werten für Raucher mit 3,34 ng/ml und Nichtraucher mit 0,84 ng/ml. Trotz der geringen Aussagekraft der Konzentrationen von Myosmin im Speichel ist der nur 4fache Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein anderer Quellen für Myosmin neben dem Tabak.

#### **4.2.2 Cotinin, Nicotin und Myosmin im Plasma**

Von der Untergruppe der Raucher aus Polen wurden Plasmaproben erhalten, die gleichzeitig mit den Mundschleimhautproben abgenommen wurden. Der Mittelwert für Cotinin liegt mit 149 ng/ml Plasma im unteren Bereich der von Tricker [217] zusammengefassten Werte repräsentativer Studien aus verschiedenen Ländern mit Mittelwerten von 137 bis 384 ng/ml. Auch die mittleren Nicotinwerte liegen mit 16 ng/ml im Bereich der von Hukkanen et al. [83] angegebenen Schwankungsbereiche von 10 bis 50 ng/ml. Die Myosminkonzentrationen sind mit nur 0,6 ng/ml mit Abstand am niedrigsten. Auch

hierzu fehlen Vergleichswerte aus der Literatur. Betrachtet man die Abhängigkeit von der Anzahl täglich gerauchter Zigaretten, dann zeigt sich für alle Tabakalkaloide eine vergleichbare Abhängigkeit (Abb. 4–6). Im Spearman Rank Test ergeben sich für Myosmin ( $r=0,372$ ,  $p<0,005$ ), Nicotin ( $r=0,424$ ,  $p<0,001$ ) und Cotinin ( $r=0,383$ ,  $p<0,005$ ) hoch signifikante Korrelationen mit der Anzahl Zigaretten pro Tag.



**Abb. 4–6** Abhängigkeit der HPB-Addukte in der Mundschleimhaut und der Konzentration der Tabakalkaloide im Plasma von der Anzahl täglich gerauchter Zigaretten

#### 4.2.3 Cotinin, Myosmin und Nicotin in Zehennägeln

Fußnägel weisen eine Wachstumsrate von 1 cm in 9-12 Monaten auf [290,291]. Der Fußnägel wächst in zwei Richtungen, zum Einen in die Länge und zum Anderen in die Breite. Somit lagern sich Fremdsubstanzen auf zwei Arten in den Nagel ein. Über das Blutgefäßsystem gelangen die meisten Stoffe in die Nagelmatrix, sie können aber auch über das Nagelbett an der Grenze zur Lunula, dem Nagelhalbmond, eingelagert werden. Insbesondere für Substanzen, die sich im Keratin anreichern, stellen Nägel eine gute Matrixwahl zur Ermittlung einer Langzeitexposition dar. Für die neuerdings in den Fokus des Interesses gerückten Tabakalkaloide sind allerdings die Daten für den Zusammenhang zwischen Belastung und der Konzentration im Nagel noch sehr unvollständig und bedürfen weiterer Untersuchungen [140,292,293]. Es hat sich allerdings bereits gezeigt, dass die retrospektive Bestimmung von Nicotin in asservierten Proben von Zehennägeln die Aufdeckung des Zusammenhangs zwischen Rauchen und koronaren Herzkrankheiten bei Frauen verbesserten und auch als Belastungsmarker den Angaben zur selbst berichteten Passivrauchbelastung überlegen ist [294,295].

Die Zehennägel von Nichtrauchern enthielten in dieser Studie im Mittel 83,6 ng/g Cotinin und 213 ng/g Nicotin. Bei Rauchern stiegen die Durchschnittswerte von Cotinin um das 16fache auf



1321 ng/g an, Nicotin um das 9fache auf 1870 ng/g. Al-Delaimy et al. [295] haben bei Rauchern (n=771), Passivrauchern (n=768) und Nichtrauchern (n=157) für Nicotin mit 1770, 140 und 100 ng/g Zehennagel vergleichbare Werte ermittelt. Stepanov et al. [293] fanden bei 105 Rauchern mit durchschnittlich 5400 ng/g für Nicotin deutlich höhere Werte, aber geringere Werte für Cotinin mit 670 ng/g. Auch bei 14 Nichtrauchern fand die gleiche Autorin [296] für Nicotin mit 760 ng/g einen höheren Mittelwert, der mittlere Cotininwert lag mit 44 ng/g unter unserem Mittelwert, der allerdings auf nur einem von 12 positiv getesteten Zehennagelproben beruht. Nimmt man den für einen Nichtraucher hohen Wert (1003 ng/g) aus der Auswertung, dann liegen die Werte der restlichen Nichtraucher (unter der Nachweisgrenze von 35 ng/ml) auch unter dem Cotininmittelwert von Stepanov et al. [296].

Für die Bewertung der Ergebnisse mit Myosmin fehlen noch Vergleichsdaten. Auch wenn der Unterschied zwischen Rauchern (67,9 ng/g) und Nichtrauchern (22,1 ng/g) hochsignifikant war, ist der im Vergleich zu Nicotin (9fach) deutlich geringere Anstieg bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern (3fach für Myosmin) ein weiterer Beweis dafür, dass der Tabakrauch nicht die einzige Quelle für die Aufnahme von Myosmin durch den Menschen darstellt. Die Verwender von Snus hatten auch bei Myosmin mit 103 ng/g die höchsten Konzentrationen in den Zehennägeln.

#### **4.2.4 HPB-freisetzende DNA-Addukte in oraler Mucosa in Abhängigkeit von Tabakgenuss, Geschlecht und Alter**

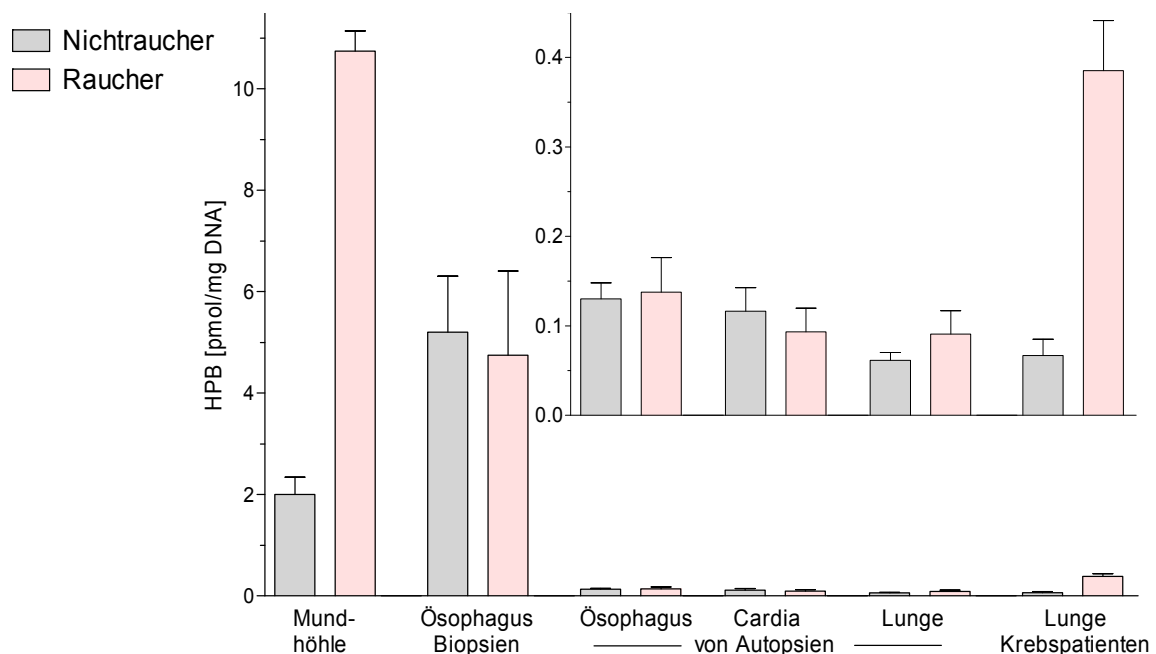
Die Erneuerung der humanen Mundschleimhaut erfolgt im Mittel alle 3,2 bis 5,8 Tage, wobei die Regeneration der buccalen Mucosa alle 4,1 Tage abläuft [297]. Zur Erhaltung eines intakten Epithels liegt ein Fließgleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Zellen vor, bei dem Teilung und Migration der neuen Zellen stets von der Basalschicht ausgehend gesteuert werden. Eine Verletzung des Epithels führt zu einer verkürzten Erneuerungsphase. Die im Vergleich zur Haut deutlich verkürzte Erneuerungszeit der Mundschleimhaut von durchschnittlich 10 Tagen kann mit der erhöhten bakteriellen Belastung und dem schnellen Abschilfern der Zellen durch die Nahrungsaufnahme erklärt werden. Genotoxische Veränderungen in der Mundschleimhaut können bei Rauchern und Verwendern rauchloser Tabakwaren mit dem Micronucleus-Test zuverlässig nachgewiesen werden, allerdings nur wenn nicht mehr als 4 Wochen seit dem letzten Genuss vergangen sind [298]. Es ist deshalb davon auszugehen, dass DNA-Addukte in der Mundschleimhaut einen relativ kurzen Zeitraum der Belastung mit den entsprechenden Kanzerogen widerspiegeln und nicht wie in Geweben mit langsamer Zellerneuerung akkumulieren. Der Einfluss von DNA-Reparaturmechanismen sollte demnach in buccalen Zellen auch eine vergleichsweise geringere Rolle spielen als in Zellen vieler anderer Gewebe.

Die mittlere Adduktkonzentration betrug für Nichtraucher 2,0 pmol HPB/mg DNA (Abb. 3–21). Die Werte der Raucher lagen mit 10,7 pmol/mg nur um das 5fache über denen der Nichtraucher, die Werte der Benutzer von Snus mit 17,6 pmol/mg nochmals knapp doppelt so hoch wie bei den Rauchern. Die Adduktbelastung der beiden Zigarrenraucher lag mit 41 und 49 pmol/mg noch über dem höchsten Wert der Snusbenutzer (35 pmol/mg). Die Belastung der DNA in der Mundschleimhaut mit HPB-

freisetzenden Addukten ist damit höher als alle bisher in anderen Geweben bestimmten Adduktwerte. Sie werden nur annähernd von den Addukten in Schleimhautbiopsien des unteren Ösophagus erreicht (Abb. 4–7).

Die erhöhte Belastung mit HPB-Addukten bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern stimmt gut mit dem erhöhten Mundhöhlenkrebsrisiko durch das Rauchen überein [7-12]. Studien zu anderen DNA-Addukten in den Epithelien der Mundhöhle haben durchwegs geringere Unterschiede in den Adduktraten von Rauchern und Nichtrauchern ergeben. Mit Postlabelling bestimmte "bulky adducts" waren bei Rauchern 3fach höher als bei Nichtrauchern [299], semiquantitativ immunhistochemisch bestimmte Addukte von Benzo[a]pyren, 4-Aminobiphenyl und PAK waren alle weniger als 2fach erhöht [300]. Auch wenn die Unterschiede bei den HPB-Addukten relativ höher sind als für Addukte anderer kanzerogener Substanzen aus dem Tabak, sollte bei absoluter Spezifität der HPB-Addukte für die Belastung mit tabakspezifischen Nitrosaminen ein wesentlich höherer Unterschied zu den Nichtrauchern bestehen. Immerhin nehmen Raucher im Durchschnitt mehr als 100fach höhere Mengen von NNK und NNN auf als Nichtraucher. Dies lässt sich direkt aus den Daten zum Biomonitoring des NNK-Metaboliten NNAL im Urin ableiten [60,61,301,302].

Die noch höhere Belastung mit HPB-freisetzenden Addukten bei den Verwendern von Snus steht dagegen im Widerspruch zu den epidemiologischen Ergebnissen, die allenfalls ein sehr schwaches Mundhöhlenkrebsrisiko bei Männern aus Schweden zeigen, dass sich nicht signifikant von den Nichtrauchern unterscheidet und auf alle Fälle gegenüber Rauchern deutlich geringer ist.

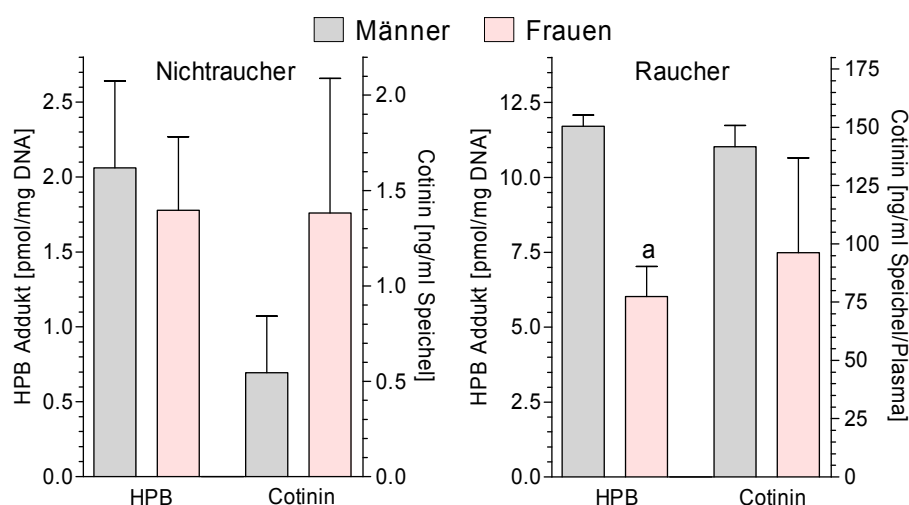


**Abb. 4–7** Vergleich der HPB-Addukte in Mundschleimhaut, Schleimhaut von Ösophagusbiopsien [70], Proben von peripherer Lunge, Ösophagus- und Cardiawand von Autopsien [68] und peripherem Lungengewebe von Lungenkrebspatienten [66]; MW±SE

Die Unterschiede in der HPB-Adduktbelastung sind in der Mundschleimhaut von Rauchern und Nichtrauchern nicht nur höher als bei den in anderen Studien bestimmten HPB-freisetzenden Hämoglobinaddukten (<3fach; [62-66,303]), sondern auch höher als bei Addukten in Lungengewebe (<1,5fach), die im Rahmen von Autopsien erhalten wurden [68] (Abb. 4–7). In Geweben von Ösophagus- und Magenschleimhaut der gleichen Autopsien waren keine vom Rauchstatus abhängigen Unterschiede zu sehen [68]. Das gleiche gilt für Biopsien, die von der Ösophagusmucosa im Rahmen von gastroösophagealen Endoskopien erhalten wurden [69,70]. Etwas höhere Unterschiede erhielt man dagegen bei Untersuchungen von tumorfreiem Lungengewebe von Lungenkrebspatienten, bei denen Raucher 7fach höhere HPB-Adduktlevel aufwiesen als Nichtraucher [66]. Die größten Unterschiede zu Nichtrauchern fand man mit Hämoglobinaddukten bei Genießern von rauchlosen Tabakwaren. Im Vergleich zu Nichtrauchern wurden bei Schnupfern aus Bayern, die den so genannten Schmalzler mit der Nase aufziehen, 15fach und bei so genannten Snuff Dippern aus New York 18fach höhere HPB-Addukte am Hämoglobin gefunden [62,63]. Wie bei den Benutzern von Snus gehen diese höheren Adduktbelastungen mit keinem nachweisbar erhöhten Krebsrisiko einher.

Ein weiteres Indiz für die mangelnde Korrelation der HPB-Adduktlevel mit dem Krebsrisiko sind die fehlenden Korrelationen mit den Tabakalkaloiden in Speichel und Plasma (Tab. 3–25). Auch steht die bei Rauchern fehlende Korrelation mit der Anzahl gerauchter Zigaretten/Tag bei den Probanden aus Polen ( $r=-0,015$ ; n.s. im Spearman Rank Test) im Gegensatz zu der ausgeprägten Korrelation mit den Konzentrationen der Tabakalkaloide im Plasma (Abb. 4–6).

Die HPB-Addukte waren bei Nichtraucherinnen (-44%) und Raucherinnen (-50%) im Vergleich zu den männlichen Probanden deutlich geringer (Tab. 3–26). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei den HPB-Addukten in Biopsien der Ösophagusschleimhaut gesehen, wenn auch hier die Unterschiede bei den Nichtraucherinnen (-38%) deutlicher waren als bei den Raucherinnen (-16%) und keine statistische Signifikanz erreicht wurde [70].



**Abb. 4–8 HPB-Addukte in der Mundschleimhaut und Cotininkonzentrationen in Speichel/Plasma bei Rauchern und Nichtrauchern in Abhängigkeit vom Geschlecht; MW±SE von 10 ♂ und 21 ♀ Nichtrauchern und von 74 ♂ und 7 ♀ Rauchern; a: signifikant verschieden von männlichen Nichtrauchern,  $p<0,001$**

Zieht man nur diejenigen Probanden zur Auswertung heran, für die gleichzeitig HPB-Addukte und Cotinin in Speichel/Plasma bestimmt wurden (Abb. 4–8), dann zeigt sich, dass die Nichtraucherinnen trotz tendenziell geringerer Adduktwerte (-14%; n.s.) eine deutlich höhere Cotininbelastung aufweisen (+151%; n.s.). Im Gegensatz zur Ausscheidung der NNK-Metaboliten NNAL und seinen Glucuroniden [301] lässt sich keinerlei Zusammenhang der Passivrauchbelastung mit den HPB-Addukten erkennen. Bei den Rauchern haben die wenigen Frauen sowohl niedrigere HPB-Adduktlevel (-50%;  $p < 0,001$ ) als auch geringere Cotininkonzentrationen im Speichel (-33%; n.s.). Ein vergleichbar großer Unterschied wurde für HPB-Addukte in Lungengewebe (-57% bei Raucherinnen) gefunden, welches im Rahmen von Autopsien erhalten wurde [68]. Für Ösophagusproben haben sich diese Unterschiede in der gleichen Studie nicht bestätigt.

Die geringere Belastung der Frauen mit HPB-Addukten steht im Widerspruch zu epidemiologischen Daten, die ein erhöhtes Krebsrisiko für das Auftreten oraler Karzinome im Bezug auf das Tabakrauchen gefunden haben [304,305]. Nicht näher charakterisierte, mit  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling bestimmte, lipophile Addukte waren bei Frauen mit Lungenkrebs höher als bei Männern [306] und das gleiche galt in einer großen prospektiven Studie zum Lungenkrebs für die Ausscheidung von 7-Methylguanin im Urin [307]. Dagegen errechnete die INHANCE-Studie [308] bei 11.221 Fällen von Kopf-Nacken-Karzinomen ein deutlich erhöhtes Risiko für Männer unter gemeinsamem Einfluss von Alkohol und Rauchen.

Bei den wenigen weiblichen Benutzerinnen von Snus waren nur geringe Unterschiede zu den Männern gegeben, die wie bei den Nichtrauchern gegensätzliche Tendenz aufwiesen, ein leichtes Minus bei den HPB-Addukten (-10%, n.s.) und höhere Cotininkonzentrationen im Speichel (+17%, n.s.).

Die Altersabhängigkeit der HPB-Adduktkonzentrationen (Abb. 3–22 und Abb. 3–23) bei Rauchern und Verwendern von Snus ist nicht mit einem geringeren Konsum der Tabakprodukte zu erklären. Andere Studien zeigen meist einen Anstieg von Addukten mit dem Alter, so z.B. HPB-Addukte in der Magenschleimhaut [68], Addukte von Benz[a]pyrendiolepoxyd in Lymphozyten [309] und 7-Methylguanin im Urin [307].

#### **4.2.5 Andere Einflussfaktoren für DNA-Addukte in der Mundschleimhaut**

Die Fragen zu Nahrungs- und Trinkverhalten ergaben nur zu wenigen Punkten signifikante Effekte oder zumindest einheitliche Trends. Die häufig geringe Anzahl der Probanden innerhalb der verschiedenen Untergruppen der Nichtraucher, Raucher und Snuser erlaubte oft keine statistisch abzusichernde Aussagen und war für eine multivariate Analyse zu klein.

Eine große Zahl an Studien bestimmten als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen das Rauchen in Kombination mit regelmäßigem Alkoholkonsum [10,16,167,304,305]. In der Metaanalyse des International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortiums (INHANCE) aus 17 europäischen und amerikanischen Fall-Kontroll-Studien mit insgesamt 11.221 Fällen und 16.168 Kontrollen wurde im Hinblick auf das Zusammenwirken von Alkohol und Tabakrauch auf das

Risiko für Kopf-Nacken-Karzinome ein mehr als multiplikatives Risiko speziell für orale Karzinome errechnet [308]. Gegenüber Probanden, die auf Alkohol verzichteten, konnten in der vorliegenden Studie bei Nichtrauchern (1,9fach) und Verwendern von Snus (1,4fach) nur bei mäßigem Alkoholkonsum (<2 Gläser; Tab. 3–40) erhöhte HPB-Adduktlevel in der Mundschleimhaut nachgewiesen werden. Bei stärkerem Alkoholkonsum (>2 Gläser) schwächte sich der Effekt bei Nichtrauchern gegenüber Nichttrinkern deutlich ab (1,3fach) und zeigte den gleichen Unterschied wie bei Benutzern von Snus, der sich nur leicht von 1,4- auf 1,3fach abschwächte. Bei den Rauchern trank nur einer keinen Alkohol und es war kein Unterschied zwischen mäßigem und stärkerem Alkoholkonsum zu sehen. Diese Ergebnisse finden ihre Parallele in den Untersuchungen auf HPB-Addukte in Ösophagusbiopsien von Heppel [70,310], der höhere Unterschiede in den Adduktleveln von regelmäßigen zu unregelmäßigen Trinkern bei Nichtrauchern (2,4fach,  $p < 0,05$ ) als bei Rauchern (1,5fach, n.s.) fand.

Alkohol könnte auf verschiedene Weise die Höhe der HPB-freisetzenden Addukte in der Mundschleimhaut beeinflussen (siehe 4.1, Abb. 4–1). Eine Erhöhung könnte auf der gesteigerten Resorption von Fremdstoffen in der Mundschleimhaut beruhen, aber auch auf einer verzögerten DNA-Reparatur und der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme [226,311,312]. Eine Abschwächung dieser Ethanoleffekte könnte bei starkem Alkoholkonsum durch kompetitive Hemmung des Fremdstoffwechsels zustande kommen, ähnlich wie sie in den hier durchgeführten Tierversuchen in der Leber beobachtet wurde.

Häufiger Verzehr von Obst und Gemüse wird generell mit einem erniedrigten Krebsrisiko in Verbindung gebracht [313]. Dies wurde erneut in einer großen europäischen Studie für die oberen Atem- und Verdauungswege bestätigt [219]. Bei den hier untersuchten Nichtrauchern zeigt sich ein Schutzeffekt durch täglichen Verzehr von Obst und Gemüse. Die HPB-Addukte in der Mundschleimhaut waren gegenüber Probanden, die praktisch kein (-73%) oder nur gelegentlich (-58%) Obst und Gemüse aßen, signifikant erniedrigt (Abb. 3–26 und Tab. 3–33). Bei den Rauchern waren die Unterschiede deutlich geringer und erreichten kein Signifikanzniveau, bei den Verwendern von Snus wurde kein Schutzeffekt gesehen. In Ösophagusbiopsien wurden ebenfalls keine Unterschiede in den HPB-Addukten hinsichtlich des Verzehrs von Obst und Gemüse beobachtet [70]. Auch DNA-Schäden in Leukozyten und die Ausscheidung von oxidierten Guaninbasen im Urin wurden durch die Einnahme von 600 g Obst und Gemüse oder einer entsprechenden Menge an Vitaminen und Mineralstoffen in einer kontrollierten Studie gegenüber einer Antioxidantien freien Diät nicht verändert [314]. Ein 10-wöchiger vollständiger Entzug von Obst und Gemüse erniedrigte sogar signifikant oxidative Schäden an DNA, Blutproteinen und Plasmalipiden [315]. In dieser Studie hatte die Zufuhr von Teecatechinen keinen anhaltenden Effekt, während in unserer Studie das Trinken von Tee zumindest mit einem leichten, nicht signifikanten Rückgang der HPB-Addukte in der Mundschleimhaut bei Nichtrauchern (-38%, n.s.) und Rauchern (-22%, n.s.), aber nicht bei Verwendern von Snus verbunden war (Abb. 3–31 und Tab. 3–41).

Auch der Schokolade und dem Kakao werden wegen ihres hohen Gehalts an Polyphenolen chemopräventive Eigenschaften zugesprochen [316]. Gegenüber gelegentlichem Schokoladenverzehr erhöhte in unserer Studie der tägliche Verzehr bei den Nichtrauchern die HPB-Addukte in der Mundhöhle um fast das Doppelte ( $p < 0,05$ ; Abb. 3–29 und Tab. 3–37). Obwohl Schokolade wegen der hohen Kakao- und Milchbestandteile [118] viel Myosmin enthalten sollte, hatten die Nichtraucher, die täglich Schokolade aßen, geringere Konzentrationen von Myosmin im Speichel ( $n=7$ ,  $0,67 \pm 0,36$  ng/ml) als die gelegentlich Schokolade essenden Nichtraucher ( $n=38$ ,  $0,93 \pm 0,60$  ng/ml). Einen Beitrag von Myosmin zu den erhöhten DNA-Adduktleveln lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Myosminkonzentrationen im Speichel hohen tageszeitlichen Schwankungen unterliegen und damit eine singuläre Messung zu einem nicht definierten Zeitpunkt wenig Aussagekraft hinsichtlich der Myosminbelastung hat [212]. Beim Schokoladenverzehr längere Zeit in unmittelbarem Kontakt mit der Mundschleimhaut stehendes Myosmin könnte durch Nitrosierung oder Peroxidation vor Ort zu Addukten führen. Hierbei könnte der Hygienestatus der Mundhöhle eine zusätzliche Rolle spielen, denn es ist bekannt, dass Bakterien auch bei eher neutralen pH-Werten die endogene Nitrosierung fördern können [34]. Diese Effekte könnten bei Nichtrauchern stärker zum Tragen kommen als bei Rauchern und Verwendern von Snus, die aufgrund des Tabakgenusses eine signifikant höhere Myosminbelastung haben als Nichtraucher. In der vorliegenden Studie wurde nur bei wenigen Probanden die hinsichtlich der Langzeitbelastung zuverlässigere Bestimmung von Myosmin in Zehennägeln durchgeführt. Deshalb ist keine zuverlässige Aussage zur Korrelation der Myosminbelastung mit den HPB-freisetzenden Addukten möglich. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den Beitrag von Myosmin zu diesen Addukten aufzuklären. Die beste Methode hierfür wäre die gezielte Verabreichung von deuteriertem Myosmin an Probanden, vergleichbar zu den Studien, die Benowitz und seine Mitarbeiter in vorbildlicher Weise mit deuteriertem Nicotin und Cotinin gemacht haben [317]. Dadurch könnte nicht nur die Toxikokinetik von Myosmin bestimmt werden, sondern im Falle des Beitrags zu DNA- und Hämoglobinaddukten, die HPB freisetzen, diese durch den Nachweis von deuteriertem HPB eindeutig gesichert werden.

## 5 Zusammenfassung

Das Oropharynxkarzinom steht in Deutschland mit einem Anteil von 3,3% an allen bösartigen Neubildungen bei Männern an der siebten Stelle der Krebsneuerkrankungen. Der jahrelange Gebrauch von Tabakwaren ist ein wichtiger Risikofaktor, der durch gleichzeitige Anwendung hochprozentiger Alkoholika multipliziert wird. In vielen westeuropäischen Industrieländern konnte eine Zunahme von Inzidenz und Mortalität festgestellt werden, dagegen weist Schweden die niedrigste Inzidenzrate auf. Eine mögliche Erklärung dafür wird im geringeren Anteil an Rauchern vermutet. Ein Viertel der schwedischen Männer verwendet Tabak in Form des Schwedischen Kautabaks, der als Snus bekannt ist.

Die tabakspezifischen Nitrosamine *N*-Nitrosornicotin (NNN) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) erzeugen im Tierversuch nicht nur Tumoren im Ösophagus bzw. Lunge, Leber und Pankreas, sondern bei gemeinsamer Gabe auch in der Mundhöhle. Beide Substanzen unterliegen einer metabolischen Aktivierung, die über reaktive Zwischenstufen zu einer Pyridyloxobutylierung der DNA führen. Unter saurer Hydrolyse spalten diese Addukte 4-Hydroxy-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) ab, das nach Derivatisierung mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS) nachgewiesen werden kann.

Die Zielsetzungen der Studien mit männlichen Wistarratten waren die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Bildung HPB-freisetzender Addukte in den Zielorganen Lunge und Leber, ausgelöst durch die Gabe von NNK und ihre Modulation durch Ethanol. Des Weiteren sollten protektive Effekte ausgewählter antioxidativer Substanzen auf die Entstehung der DNA-Addukte beurteilt werden.

Der Vorversuch ergab, dass die 2- bis 4-wöchige Zufuhr von 1, 3 und 5 ppm NNK über das Trinkwasser in Lunge und Leber der Ratten ausreichend hohe Konzentrationen HPB-freisetzender DNA-Addukten für die GC-MS-Bestimmung erzeugte.

Für den Interaktionsversuch von NNK und Ethanol erhielten die Ratten über 4 Wochen 1 oder 5 ppm NNK alleine oder in Kombination mit 10% Ethanol über das Trinkwasser. NNK erzeugte in der Lunge doppelt so hohe HPB-Adduktwerte als in der Leber. Die 5fach höhere NNK-Konzentration führte nur zu einer Verdoppelung der Adduktkonzentrationen, eine Bestätigung für die in der Literatur berichtete Sättigung der Adduktbildung durch NNK. Die Alkoholzufuhr verminderte die Wasseraufnahme und damit die NNK-Dosis um etwa ein Drittel. Die Extrapolation auf die höhere NNK-Dosis bei alleiniger NNK-Gabe zeigt, dass die HPB-Adduktlevel in der Leber unter dem Einfluss von Ethanol deutlich geringer ausfielen. Dies spricht für eine kompetitive Hemmung der NNK-Aktivierung über CYP2E1 durch Ethanol in der Leber. Die Hemmung des Leberstoffwechsels führt zu einer höheren Verfügbarkeit von NNK für die Lunge, in der leicht erhöhte HPB-Adduktlevel gefunden wurden.

Der Chemopräventionsversuch diente der Untersuchung des Einflusses antioxidativer Substanzen auf die Schädigung der DNA in Leber- und Lungengewebe von Ratten durch 5 ppm NNK und die

gemeinsame Gabe von 5 ppm NNK und 10% Ethanol 4 Wochen über das Trinkwasser. Die 5-wöchige Zufuhr der antioxidativen Substanzen über das Futter begann bereits 1 Woche vor der NNK- und Ethanolgabe in Konzentrationen von 7 g/kg Ellagsäure, 3 g/kg Chlorophyllin oder 10 g/kg Vitamin E. Bei alleiniger NNK-Gabe reduzierten alle drei Substanzen in der Reihenfolge Chlorophyllin (-41%,  $p < 0,01$ ) > Vitamin E (-33%,  $p < 0,05$ ) > Ellagsäure (-22%; n.s.) die HPB-Addukte in der Leber. In der Lunge reduzierte nur Vitamin E signifikant die HPB-Adduktlevel (-25%,  $p < 0,01$ ). Die zusätzliche Ethanolgabe reduzierte auch in diesem Versuch die Wasseraufnahme und damit die NNK-Dosis, wobei die Reduktion der HPB-Addukte in der Leber (-64%) und diesmal auch in der Lunge (-67%) über das Ausmaß der Dosisreduktion (-33%) hinausging. Im Vergleich zur kombinierten NNK- und Ethanolgabe reduzierte nur noch Chlorophyllin die HPB-Adduktlevel in der Leber (-35%,  $p < 0,05$ ) bei gleichzeitig massiver Erhöhung in der Lunge (+178%,  $p < 0,001$ ). Ellagsäure erhöhte die Adduktwerte in den Organen Leber (+42%,  $p < 0,05$ ) und Lunge (+51%,  $p < 0,05$ ), Vitamin E bewirkte dagegen keinerlei Veränderungen. Der Nachweis von HPB-freisetzenden DNA-Addukten in Leber und Lunge von Kontrollratten unterstützt die Hypothese, dass neben den TSNA weitere Quellen für diese Addukte bestehen müssen.

Der Humanversuch befasste sich mit dem Einfluss von Rauchen und Verwendung von Snus auf HPB-freisetzende DNA-Addukte. Dazu wurden je 2 nicht invasiv gewonnene Proben der Mundschleimhaut der rechten und linken Seite von Nichtrauchern und Rauchern und bei Verwendern von Snus zusätzlich eine dritte Probe vom Applikationsort entnommen. Zur Bestimmung des Rauchstatus und der Belastung mit Myosmin wurden Speichel- und Plasmaproben der Probanden herangezogen. Bei einem Teil der Probanden wurden als Langzeitmarker für die Rauchbelastung zusätzlich die Gehalte an Nicotin, Myosmin und Cotinin in Zehennagelproben bestimmt. Demographische Daten, Ess- und Trinkgewohnheiten wurden mit Hilfe eines Fragebogens erfasst. Die Studie schloss 173 Probanden eines Altersbereiches von 16 bis 85 Jahren ein, darunter knapp 2/3 Männer.

Mit 86 und 118 ng/mL war die Cotininbelastung bei Rauchern und Verwendern von Snus etwa 100-fach höher als bei Nichtrauchern mit 1,1 ng/ml. Für die Myosmingehalte ergaben sich bei Rauchern und Verwendern von Snus mit 3,6 und 4,9 ng/mL nur etwa 4-5fache Unterschiede zu den Nichtrauchern mit 0,8 ng/mL, ein deutlicher Hinweis auf weitere Quellen des Myosmins neben dem Genuss von Tabak und der Passivrauchbelastung. Zehennägeln sind etwa 20fach höher mit Cotinin und Myosmin belastet als der Speichel, Nicotin wird in den Zehennägeln 1,5fach stärker angereichert als Cotinin.

HPB-freisetzende Addukte waren bei Nichtrauchern mit durchschnittlich 2,0 pmol HPB/mg DNA nur 5-8fach niedriger als bei Rauchern und Verwendern von Snus mit 10,7 und 17,6 pmol/mg. Die höchsten Werte hatten zwei Zigarrenraucher mit 41 und 49 pmol/mg DNA. Dies entspricht einer Belastung von  $15 \times 10^6$  normalen Nukleotiden mit HPB. Mit den Konzentrationen der Tabakalkaloide gab es in keiner Gruppe eine Korrelation. Frauen zeigten generell niedrigere Adduktlevel als Männer. Mit zunehmendem Alter nahm die Adduktbelastung trotz leicht erhöhten Zigarettenkonsums signifikant ab.



Häufiger Verzehr von Obst und Gemüse reduzierte bei Nichtrauchern die Adduktbelastung auf weniger als die Hälfte. Bei Rauchern war dieser Schutzeffekt wesentlich schwächer ausgeprägt und bei Verwendern von Snus nicht mehr nachzuweisen. Dagegen erhöhte täglicher Schokoladenverzehr ebenfalls nur bei Nichtrauchern die Addukte um das Doppelte. Fleischreiche Ernährung führte ebenso wie häufiger Genuss von geräucherten Lebensmitteln zu einer tendenziellen Erhöhung der DNA-Addukte bei Nichtrauchern und Rauchern.

## Literaturverzeichnis

1. IARC (2007) Cancer Incidence in Five Continents. Vol. IX <http://www-dep.iarc.fr/>
2. Batzler, W.U., Giersiepen, K., Hentschel, S. et al. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. Berlin. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2008; 6. überarbeitete Auflage.
3. Statistische Bundesamt (2008) Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2007. Sterbefälle nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht; Gestorbene in Deutschland [www-ec.destatis.de/](http://www-ec.destatis.de/)
4. Thews G Mutschler E Vaupel P (2007) Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen. Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges.
5. Geisler F (2005) Anatomie online. <http://www.anatomie-online.com>
6. Wilke A Tackenberg B (2001) Anatomie. Der Mensch: Bauweise, Form und Funktion. Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges.
7. Boffetta P Mashberg A Winkelmann R Garfinkel L (1992) Carcinogenic effect of tobacco smoking and alcohol drinking on anatomic sites of the oral cavity and oropharynx. *Int.J.Cancer* 52:530-533
8. Mashberg A Boffetta P Winkelman R Garfinkel L (1993) Tobacco smoking, alcohol-drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among United-States veterans. *Cancer* 72:1369-1375
9. Blot WJ McLaughlin JK Winn DM Austin DF Greenberg RS Prestonmartin S Bernstein L Schoenberg JB Stenhagen A Fraumeni JF (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 48:3282-3287
10. Bundgaard T Wildt J Frydenberg M Elbrønd O Nielsen JE (1995) Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. *Cancer Causes Control* 6:57-67
11. Maier H Dietz A Gewelke U Heller W-D Weidauer H (1992) Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin.Investig.* 70:320-327
12. Franceschi S Bidoli E Negri E Barbone F Lavecchia C (1994) Alcohol and cancers of the upper aerodigestive tract in men and women. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 3:299-304
13. Blot WJ (1992) Alcohol and cancer. *Cancer Res.* 52:2119s-2123s
14. Shapiro JA Jacobs EJ Thun MJ (2000) Cigar smoking in men and risk of death from tobacco-related cancers. *J.Natl.Cancer Inst.* 92:333-337
15. Randi G Scotti L Bosetti C Talamini R Negri E Levi F Franceschi S La Vecchia C (2007) Pipe smoking and cancers of the upper digestive tract. *Int.J.Cancer* 121:2049-2051
16. Lewin F Norell SE Johansson H Gustavsson P Wennerberg J Björklund A Rutqvist LE (1998) Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 82:1367-1375
17. Herrero R Castellsague X Pawlita M Lissowska J Kee F Balaram P Rajkumar T Sridhar H Rose B Pintos J Fernandez L Idris A Sanchez MJ Nieto A Talamini R Tavani A Bosch FX Reidel U Snijders PJF Meijer CJLM Viscidi R Munoz N Franceschi S (2003) Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *J.Natl.Cancer Inst.* 95:1772-1783
18. Simonato LE Garcia JF Sundefeld MLMM Mattar NJ Veronese LA Miyahara GI (2008) Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinico-pathologic variables, risk factors and survival. *J.Oral Pathol.Med.* 37:593-598

19. Miller CS Johnstone BM (2001) Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 91:622-635
20. Dahlstrom KR Adler-Storthz K Etzel CJ Liu Z Dillon L El-Naggar AK Spitz MR Schiller JT Wei Q Sturgis EM (2003) Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin.Cancer Res.* 9:2620-2626
21. Fouret P Monceaux G Temam S Lacourreye L StGuily JL (1997) Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Arch.Otolaryngol.Head & Neck Surg.* 123:513-516
22. zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochim.Biophys.Acta* 1288:F55-F78
23. DIMDI (2009) Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme. 10. Revision, German Modification, Version 2009. <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlgm2009/index.htm>
24. Boyle P Macfarlane GJ Blot WJ Chiesa F Lefebvre JL Azul AM Devries N Scully C (1995) European School of Oncology Advisory Report to the European-Commission for the Europe-Against-Cancer Program - Oral Carcinogenesis in Europe. *Oral Oncol., Eur.J.Cancer* 31B:75-85
25. Klint A (2007) *Statistics - Health and Diseases, Cancer Incidence in Sweden 2006.* Stockholm, The National Board of Health and Welfare
26. Eisenbrand G Metzler M Hennecke FJ (2005) *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. 3. Auflage;* Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
27. Gupta RC (1984) Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:6943-6947
28. Beach AC Gupta RC (1992) Human biomonitoring and the <sup>32</sup>P-postlabeling assay. *Carcinogenesis* 13:1053-1074
29. Belitz H-D Grosch W (1992) *Lehrbuch der Lebensmittelchenie.* Berlin, Heidelberg, New York, Springer
30. Spiegelhalder B Eisenbrand G Preussmann R (1976) Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to *in vivo* formation of *N*-nitroso compounds. *Food Cosmet.Toxicol.* 14:545-548
31. Tannenbaum SR Weisman M Fett D (1976) Effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet.Toxicol.* 14:549-552
32. Eisenbrand G (1981) *N-Nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt. Eigenschaften, Bildungswege, Nachweisverfahren und Vorkommen.* Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
33. Calmels S Ohshima H Bartsch H (1988) Nitrosamine formation by denitrifying and non-denitrifying bacteria - Implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. *J.Gen.Microbiol.* 134:221-226
34. Calmels S Ohshima H Vincent P Gounot A-M Bartsch H (1985) Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *Escherichia coli* strains. *Carcinogenesis* 6:911-915
35. Mirvish SS (1995) Role of *N*-nitroso compounds (NOC) and *N*-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett.* 93:17-48

36. Perera FP (1988) The significance of DNA and protein adducts in human biomonitoring studies. *Mutat.Res.* 205:255-269
37. Hecht SS Hoffmann D (1988) Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* 9:875-884
38. Brunnemann KD Prokopczyk B Djordjevic MV Hoffmann D (1996) Formation and analysis of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Crit.Rev.Toxicol.* 26:121-137
39. Brunnemann KD Hoffmann D (1991) Analytical studies on tobacco-specific *N*-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. *Crit.Rev.Toxicol.* 21:235-240
40. 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
41. Andersen RA Burton HR Fleming PD Hamilton-Kemp TR Gay SL (1987) Effects of air curing environment on alkaloid-derived nitrosamines in burley tobacco. in: *The Relevance of N-Nitroso Compounds to Human Cancer: Exposures and Mechanism*; Vol. 84, pp 451-455; eds: Bartsch H O'Neill IK Schulte-Hermann R; International Agency for Research on Cancer, Lyon, France
42. Djordjevic MV Gay LS Bush LP Chaplin JF (1989) Tobacco-specific nitrosamine accumulation and distribution in flue-cured tobacco alkaloid isolines. *J.Agric.Food Chem.* 37:752-756
43. Hecht SS Hoffmann D (1989) The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv.* 8:273-294
44. Coglianò V Straif K Baan R Grosse Y Secretan B El Ghissassi F (2004) Smokeless tobacco and tobacco-related nitrosamines. *Lancet Oncol.* 5:708
45. IARC (2007) Smokeless tobacco and tobacco-specific *N*-nitrosamines. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol. 89, pp1-626, Lyon, France
46. Ashley DL Beeson MD Johnson DR McCraw JM Richter P Pirkle JL Pechacek TF Song S Watson CH (2003) Tobacco-specific nitrosamines in tobacco from US brand and non-US brand cigarettes. *Nicotine Tob.Res.* 5:323-331
47. Stepanov I Carmella SG Hecht SS Duca G (2002) Analysis of tobacco-specific nitrosamines in Moldovan cigarette tobacco. *J.Agric.Food Chem.* 50:2793-2797
48. Stepanov I Jensen J Hatsukami D Hecht SS (2006) Tobacco-specific nitrosamines in new tobacco products. *Nicotine Tob.Res.* 8:309-313
49. de Roton C Wiernik A Wahlberg I Vidal B (2005) Factors influencing the formation of tobacco-specific nitrosamines in French air-cured tobaccos in trials at the farm level. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 21:305-320
50. Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem.Res.Toxicol.* 11:559-603
51. Richter E Tricker AR (2002) Effect of nicotine, cotinine and phenethyl isothiocyanate on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolism in the Syrian golden hamster. *Toxicology* 179:95-103
52. Jalas JR Hecht SS Murphy SE (2005) Cytochrome P450 enzymes as catalysts of metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco specific carcinogen. *Chem.Res.Toxicol.* 18:95-110
53. Hecht SS (2008) Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. *Chem.Res.Toxicol.* 21:160-171

54. Hecht SS Hatsukami DK Bonilla LE Hochalter JB (1999) Quantitation of 4-oxo-4-(3-pyridyl)-butanoic acid and enantiomers of 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butanoic acid in human urine: a substantial pathway of nicotine metabolism. *Chem.Res.Toxicol.* 12:172-179
55. Maser E (1998) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase responsible for carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes. *Cancer Res.* 58:2996-3003
56. Maser E (2004) Significance of reductases in the detoxification of the tobacco-specific carcinogen NNK. *Trends Pharmacol.Sci.* 25:235-237
57. Chen G Dellinger RW Gallagher CJ Sun D Lazarus P (2008) Identification of a prevalent functional missense polymorphism in the *UGT2B10* gene and its association with UGT2B10 inactivation against tobacco-specific nitrosamines. *Pharmacogenet.Genomics* 18:181-191
58. Tyroller S Zwickenspflug W Thalheim C Richter E (2005) Acute and subacute effects of tobacco alkaloids, tobacco-specific nitrosamines and phenethyl isothiocyanate on *N'*-nitrosornicotine metabolism in rats. *Toxicology* 215:245-253
59. Carmella SG Hecht SS (1987) Formation of hemoglobin adducts upon treatment of F344 rats with the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N'*-nitrosornicotine. *Cancer Res.* 47:2626-2630
60. Carmella SG Akerkar S Hecht SS (1993) Metabolites of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers' urine. *Cancer Res.* 53:721-724
61. 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
62. 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
63. Falter B Kutzer C Richter E (1994) Biomonitoring of hemoglobin adducts: aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin.Investig.* 72:364-371
64. Branner B Kutzer C Zwickenspflug 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
65. 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
66. 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
67. Foiles PG Murphy SE Peterson LA Carmella SG Hecht SS (1992) DNA and hemoglobin adducts as markers of metabolic activation of tobacco-specific carcinogens. *Cancer Res.* 52 (Suppl.):2698s-2701s
68. 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
69. Heppel CW Heling A-K Richter E (2009) Ultrasensitive method for the determination of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts by gas chromatography-high resolution mass spectrometry in mucosal biopsies of the lower esophagus. *Anal.Bioanal.Chem.* 393:1525-1530

70. Heppel CW (2009) Untersuchungen zur Ätiologie des ösophagealen Adenokarzinoms in Abhängigkeit zur Myosinbelastung durch die Ernährung. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
71. Lao Y Yu N Kassie F Villalta PW Hecht SS (2007) Formation and accumulation of pyridyl-oxobutyl 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
72. 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'*-nitrosornicotine. *Chem.Res.Toxicol.* 20:246-256
73. Wang M Cheng G Villalta PW Hecht SS (2007) Development of liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for analysis of DNA adducts of formaldehyde and their application to rats treated with *N*-nitrosodimethylamine or 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Chem.Res.Toxicol.* 20:1141-1148
74. Upadhyaya P Kalscheuer S Hochalter JB Villalta PW Hecht SS (2008) Quantitation of pyridyl-hydroxybutyl-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
75. Zhang S Wang Y Villalta PW Lindgren BR Upadhyaya P Lao Y Hecht SS (2009) Analysis of pyridyloxobutyl and pyridylhydroxybutyl DNA adducts in extrahepatic tissues of F344 rats treated chronically with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chem.Res.Toxicol.* 22:926-936
76. Zhang S Wang M Villalta PW Lindgren BR Lao Y Hecht SS (2009) Quantitation of pyridyl-oxobutyl DNA adducts in nasal and oral mucosa of rats treated chronically with enantiomers of *N'*-nitrosornicotine. *Chem.Res.Toxicol.* 22:949-956
77. 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
78. Benowitz NL (1996) Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol.Rev.* 18:188-204
79. Domino EF Hornbach E Demana T (1993) The nicotine content of common vegetables. *N.Engl.J.Med.* 329:437
80. Siegmund B Leitner E Pfannhauser W (1999) Determination of the nicotine content of various edible nightshades (*Solanaceae*) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake. *J.Agric.Food Chem.* 47:3113-3120
81. Dixon M Lambing K Seeman JI (2000) On the transfer of nicotine from tobacco to the smoker. A brief review of ammonia and "pH" factors. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 19:103-113
82. Armitage AK Dixon M Frost BE Mariner DC Sinclair NM (2004) The effect of tobacco blend additives on the retention of nicotine and solanesol in the human respiratory tract and on subsequent plasma nicotine concentrations during cigarette smoking. *Chem.Res.Toxicol.* 17:537-544
83. Hukkanen J Jacob P Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol.Rev.* 57:79-115
84. Lindell G Farnebo L-O Chen D Nexø E Rask Madsen J Bukhave K Graffner H (1993) Acute effects of smoking during modified sham feeding in duodenal ulcer patients. An analysis of nicotine, acid secretion, gastrin, catecholamines, epidermal growth factor, prostaglandin E<sub>2</sub>, and bile acids. *Scand.J.Gastroenterol.* 28:487-494

85. Uematsu T Mizuno A Nagashima S Oshima A Nakamura M (1995) The axial distribution of nicotine content along hair shaft as an indicator of changes in smoking behaviour: evaluation in a smoking-cessation programme with or without the aid of nicotine chewing gum. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 39:665-669
86. Klein J Koren G (1999) Hair analysis - a biological marker for passive smoking in pregnancy and childhood. *Hum.Exp.Toxicol.* 18:279-282
87. Luck W Nau H (1984) Exposure of the fetus, neonate, and nursed infant to nicotine and cotinine from maternal smoking. *N.Engl.J.Med.* 311:672
88. Luck W Nau H (1987) Nicotine and cotinine concentrations in the milk of smoking mothers: influence of cigarette consumption and diurnal variation. *Eur.J.Pediatr.* 146:21-26
89. Dahlström A Lundell B Curvall M Thapper L (1990) Nicotine and cotinine concentrations in the nursing mother and her infant. *Acta Paediatr.Scand.* 79:142-147
90. Shigenaga MK Trevor AJ Castagnoli N (1988) Metabolism-dependent covalent binding of (S)-[5-<sup>3</sup>H]nicotine to liver and lung microsomal macromolecules. *Drug Metab.Dispos.* 16:397-402
91. Wu XH Wang HF Liu YF Lu XY Wang JJ Li K (1997) Histone adduction with nicotine: a bio-AMS study. *Radiocarbon* 39:293-297
92. Li XS Wang HF Shi JY Wang XY Liu YF Li K Lu XY Wang JJ Liu KX Guo ZY (1996) Genotoxicity study on nicotine and nicotine-derived nitrosamine by accelerator mass spectrometry. *Radiocarbon* 38:347-353
93. Cheng Y Wang HF Sun HF Li HL Liu YF Peng SX Liu KX Guo ZY (2005) Accelerator mass spectrometry (AMS) of the inhibitory effect of six dietary constituents on nicotine-hemoglobin adduction in mice. *J.Radioanal.Nuclear Chem.* 264:665-669
94. Groman E Fagerström K (2003) Nicotine dependence: development, mechanisms, individual differences and links to possible neurophysiological correlates. *Wien.Klin.Wochenschr.* 115:155-160
95. Benowitz NL (2008) Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin.Pharmacol.Ther.* 83:531-541
96. Lerner A Koss E Debanne S Rowland D Smyth K Friedland R (1997) Smoking and oestrogen-replacement therapy as protective factors for Alzheimer's disease. *Lancet* 349:403-404
97. Checkoway H Powers K Smith-Weller T Franklin GM Longstreth WT Swanson PD (2002) Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake. *Am.J.Epidemiol.* 155:732-738
98. O'Reilly EJ McCullough ML Chao A Henley SJ Calle EE Henley SJ Calle EE Thun MJ Ascherio A (2005) Smokeless tobacco use and the risk of Parkinson's disease mortality. *Mov.Disord.* 20:1383-1384
99. Kim I Darwin WD Huestis MA (2005) Simultaneous determination of nicotine, cotinine, nor-cotinine, and *trans*-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J.Chromatogr.B* 814:233-240
100. Fang YY Svoboda KKH (2005) Nicotine inhibits myofibroblast differentiation in human gingival fibroblasts. *J.Cell Biochem.* 95:1108-1119
101. Sauer WH Berlin JA Strom BL Miles C Carson JL Kimmel SE (2002) Cigarette yield and the risk of myocardial infarction in smokers. *Arch.Intern.Med.* 162:300-306
102. Ruiz-Bailén M de Hoyos EA Reina-Toral A Torres-Ruiz JM Alvarez-Bueno M Jiménez FJG (2004) Paradoxical effect of smoking in the Spanish population with acute myocardial infarction or unstable angina - Results of the ARIAM register. *Chest* 125:831-840

103. Richter E Scherer G (2004) Aktives und passives Rauchen. in: Lehrbuch der Toxikologie; Ch. 35, pp 897-918; eds: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
104. Hergens M-P Ahlbom A Andersson T Pershagen G (2005) Swedish moist snuff and myocardial infarction among men. *Epidemiology* 16:12-16
105. Brandänge S Rodriguez B (1983) Ring chain tautomerism of myosmine. *Acta Chem.Scand.Ser.B* 37:643-644
106. 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
107. 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
108. Schumacher JN (1984) Flavor composition of Maryland tobacco. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 12:271-278
109. Leete E (1984) The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic-pathway in *Nicotiana tabacum*. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 12:113-116
110. 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
111. 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
112. Smalberger TM Rall GJH de Waal HL (1968) Carica papaya alkaloids. *Tydskr.Natuurwet.* 8:156-157
113. 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
114. Halim AF Collins RP Berigari MS (1971) Alkaloids produced by *Cestrum nocturnum* and *Cestrum diurnum*. *Planta Med.* 20:44-49
115. Luanratana O Griffin WJ (1982) Alkaloids of *Duboisia hopwoodii*. *Phytochemistry* 21:449-451
116. Watson PL Luanratana O Griffin WJ (1983) The ethnopharmacology of pituri. *J.Ethnopharmacol.* 8:303-311
117. Zwickenspflug 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
118. Tyroller S Zwickenspflug W Richter E (2002) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables and milk. *J.Agric.Food Chem.* 50:4909-4915
119. Hayes JR Steele RH (1989) A review of the literature pertaining to the toxicology of myosmine. *Premier Chem.* 1:12-35
120. Werle E Schievelbein H (1961) Tabellen zur Toxikologie, Pharmakologie und Chemie von Inhaltsstoffen des Tabaks und des Tabakrauchs. 1. Mitteilung. *Arzneimittelforsch.* 11:1011-1016
121. Ambrose AM DeEds F (1946) Some comparative observations on (-)-nicotine and myosmine. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 63:423-424



122. 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
123. Riebe M Westphal K Fortnagel P (1982) Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. *Mutat.Res.* 101:39-43
124. 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
125. Vogt S Fuchs K Richter E (2006) Genotoxic effects of myosmine in a human esophageal adenocarcinoma cell line. *Toxicology* 222:71-79
126. Havla JB Hill CE Abdel-Rahman SZ Richter E (2009) Evaluation of the mutagenic effects of myosmine in human lymphocytes using the *HPRT* gene mutation assay. *Food Chem.Toxicol.* 47:237-241
127. Zwickenpflug W Tyroller S Richter E (2005) Metabolism of myosmine in Wistar rats. *Drug Metab.Dispos.* 33:1648-1656
128. 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
129. Zwickenpflug 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
130. Wilp J Zwickenpflug W Richter E (2002) Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem.Toxicol.* 40:1223-1228
131. Zwickenpflug W Tyroller S (2006) Reaction of the tobacco alkaloid myosmine with hydrogen peroxide. *Chem.Res.Toxicol.* 19:150-155
132. Benowitz NL Jacob P (1994) Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin.Pharmacol.Ther.* 56:483-493
133. Tricker AR (2003) Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology* 183:151-173
134. Besaratinia A Maas LM Brouwer EMC Moonen EJC de Kok TMCM Wesseling GJ Loft S Kleinjans JCS van Schooten F-J (2002) A molecular dosimetry approach to assess human exposure to environmental tobacco smoke in pubs. *Carcinogenesis* 23:1171-1176
135. Benowitz NL Kuyt F Jacob P Jones TR Osman A-L (1983) Cotinine disposition and effects. *Clin.Pharmacol.Ther.* 34:604-611
136. Scherer G Meger-Kossien I (2000) Cotinine. in: *Analyses of hazardous substances in biological materials*; pp 171-189; ed.: Greim H, Volume 7D-69469 Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH
137. LaKind JS Jenkins RA Naiman DQ Ginevan ME Graves CG Tardiff RG (1999) Use of environmental tobacco smoke constituents as markers for exposure. *Risk Anal.* 19:359-373
138. Etter J-F Duc TV Perneger TV (2000) Saliva cotinine levels in smokers and nonsmokers. *Am.J.Epidemiol.* 151:251-258
139. Chetiyankornkul T Toriba A Kizu R Kimura K Hayakawa K (2004) Hair analysis of nicotine and cotinine for evaluating tobacco smoke exposure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomed.Chromatogr.* 18:655-661
140. 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

141. Kintz P (1992) Gas-chromatographic analysis of nicotine and cotinine in hair. *J.Chromatogr.B* 580:347-353
142. Lorient M-A Rebuissou S Oscarson M Cenée S Miyamoto M Ariyoshi N Kamataki T Hémon D Beaune P Stücker I (2001) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2A6 in a case-control study on lung cancer in a French population. *Pharmacogenetics* 11:39-44
143. Yamanaka H Nakajima M Nishimura K Yoshida R Fukami T Katoh M Yokoi T (2004) Metabolic profile of nicotine in subjects whose *CYP2A6* gene is deleted. *Eur.J.Pharm.Sci.* 22:419-425
144. Schoedel KA Hoffmann EB Rao Y Sellers EM Tyndale RF (2004) Ethnic variation in *CYP2A6* and association of genetically slow nicotine metabolism and smoking in adult Caucasians. *Pharmacogenetics* 14:615-626
145. Wahlberg I Wiernik A Christakopoulos A Johansson L (2000) Tobacco-specific nitrosamines. A multidisciplinary research area. *Agro-Food Ind.* 10:23-28
146. Hoffmann D Djordjevic MV Brunnemann KD (1991) New brands of oral snuff. *Food Chem.Toxicol.* 29:65-68
147. Hoffmann D Adams JD (1981) Carcinogenic tobacco-specific *N*-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers. *Cancer Res.* 41:4305-4308
148. Hirsch J-M Thilander H (1981) Snuff-induced lesions of the oral-mucosa - an experimental-model in the rat. *J.Oral Pathol.Med.* 10:342-353
149. Andersson G (1991) Snuff-induced changes associated with the use of loose and portion-bag-packed Swedish moist snuff. A clinical, histological and follow-up study. *Swed.Dent.J.Suppl* 75:1-89
150. Österdahl BG Slorach SA (1983) Volatile *N*-nitrosamines in snuff and chewing tobacco on the Swedish market. *Food Chem.Toxicol.* 21:759-762
151. Djordjevic MV Fan JR Bush LP Brunnemann KD Hoffmann D (1993) Effects of storage conditions on levels of tobacco-specific *N*-nitrosamines and *N*-nitrosamino acids in U.S. moist snuff. *J.Agric.Food Chem.* 41:1790-1794
152. Djordjevic MV Brunnemann KD Hoffmann D (1993) The need for regulation of carcinogenic *N*-nitrosamines in oral snuff. *Food Chem.Toxicol.* 31:497-501
153. Österdahl B-G Jansson C Paccou A (2004) Decreased levels of tobacco-specific *N*-nitrosamines in moist snuff on the Swedish market. *J.Agric.Food Chem.* 52:5085-5088
154. Palladino G Adams JD Brunnemann KD Haley NJ Hoffmann D (1986) Snuff-dipping in college students: a clinical profile. *Military Med.* 151:342-346
155. Österdahl B-G Slorach S (1988) Tobacco-specific *N*-nitrosamines in the saliva of habitual male snuff dippers. *Food Add.Contam.* 5:581-586
156. Idris AM Nair J Friesen M Ohshima H Brouet I Faustman EM Bartsch H (1992) Carcinogenic tobacco-specific nitrosamines are present at unusually high levels in the saliva of oral snuff users in Sudan. *Carcinogenesis* 13:1001-1005
157. Brunnemann KD Qi J Hoffmann D (2002) Chemical profile of two types of oral snuff tobacco. *Food Chem.Toxicol.* 40:1699-1703
158. Lu GH Ralapati S (1998) Application of high-performance capillary electrophoresis to the quantitative analysis of nicotine and profiling of other alkaloids in ATF-regulated tobacco products. *Electrophoresis* 19:19-26
159. Jacob P Yu L Shulgin AT Benowitz NL (1999) Minor tobacco alkaloids as biomarkers for tobacco use: Comparison of users of cigarettes, smokeless tobacco, cigars, and pipes. *Am.J.Publ.Health* 89:731-736

160. IARC (1986) Tobacco Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 37, pp1-291, Lyon, France
161. Stratton K Shetty P Wallace R Bondurant S (2001) Clearing the smoke: the science base for tobacco harm reduction - executive summary. *Tob.Control* 10:189-195
162. Winn DM Blot WJ Shy CM Pickle LW Toledo A Fraumeni JF (1981) Snuff dipping and oral cancer among women in the southern United States. *N.Engl.J.Med.* 304:745-749
163. Weitkunat R Sanders E Lee PN (2007) Meta-analysis of the relation between European and American smokeless tobacco and oral cancer. *BMC Public Health* 7:334
164. Henley SJ Thun MJ Connell C Calle EE (2005) Two large prospective studies of mortality among men who use snuff or chewing tobacco (United States). *Cancer Causes Control* 16:347-358
165. Accortt NA Waterbor JW Beall C Howard G (2005) Cancer incidence among a cohort of smokeless tobacco users (United States). *Cancer Causes Control* 16:1107-1115
166. Rodu B Jansson C (2004) Smokeless tobacco and oral cancer: a review of the risks and determinants. *Crit.Rev.Oral Biol.Med.* 15:252-263
167. Schildt E-B Eriksson M Hardell L Magnuson A (1998) Oral snuff, smoking habits and alcohol consumption in relation to oral cancer in a Swedish case-control study. *Int.J.Cancer* 77:341-346
168. Luo J Ye W Zendehdel K Adami J Adami H-O Boffetta P Nyrén O (2007) Oral use of Swedish moist snuff (snus) and risk for cancer of the mouth, lung, and pancreas in male construction workers: a retrospective cohort study. *Lancet* 369:2015-2020
169. Andersson G Warfvinge G (2003) The influence of pH and nicotine concentration in oral moist snuff on mucosal changes and salivary pH in Swedish snuff users. *Swed.Dent.J.* 27:67-75
170. Caldeira EJ Carvalho CAF Padovani CR Camilli JA Garcia PJ Cagnon VHA (2007) Morphological alterations in the epithelium of the oral mucosa of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to long-term systemic nicotine treatment. *Arch.Oral Biol.* 52:83-89
171. Heuch I Kvale G Jacobsen BK Bjelke E (1983) Use of alcohol, tobacco and coffee, and risk of pancreatic cancer. *Br.J.Cancer* 48:637-643
172. Boffetta P Aagnes B Weiderpass E Andersen A (2005) Smokeless tobacco use and risk of cancer of the pancreas and other organs. *Int.J.Cancer* 114:992-995
173. Williams RR Horm JW (1977) Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic-status of patients - interview study from 3Rd National Cancer Survey. *J.Natl.Cancer Inst.* 58:525-547
174. Farrow DC Davis S (1990) Risk of pancreatic cancer in relation to medical history and the use of tobacco, alcohol and coffee. *Int.J.Cancer* 45:816-820
175. Muscat JE Stellman SD Hoffmann D Wynder EL (1997) Smoking and pancreatic cancer in men and women. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 6:15-19
176. Alguacil J Silverman DT (2004) Smokeless and other noncigarette tobacco use and pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 13:55-58
177. Sponsiello-Wang Z Weitkunat R Lee PN (2008) Systematic review of the relation between smokeless tobacco and cancer of the pancreas in Europe and North America. *BMC Cancer* 8:356
178. Bolinder G Alfredsson L Englund A Defaire U (1994) Smokeless tobacco use and increased cardiovascular mortality among Swedish construction workers. *Am.J.Publ.Health* 84:399-404

179. Fant RV Henningfield JE Nelson RA Pickworth WB (1999) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of moist snuff in humans. *Tob.Control* 8:387-392
180. Ernster VL Grady DG Greene JC Walsh M Robertson P Daniels TE Benowitz N Siegel D Gerbert B Hauck WW (1990) Smokeless tobacco use and health effects among baseball players. *JAMA* 264:218-224
181. Wolk R Shamsuzzaman ASM Svatikova A Huyber CM Huck C Narkiewicz K Somers VK (2005) Hemodynamic and autonomic effects of smokeless tobacco in healthy young men. *J.Am.Coll.Cardiol.* 45:910-914
182. Bolinder G Noren A Wahren J Defaire U (1997) Long-term use of smokeless tobacco and physical performance in middle-aged men. *Eur.J.Clin.Invest.* 27:427-433
183. Bolinder G Norén A de Faire U Wahren J (1997) Smokeless tobacco use and atherosclerosis: an ultrasonographic investigation of carotid intima media thickness in healthy middle-aged men. *Atherosclerosis* 132:95-103
184. Bolinder GM Ahlberg BO Lindell JH (1992) Use of smokeless tobacco - blood-pressure elevation and other health-hazards found in a large-scale population survey. *J.Int.Med.* 232:327-334
185. Hergens M-P Alfredsson L Bolinder G Lambe M Pershagen G Ye W (2007) Long-term use of Swedish moist snuff and the risk of myocardial infarction amongst men. *J.Int.Med.* 262:351-359
186. Johansson S-E Sundquist K Qvist J Sundquist J (2005) Smokeless tobacco and coronary heart disease: a 12 year follow-up study. *Eur.J.Cardiovasc.Prev.Rehabil.* 12:387-392
187. Hergens M-P Lambe M Pershagen G Ye W (2008) Risk of hypertension amongst Swedish male snuff users: a prospective study. *J.Int.Med.* 264:187-194
188. Huhtasaari F Asplund K Lundberg V Stegmayr B Wester PO (1992) Tobacco and myocardial infarction: is snuff less dangerous than cigarettes? *BMJ* 305:1252-1256
189. Huhtasaari F Lundberg V Eliasson M Janlert U Asplund K (1999) Smokeless tobacco as a possible risk factor for myocardial infarction: a population-based study in middle-aged men. *J.Am.Coll.Cardiol.* 34:1784-1790
190. Teo KK Ounpuu S Hawken S Pandey MR Valentin V Hunt D Diaz R Rashed W Freeman R Jiang L Zhang X Yusuf S (2006) Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet* 368:647-658
191. Persson PG Carlsson S Svanstrom L Ostenson CG Efendic S Grill V (2000) Cigarette smoking, oral moist snuff use and glucose intolerance. *J.Int.Med.* 248:103-110
192. Eliasson M Asplund K Evrin PE Lundblad D (1995) Relationship of cigarette-smoking and snuff dipping to plasma-fibrinogen, fibrinolytic variables and serum-insulin - the Northern Sweden Monica Study. *Atherosclerosis* 113:41-53
193. Benedetti MD Bower JH Maraganore DM McDonnell SK Peterson BJ Ahlskog JE Schaid DJ Rocca WA (2000) Smoking, alcohol, and coffee consumption preceding Parkinson's disease - a case-control study. *Neurology* 55:1350-1358
194. Quik M (2004) Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 27:561-568
195. Accortt NA Waterbor JW Beall C Howard G (2002) Chronic disease mortality in a cohort of smokeless tobacco users. *Am.J.Epidemiol.* 156:730-737
196. Ernst M Moolchan ET Robinson ML (2001) Behavioral and neural consequences of prenatal exposure to nicotine. *J.Am.Acad.Child Adolesc.Psychiatry* 40:630-641

197. Pringle PJ Geary MPP Rodeck CH Kingdom JCP Kayamba-Kay's S Hindmarsh PC (2005) The influence of cigarette smoking on antenatal growth, birth size, and the insulin-like growth factor axis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 90:2556-2562
198. Law KL Stroud LR LaGasse LL Niaura R Liu J Lester BM (2003) Smoking during pregnancy and newborn neurobehavior. *Pediatrics* 111:1318-1323
199. Lambers DS Clark KE (1996) The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin.Perinatol.* 20:115-126
200. England LJ Levine RJ Mills JL Klebanoff MA Yu KF Cnattingius S (2003) Adverse pregnancy outcomes in snuff users. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 189:939-943
201. 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
202. Angerer J Ewers U Wilhelm M (2007) Human biomonitoring: state of the art. *Int.J.Hyg.Envirn.Health* 210:201-228
203. 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
204. 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
205. Phillips DH Castegnaro M (1999) Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 14:301-315
206. Poirier MC (2004) Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat.Rev.Cancer* 4:630-637
207. Prodhomme EJF Ensich C Bouche FB Kaminski T Deroo S Seck P Kirsch G Muller CP (2007) Synthesis of 4-[2-aminoethyl(nitrosamino)]-1-pyridin-3-yl-butan-1-one, a new NNK hapten for the induction of *N*-nitrosamine-specific antibodies. *Bioconjugate Chem.* 18:2045-2053
208. Matissek G Steiner G (2006) *Lebensmittelanalytik. 3*; Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag
209. DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft (2006) The use of gas chromatography-mass spectrometry in biological monitoring. The MAK-Collection Part IV: Biomonitoring Methods. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim
210. Cammann K (2001) *Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung.* Heidelberg - Berlin, Spectrum Akademischer Verlag GmbH
211. Rychlik M (2002) *Stabilisotopenverdünnungsanalyse in der Lebensmittelanalytik - Neuentwicklungen und Einsatz in der Lebensmittelchemie, Toxikologie und Ernährungswissenschaft.* Habilitationsschrift an der Technischen Universität München
212. 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
213. Schütte-Borkovec K Heppel CW Heling A-K Richter E (2009) Analysis of myosmine, cotinine and nicotine in human toenail, plasma and saliva. *Biomarkers* 14:278-284
214. Glenn DF Edwards WB (1978) Synthesis and mass-spectrometry of some structurally related nicotinoids. *J.Org.Chem.* 43:2860-2870
215. 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

216. Brown EV Ahmad I (1972) Alkaloids of cigarette smoke condensate. *Phytochemistry* 11:3485-3490
217. Tricker AR (2006) Biomarkers derived from nicotine and its metabolites: a review. *Beitr.Tabakforsch.Int.* 22:147-175
218. West R Zatonski W Przewozniak K Jarvis MJ (2007) Can we trust national smoking prevalence figures? Discrepancies between biochemically assessed and self-reported smoking rates in three countries. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 16:820-822
219. Lagiou P Talamini R Samoli E Lagiou A Ahrens W Pohlabein H Benhamou S Bouchardy C Slamova A Schejbalova M Merletti F Richiardi L Kjaerheim K Agudo A Castellsague X Macfarlane TV Macfarlane GJ Biggs A-M Barzan L Canova C Simonato L Lowry RJ Conway DI McKinney PA Znaor A McCartan BE Healy CM Marron M Hashibe M Brennan P (2009) Diet and upper-aerodigestive tract cancer in Europe: The ARCAGE study. *Int.J.Cancer* 124:2671-2676
220. 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
221. Staretz ME Foiles PG Miglietta LM Hecht SS (1997) Evidence for an important role of DNA pyridyloxobutylation in rat lung carcinogenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone: effects of dose and phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res.* 57:259-266
222. Murphy SE Palomino A Hecht SS Hoffmann D (1990) Dose-response study of DNA and hemoglobin adduct formation by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in F344 rats. *Cancer Res.* 50:5446-5452
223. Richter E Schlöbe D Hölzle D Wilp J (2002) Comparative DNA and hemoglobin adduct formation by dietary myosmine and *N*'-nitrosornicotine in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 365 (Suppl.1):R140
224. Wilp J (2002) Endogene und exogene Nitrosierung von Myosmin. Ein Beitrag zur toxikologischen Relevanz. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
225. 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
226. Seitz HK Stickel F (2007) Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat.Rev.Cancer* 7:599-612
227. IARC (2009) Overall evaluations of carcinogenicity to humans <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
228. DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft (2009) MAK- und BAT-Wert-Liste. Mitteilung 45 der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe vom 1. Juli 2009; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
229. Nachiappan V Mufti SI Chakravarti A Eskelson CD Rajasekharan R (1994) Lipid peroxidation and ethanol-related tumor promotion in Fischer-344 rats treated with tobacco-specific nitrosamines. *Alcohol Alcohol.* 29:565-574
230. Seitz HK (1985) Ethanol and carcinogenesis. in: *Alcohol Related Diseases in Gastroenterology*; Ch. 11, pp 196-212; eds: Seitz HK Kommerell B; Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag
231. Hong J Yang CS (1985) The nature of microsomal N-nitrosodimethylamine demethylase and its role in carcinogen activation. *Carcinogenesis* 6:1805-1809
232. Seitz HK Stickel F Homann N (2004) Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics. *Int.J.Cancer* 108:483-487

233. Runge DM Stock TW Lehmann T Taege C Bernauer U Stolz DB Hofmann S Foth H (2001) Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture. *Arch.Toxicol.* 75:335-345
234. Jorquera R Castonguay A Schuller HM (1992) Effects of pregnancy and ethanol treatment on the metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by hamster liver and lung microsomes. *Drug Metab.Dispos.* 20:510-517
235. Ardies CM Smith TJ Kim SB Yang CS (1996) Induction of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) activation in rat lung microsomes by chronic ethanol consumption and repeated running exercise. *Cancer Lett.* 103:209-218
236. Chhabra SK Anderson LM Perella C Desai D Amin S Kyrtopoulos SA Souliotis VL (2000) Coexposure to ethanol with *N*-nitrosodimethylamine or 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone during lactation of rats: marked increase in O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA adducts in maternal mammary gland and in suckling lung and kidney. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 169:191-200
237. Chhabra SK Souliotis VL Harbaugh JW Krasnow SW Jones AB Anderson LM Kyrtopoulos SA (1995) O<sup>6</sup>-Methylguanine DNA adduct formation and modulation by ethanol in placenta and fetal tissues after exposure of pregnant patas monkeys to *N*-nitrosodimethylamine. *Cancer Res.* 55:6017-6020
238. Anderson LM Souliotis VL Chhabra SK Moskal TJ Harbaugh SD Kyrtopoulos SA (1996) *N*-nitrosodimethylamine-derived O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA of monkey gastrointestinal and urogenital organs and enhancement by ethanol. *Int.J.Cancer* 66:130-134
239. Habs M Schmähl D (1981) Inhibition of the hepatocarcinogenic activity of diethylnitrosamine (DENA) by ethanol in rats. *Hepato-Gastroenterol.* 28:242-244
240. Swann PF Coe AM Mace R (1984) Ethanol and dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine metabolism and disposition in the rat. Possible relevance to the influence of ethanol on human cancer incidence. *Carcinogenesis* 5:1337-1343
241. Trushin N Castonguay A Rivenson A Hecht SS (1985) Effects of ethanol consumption on the metabolism and carcinogenicity of *N*'-nitrosornicotine in F344 rats. *Ann.NY Acad.Sci.USA* 435:214-218
242. Anderson LM (1988) Increased numbers of *N*-nitrosodimethylamine-initiated lung tumors in mice by chronic co-administration of ethanol. *Carcinogenesis* 9:1717-1719
243. Anderson LM Carter JP Logsdon DL Driver CL Kovatch RM (1992) Characterization of ethanol's enhancement of tumorigenesis by *N*-nitrosodimethylamine in mice. *Carcinogenesis* 13:2107-2111
244. Anderson LM Carter JP Driver CL Logsdon DL Kovatch RM Giner-Sorolla A (1993) Enhancement of tumorigenesis by *N*-nitrosodiethylamine, *N*-nitrosopyrrolidine and *N*<sup>6</sup>-(methylnitroso)-adenosine by ethanol. *Cancer Lett.* 68:61-66
245. Hecht SS (2002) Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol.* 3:461-469
246. Chung F-L (2001) Chemoprevention of lung cancer by isothiocyanates and their conjugates in A/J mouse. *Exp.Lung Res.* 27:319-330
247. Stoner GD (2009) Foodstuffs for preventing cancer: the preclinical and clinical development of berries. *Cancer Prev.Res.* 2:187-194
248. Castonguay A Pepin P Stoner GD (1991) Lung tumorigenicity of NNK given orally to A/J mice: its application to chemopreventive efficacy studies. *Exp.Lung Res.* 17:485-499
249. Pepin P Rossignol G Castonguay A (1990) Inhibition of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by ellagic acid and butylated hydroxyanisole. *Cancer J.* 3:266-271

250. Boukharta M Jalbert G Castonguay A (1992) Biodistribution of ellagic acid and dose-related inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice. *Nutr.Cancer* 12:181-189
251. Castonguay A Gali HU Perchellet EM Gao XM Boukharta M Jalbert G Okuda T Yoshida T Hatano T Perchellet J-P (1997) Antitumorigenic and antipromoting activities of ellagic acid, ellagitannins and oligomeric anthocyanin and procyanin. *Int.J.Oncol.* 10:367-373
252. Kishimoto M Yano Y Yajima S Otani S Ichikawa T Yano T (1998) The inhibitory effect of vitamin E on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in mice based on the regulation of polyamine metabolism. *Cancer Lett.* 126:173-178
253. Kim Y Chongviriyaphan N Liu C Russell RM Wang X-D (2006) Combined antioxidant ( $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid) supplementation increases the levels of lung retinoic acid and inhibits the activation of mitogen-activated protein kinase in the ferret lung cancer model. *Carcinogenesis* 27:1410-1419
254. Castonguay A Allaire L Charest M Rossignol G Boutet M (1989) Metabolism of 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by hamster respiratory tissues cultured with ellagic acid. *Cancer Lett.* 46:93-105
255. Zhang Z Hamilton SM Stewart C Strother A Teel RW (1993) Inhibition of liver microsomal cytochrome P450 activity and metabolism of the tobacco-specific nitrosamine NNK by capsaicin and ellagic acid. *Anticancer Res.* 13:2341-2346
256. Yano T Yajima S Nakamura T Horikawa S Kishimoto M Ichikawa T (1998) The inhibitory effect of vitamin E on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA injury and the fixation of the DNA injury in mouse lungs. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 358:275-278
257. Romert L Curvall M Jenssen D (1992) Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagenesis* 7:349-355
258. Daniel EM Krupnick AS Heur Y-H Blinzler JA Nims RW Stoner GD (1989) Extraction stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *J.Food Compos.Anal.* 2:338-349
259. Iino T Nakahara K Miki W Kiso Y Ogawa Y Kato S Takeuchi K (2001) Less damaging effect of whisky in rat stomachs in comparison with pure ethanol - Role of ellagic acid, the nonalcoholic component. *Digestion* 64:214-221
260. Knoll MR Kölbel CB Teyssen S Singer MV (1998) Action of pure ethanol and some alcoholic beverages on the gastric mucosa in healthy humans: a descriptive endoscopic study. *Endoscopy* 30:293-301
261. Iino T Tashima K Umeda M Ogawa Y Takeeda M Takata K Takeuchi K (2002) Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion. *Life Sci.* 70:1139-1150
262. Mizui T Shimono N Doteuchi M (1987) A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats - polyamine protection may depend on its antiperoxidative properties. *Jpn.J Pharmacol* 44:43-50
263. Robert A Nezamis JE Lancaster C Hanchar AJ (1979) Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* 77:433-443
264. Takeuchi K Okada M Niida H Okabe S (1989) Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric-motility and cytoprotection. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 248:836-841
265. Whittle BJR Lopez-Belmonte J Moncada S (1990) Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *Br.J.Pharmacol.* 99:607-611



266. Botti RE Ratnoff OD (1964) Studies on pathogenesis of thrombosis - experimental hypercoagulable state induced by intravenous injection of ellagic acid. *J.Lab.Clin.Med.* 64:385-398
267. Miller C Castonguay A Teel RW (1996) Modulation of the mutagenicity and metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by phenolic compounds. *Mutat.Res.* 368:221-233
268. Domke A Großklaus B Niemann H Przyrembel H Richter K Schmidt E Weißenborn A Wörner B Ziegenhagen R (2004) Verwendung von Vitaminen in Lebensmitteln - Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte. [http://www.bfr.bund.de/cm/238/verwendung\\_von\\_vitaminen\\_in\\_lebensmitteln.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/238/verwendung_von_vitaminen_in_lebensmitteln.pdf)
269. Lupulescu A (1994) The role of vitamins A, beta-carotene, E and C in cancer cell biology. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* 64:3-14
270. Knekt P Aromaa A Maatela J Aaran R-K Nikkari T Hakama M Hakulinen T Peto R Teppo L (1991) Vitamin E and cancer prevention. *Am.J.Clin.Nutr.* 53:S283-S286
271. Albanes D Heinonen OP Taylor PR Virtamo J Edwards BK Rautalahti M Hartman AM Palmgren J Freedman LS Haapakoski J Barrett MJ Pietinen P Malila N Tala E Liippo K Salomaa E-R Tangrea JA Teppo L Askin FB Taskinen E Erozan Y Greenwald P Huttunen JK (1996)  $\alpha$ -Tocopherol and  $\beta$ -carotene supplements and lung cancer incidence in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study: effects of base line characteristics and study compliance. *J.Natl.Cancer Inst.* 88:1560-1570
272. Malila N Virtamo J Virtanen M Albanes D Tangrea JA Huttunen JK (1999) The effect of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene supplementation on colorectal adenomas in middle-aged male smokers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 8:489-493
273. Malila N Taylor PR Virtanen MJ Korhonen P Huttunen JK Albanes D Virtamo J (2002) Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on gastric cancer incidence in male smokers (ATBC Study, Finland). *Cancer Causes Control* 13:617-623
274. Leppälä JM Virtamo J Fogelholm R Huttunen JK Albanes D Taylor PR Heinonen OP (2000) Controlled trial of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20:230-235
275. Weitberg AB Corvese D (1997) Effect of vitamin E and beta-carotene on DNA strand breakage induced by tobacco-specific nitrosamines and stimulated human phagocytes. *J.Exp.Clin.Cancer Res.* 16:11-14
276. Kim Y Lian F Yeum K-J Chongviriyaphan N Choi S-W Russell RM Wang X-D (2007) The effects of combined antioxidant ( $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid) supplementation on antioxidant capacity, DNA single-strand breaks and levels of insulin-like growth factor-1/IGF-binding protein 3 in the ferret model of lung cancer. *Int.J.Cancer* 120:1847-1854
277. Jacobson JS Begg MD Wang LW Wang Q Agarwal M Norkus E Singh VN Young T-L Yang D Santella RM (2000) Effects of a 6-month vitamin intervention on DNA damage in heavy smokers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 9:1303-1311
278. Keusch P (2003) Chlorophyllin hält Konservengemüse "frisch". [http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische\\_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Chlorophylline-d.htm](http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Chlorophylline-d.htm)
279. Oregon State University Micronutrient Information Center (2009) Chlorophyll and Chlorophyllin. <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/chlorophylls/>
280. Dingley KH Ubick EA Chiarappa-Zucca ML Nowell S Abel S Ebeler SE Mitchell AE Burns SA Steinberg FM Clifford AJ (2003) Effect of dietary constituents with chemopreventive potential on adduct formation of a low dose of the heterocyclic amines PhIP and IQ and phase II hepatic enzymes. *Nutr.Cancer* 46:212-221

281. Simonich MT Egner PA Roebuck BD Orner GA Jubert C Pereira C Groopman JD Kensler TW Dashwood RH Williams DE Bailey GS (2007) Natural chlorophyll inhibits aflatoxin B<sub>1</sub>-induced multi-organ carcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis* 28:1294-1302
282. Jarvis MJ Fidler J Mindell J Feyerabend C West R (2008) Assessing smoking status in children, adolescents and adults: cotinine cut-points revisited. *Addiction* 103:1553-1561
283. Derendorf H Garrett ER (1987) *Pharmakokinetik - Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie*. Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
284. Teneggi V Squassante L Iavarone L Milleri S Bye A Gomeni R (2002) Correlation and predictive performances of saliva and plasma nicotine concentration on tobacco withdrawal-induced craving. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 54:407-414
285. Mucklow JC Bending MR Kahn GC Dollery CT (1978) Drug concentration in saliva. *Clin.Pharmacol.Ther.* 24:563-570
286. Ferketich AK Wee AG Shultz J Wewers ME (2007) Smokeless tobacco use and salivary cotinine concentration. *Addict.Behav.* 32:2953-2962
287. Boswell C Curvall M Elswick RK Leyden D (2000) Modelling nicotine intake in smokers and snuff users using biological fluid nicotine metabolites. *Biomarkers* 5:341-354
288. Richter P Hodge K Stanfill S Zhang L Watson C (2008) Surveillance of moist snuff: total nicotine, moisture, pH, un-ionized nicotine, and tobacco-specific nitrosamines. *Nicotine Tob.Res.* 10:1645-1652
289. Maier M Schulze A Richter E (2005) Biomonitoring of myosmine in human milk and saliva. *Toxicol.Lett.* 158:S201-S202
290. Tosi A Piraccini B (1999) Biology of nail. in: *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*; Ch. 18, pp 239-244; eds: Freedberg IM Eisen AZ Wolff K Ansten KF Goldsmith LA Katz SJ Fitzpatrick TB; 5New York, McGraw-Hill
291. Palmeri A Pichini S Pacifici R Zuccaro P Lopez A (2000) Drugs in nails: physiology, pharmacokinetics and forensic toxicology. *Clin.Pharmacokinet.* 38:95-110
292. 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
293. 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
294. 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
295. 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
296. Stepanov I Hecht SS (2008) Detection and quantitation of *N*'-nitrosonornicotine in human toenails by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 17:945-948
297. Ferguson HR Wild CP Anderson LA Murphy SJ Johnston BT Murray LJ Watson RGP McGuigan J Reynolds JV Hardie LJ (2008) Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of reflux esophagitis, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 17:727-731
298. Stich HF Rosin MP (1985) Towards a more comprehensive evaluation of a genotoxic hazard in man. *Mutat.Res.* 150:43-50

299. Stone JG Jones NJ McGregor AD Waters R (1995) Development of a human biomonitoring assay using buccal mucosa: comparison of smoking-related DNA adducts in mucosa *versus* biopsies. *Cancer Res.* 55:1267-1270
300. Dalsenter PR Faqi AS Webb J Merker H-J Chahoud I (1997) Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. *Hum.Exp.Toxicol.* 16:146-153
301. Hecht SS (2006) A biomarker of exposure to environmental tobacco smoke (ETS) and Ernst Wynder's opinion about ETS and lung cancer. *Prev.Med.* 43:256-260
302. Kavvadias D Scherer G Urban M Cheung F Errington G Shepperd J McEwan M (2009) Simultaneous determination of four tobacco-specific *N*-nitrosamines (TSNA) in human urine. *J.Chromatogr.B* 877:1185-1192
303. 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
304. Muscat JE Richie JP Thompson S Wynder EL (1996) Gender differences in smoking and risk for oral cancer. *Cancer Res.* 56:5192-5197
305. Rosenquist K Wennerberg J Schildt E-B Bladström A Hansson BG Andersson G (2005) Use of Swedish moist snuff, smoking and alcohol consumption in the aetiology of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 125:991-998
306. Ryberg D Hewer A Phillips DH Haugen A (1994) Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res.* 54:5801-5803
307. Loft S Svoboda P Kasai H Tjønneland A Møller P Sørensen M Overvad K Autrup H Raaschou-Nielsen O (2007) Prospective study of urinary excretion of 7-methylguanine and the risk of lung cancer: effect modification by *mu* class glutathione-*S*-transferases. *Int.J.Cancer* 121:1579-1584
308. Hashibe M Brennan P Chuang SC Boccia S Castellsague X Chen C Curado MP Dal Maso L Daudt AW Fabianova E Fernandez L Wunsch-Filho V Franceschi S Hayes RB Herrero R Kelsey K Koifman S La Vecchia C Lazarus P Levi F Lence JJ Mates D Matos E Menezes A McClean MD Muscat J Eluf-Neto J Olshan AF Purdue M Rudnai P Schwartz SM Smith E Sturgis EM Szeszenia-Dabrowska N Talamini R Wei QY Winn DM Shangina O Pilarska A Zhang ZF Ferro G Berthiller J Boffetta P (2009) Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 18:541-550
309. Shinozaki R Inoue S Choi K-S Tatsuno T (1999) Association of benzo[*a*]pyrene-diol-epoxide-deoxyribonucleic acid (BPDE-DNA) adduct level with aging in male smokers and nonsmokers. *Arch.Environ.Health* 54:79-85
310. Heppel C Heling A-K Schütte-Borkovec K Stadlhuber R Stein HJ Richter E (2008) Effects of smoking, alcohol abusud and chronic reflux on 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in the lower esophagus. *Proc.Am.Ass.Cancer Res.* 49:A1884
311. 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
312. 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
313. Anon (2007) Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a global perspective. Washington DC, AICR

314. Möller P Vogel U Pedersen A Dragsted LO Sandström B Loft S (2003) No effect of 600 grams fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy nonsmokers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 12:1016-1022
315. Young JF Dragsted LO Haraldsdóttir J Daneshvar B Kall MA Loft S Nilsson L Nielsen SE Mayer B Skibsted LH Huynh-Ba T Hermetter A Sandström B (2002) Green tea extract only affects markers of oxidative status postprandially: lasting antioxidant effect of flavonoid-free diet. *Br.J.Nutr.* 87:343-355
316. Weisburger JH (2001) Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Exp.Biol.Med.* 226:891-897
317. Dempsey D Tutka P Jacob P Allen F Schoedel K Tyndale RF Benowitz NL (2004) Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clin.Pharmacol.Ther.* 76:64-72

## Anhang

Tab. A-1 Tierstudie Vorversuch

Gruppe	Leber			Lunge		
	c DNA [mg/mL]	Gehalt DNA [mg]	HPB [fmol/mg]	c DNA [mg/mL]	Gehalt DNA [mg]	HPB [fmol/mg]
<b>Kontrolle</b>						
Ratte 1	0,4665	0,233	0	1,6498	0,660	0
Ratte 2	0,5221	0,261	0	1,856	0,742	0
Ratte 3	0,7814	0,391	0	1,419	0,566	0
Ratte 4	0,6907	0,345	0	0,9315	0,466	0
<b>1 ppm NNK, 2 Wochen</b>						
Ratte 1	0,3618	0,181	0	0,8503	0,425	456,14
Ratte 2	0,2515	0,126	0	0,8468	0,423	609,93
Ratte 3	0,3223	0,161	1590,87	0,9904	0,495	693,14
Ratte 4	0,5886	0,294	710,85	0,8264	0,413	677,94
<b>1 ppm NNK, 3 Wochen</b>						
Ratte 1	0,5805	0,290	0	0,8875	0,444	0
Ratte 2	0,5227	0,261	1010,09	0,8260	0,413	0
Ratte 3	0,6449	0,322	711,34	0,8992	0,450	330,14
Ratte 4	0,6771	0,339	2191,91	0,8715	0,436	927,19
<b>1 ppm NNK, 4 Wochen</b>						
Ratte 1	0,327	0,164	1113,99	0,9585	0,479	1093,77
Ratte 2	0,6046	0,302	2529,63	0,9661	0,386	1097,25
Ratte 3	1,0495	0,525	117,03	0,9456	0,473	1003,10
Ratte 4	0,4059	0,203	3313,88	1,1093	0,440	300,46
<b>3 ppm NNK, 2 Wochen</b>						
Ratte 1	0,2939	0,147	0	1,0901	0,327	408,72
Ratte 2	0,6436	0,322	445,17	0,6169	0,308	1848,77
Ratte 3	0,3816	0,191	3737,72	1,5678	0,470	1737,58
Ratte 4	0,4607	0,230	1713,22	1,0991	0,329	1896,77
<b>3 ppm NNK, 3 Wochen</b>						
Ratte 1	0,3773	0,188	197,18	0,5838	0,291	8210,48
Ratte 2	0,4377	0,219	1261,75	0,5817	0,290	1519,05
Ratte 3	0,3311	0,165	7879,91	1,1445	0,343	1548,52
Ratte 4	0,6100	0,305	951,87	1,6047	0,802	849,68
<b>3 ppm NNK, 4 Wochen</b>						
Ratte 1	0,4472	0,224	307,88	0,9693	0,387	2564,350
Ratte 2	0,1923	0,096	2316,05	1,5638	0,600	1902,63
Ratte 3	0,5184	0,259	2508,43	0,8249	0,412	1520,75
Ratte 4	0,2241	0,112	2347,13	0,9060	0,360	697,36
<b>5 ppm NNK, 2 Wochen</b>						
Ratte 1	0,1872	0,094	147,93	0,8862	0,354	155,02
Ratte 2	0,6699	0,335	156,71	1,0466	0,419	0
Ratte 3	0,2596	0,130	56,52	1,032	0,413	380,47
Ratte 4	0,3468	0,173	298,86	1,0699	0,428	305,54
<b>5 ppm NNK, 3 Wochen</b>						
Ratte 1	0,5800	0,290	381,34	0,6767	0,338	1156,83
Ratte 2	0,2671	0,133	2678,30	0,8705	0,340	2503,38
Ratte 3	0,4461	0,223	3043,79	0,4565	0,228	2164,25
Ratte 4	0,7143	0,357	942,28	0,7645	0,382	1232,31
<b>5 ppm NNK, 4 Wochen</b>						
Ratte 1	0,3609	0,180	4150,80	0,8453	0,423	955,56
Ratte 2	0,3752	0,188	3439,88	1,6345	0,650	1504,89
Ratte 3	0,5619	0,281	371,81	1,4581	0,580	2682,23
Ratte 4	0,2885	0,144	6816,67	1,5982	0,630	901,34

Tab. A-2 Tierstudie Interaktion NNK und Ethanol

Gruppe	Leber				Lunge			
	Einwaage [mg]	c DNA [mg/mL]	Gehalt DNA [mg]	HPB [fmol/mg]	Einwaage [mg]	c DNA [mg/mL]	Gehalt DNA [mg]	HPB [fmol/mg]
<b>I</b>								
Ratte 1	169,2	0,52290	0,26145	0	110,3	0,44720	0,22360	0
Ratte 2	169,0	0,74235	0,37118	0	118,9	0,87780	0,43890	0
Ratte 3	163,0	0,48825	0,24413	0	110,3	0,95550	0,47775	0
Ratte 4	174,2	0,61425	0,30713	0	109,6	0,65415	0,32708	0
Ratte 5	175,3	0,83685	0,41843	0	103,1	0,48615	0,24308	0
Ratte 6	178,9	0,70770	0,35385	0	105,4	0,60165	0,30083	0
Ratte 7	182,8	0,82110	0,41055	0	107,8	1,43955	0,71978	0
Ratte 8	162,6	0,42105	0,21053	0	108,3	0,38010	0,19005	0
Ratte 9	164,3	0,86310	0,43155	0	112,8	1,26210	0,63105	0
<b>II</b>								
Ratte 1	111,7	0,23760	0,11880	1362,16	112,4	1,02795	0,51398	1263,91
Ratte 2	115,8	0,41910	0,20955	704,20	112,7	0,60585	0,30293	959,84
Ratte 3	114,9	0,16610	0,08305	646,69	121,7	0,18865	0,09433	1607,93
Ratte 4	152,0	1,52880	0,76440	497,23	123,3	0,51660	0,25830	1897,28
Ratte 5	112,4	0,55125	0,27563	232,33	111,3	1,08990	0,54495	1795,34
Ratte 6	114,2	0,32550	0,16275	1247,20	117,4	0,23310	0,11655	1050,70
Ratte 7	157,1	1,02900	0,51450	582,59	120,1	0,68040	0,34020	2075,92
Ratte 8	122,9	0,59325	0,29663	559,65	114,1	0,24360	0,12180	1502,11
Ratte 9	166,9	0,82110	0,41055	1384,74	127,6	0,26250	0,13125	1899,65
<b>III</b>								
Ratte 1	156,5	1,11510	0,55755	1521,97	159,1	1,02410	0,51205	2027,01
Ratte 2	154,2	1,13400	0,56700	1001,37	167,8	0,30421	0,15211	4352,40
Ratte 3	161,6	0,78956	0,39478	2095,05	168,5	0,95211	0,47606	2797,98
Ratte 4	166,4	0,95792	0,47896	1181,16	163,0	0,88361	0,44181	2809,85
Ratte 5	177,0	0,78491	0,39246	2065,87	178,1	1,39566	0,69783	2997,32
Ratte 6	165,2	0,91031	0,45516	1265,91	173,0	1,69058	0,84529	2607,24
Ratte 7	193,1	0,97069	0,48535	1212,45	179,3	1,61460	0,80730	2988,85
Ratte 8	193,8	0,97766	0,48883	1274,68	169,7	1,56260	0,78130	2981,28
Ratte 9	166,3	1,33992	0,66996	1152,71	171,4	0,73710	0,36855	2677,46
<b>IV</b>								
Ratte 1	156,1	0,77595	0,38798	0	149,5	0,52920	0,26460	0
Ratte 2	151,8	1,13715	0,56858	0	156,3	0,49140	0,24570	0
Ratte 3	193,1	0,87885	0,43943	0	164,5	0,45045	0,22523	0
Ratte 4	163,8	0,53655	0,26828	0	152,8	0,32025	0,16013	0
Ratte 5	174,8	1,12140	0,56070	0	151,7	1,22115	0,61058	0
Ratte 6	170,6	1,01955	0,50978	0	176,6	0,98595	0,49298	0
Ratte 7	184,2	1,20330	0,60165	0	169,2	1,43010	0,71505	0
Ratte 8	161,9	0,74865	0,37433	0	162,0	0,91455	0,45728	0
Ratte 9	181,5	0,84840	0,42420	0	191,1	0,99120	0,49560	0
<b>V</b>								
Ratte 1	170,3	0,97230	0,48615	404,49	210,4	2,28165	1,14083	1949,22
Ratte 2	179,6	0,80535	0,40268	813,04	171,9	1,24005	0,62003	1677,60
Ratte 3	189,2	0,87885	0,43943	0	190,1	1,19490	0,59745	1193,69
Ratte 4	166,0	0,93870	0,46935	397,71	173,7	2,23450	1,11725	1726,82
Ratte 5	172,7	0,79800	0,39900	436,21	163,2	1,95775	0,97888	2530,54
Ratte 6	195,3	1,12140	0,56070	425,98	184,0	1,38705	0,69353	2635,93
Ratte 7	190,3	0,83265	0,41633	421,26	190,7	1,25055	0,62528	1141,32
Ratte 8	199,5	1,18545	0,59273	641,31	179,2	1,56415	0,78208	1414,82
Ratte 9	184,3	1,14450	0,57225	707,96	171,8	1,31355	0,65678	1293,99
<b>VI</b>								
Ratte 1	170,6	1,54330	0,77165	494,93	190,3	0,91560	0,45780	3275,06
Ratte 2	176,2	0,59535	0,29768	1148,35	191,0	0,26355	0,13178	2951,26
Ratte 3	179,6	0,81900	0,40950	710,01	182,0	0,90930	0,45465	2777,82
Ratte 4	194,1	1,33665	0,66833	716,37	177,0	0,98385	0,49193	2914,57
Ratte 5	183,0	1,03320	0,51660	760,14	168,2	0,76020	0,38010	2885,21
Ratte 6	194,9	1,25265	0,62633	699,06	168,3	0,74340	0,37170	3093,21
Ratte 7	174,5	2,01720	1,00860	837,92	190,2	0,99855	0,49928	3230,87
Ratte 8	192,4	1,02900	0,51450	738,71	180,0	0,67515	0,33758	3216,58
Ratte 9	170,3	0,76440	0,38220	1014,75	176,3	0,77805	0,38903	3127,11

Tab. A-3 Tierstudie 2, Chemoprävention

Gruppe	Leber				Lunge			
	Einwaage [mg]	c DNA [mg/mL]	Gehalt DNA [mg]	HPB [fmol/mg]	Einwaage [mg]	c DNA [mg/mL]	Gehalt DNA [mg]	HPB [fmol/mg]
<b>I</b>								
Ratte 1	131,2	0,30960	0,15480	284,45	131,9	0,18195	0,09098	351,47
Ratte 2	116,3	0,41137	0,20569	184,99	135,0	0,57015	0,28508	231,30
Ratte 3	114,6	0,75178	0,37589	78,45	139,9	0,29505	0,14753	390,21
Ratte 4	125,1	0,51672	0,25836	167,74	134,2	0,31462	0,15731	345,05
Ratte 5	120,4	1,40037	0,70019	54,42	130,6	0,75465	0,37733	206,79
Ratte 6	125,6	0,50525	0,25263	157,81	135,4	0,51098	0,25549	284,82
Ratte 7	117,5	0,27663	0,13832	262,84	129,6	0,60845	0,30423	223,80
Ratte 8	126,3	0,83348	0,41674	101,82	136,1	0,45652	0,22826	318,53
Ratte 9	116,1	0,72527	0,36264	96,86	121,2	0,62637	0,31319	389,18
<b>II</b>								
Ratte 1	125,7	0,80912	0,40456	349,41	122,5	0,17272	0,08636	1532,26
Ratte 2	132,3	0,45293	0,22647	743,61	123,6	0,11108	0,05554	2054,55
Ratte 3	124,3	0,39202	0,19601	1010,51	132,8	0,16483	0,08242	1766,53
Ratte 4	116,5	0,49378	0,24689	475,26	120,4	0,07382	0,03691	1820,16
Ratte 5	115,2	0,37195	0,18598	779,93	137,3	0,80123	0,40062	1475,78
Ratte 6	133,2	0,64142	0,32071	924,25	126,7	0,27878	0,13939	1419,79
Ratte 7	121,9	0,70735	0,35368	609,59	135,4	0,25657	0,12829	1389,46
Ratte 8	137,3	1,29430	0,64715	534,28	124,0	0,16913	0,08457	1465,49
Ratte 9	122,0	0,68585	0,34293	626,54	128,7	0,14692	0,07346	1799,16
<b>III</b>								
Ratte 1	133,2	0,36048	0,18024	523,57	118,3	0,09173	0,04587	1959,88
Ratte 2	130,2	0,27305	0,13653	689,55	124,5	0,13115	0,06558	1365,42
Ratte 3	132,8	0,51887	0,25944	610,62	127,9	0,12112	0,06056	1407,80
Ratte 4	128,9	0,24868	0,12434	751,24	129,3	0,11968	0,05984	1970,89
Ratte 5	123,5	0,46798	0,23399	599,05	145,5	0,18132	0,09066	1193,38
Ratte 6	138,3	0,36622	0,18311	640,82	133,3	0,14405	0,07203	1543,58
Ratte 7	147,1	0,94743	0,47372	304,37	133,6	0,11180	0,05590	1841,47
Ratte 8	128,4	0,60773	0,30387	276,52	121,4	0,20425	0,10213	1004,88
Ratte 9	131,8	0,79192	0,39596	341,30	135,8	0,16842	0,08421	1661,44
<b>IV</b>								
Ratte 1	156,1	0,77595	0,38798	390,15	130,4	0,18920	0,09460	1337,09
Ratte 2	151,8	1,13715	0,56858	389,12	117,8	0,18777	0,09389	1477,35
Ratte 3	193,1	0,87885	0,43943	383,91	110,2	0,13975	0,06988	1541,58
Ratte 4	163,8	0,53655	0,26828	330,76	0,0	0,00000	0,00000	n.d.
Ratte 5	174,8	1,12140	0,56070	341,42	117,2	0,25513	0,12757	1450,78
Ratte 6	170,6	1,01955	0,50978	340,45	118,7	0,15480	0,07740	1324,87
Ratte 7	184,2	1,20330	0,60165	581,13	130,5	0,14548	0,07274	1533,53
Ratte 8	161,9	0,74865	0,37433	294,80	130,5	0,18777	0,09389	1576,51
Ratte 9	181,5	0,84840	0,42420	531,68	111,0	0,16627	0,08314	1280,13
<b>V</b>								
Ratte 1	115,1	0,40707	0,20354	388,94	110,6	0,15695	0,07848	1190,06
Ratte 2	116,7	0,33182	0,16591	388,51	123,6	0,09962	0,04981	1282,19
Ratte 3	114,2	0,30602	0,15301	492,88	119,2	0,07040	0,03520	1428,02
Ratte 4	136,0	0,31318	0,15659	486,94	126,4	0,22790	0,11395	1052,10
Ratte 5	119,0	0,35977	0,17989	512,55	117,7	0,34973	0,17487	1356,95
Ratte 6	118,2	0,54467	0,27234	503,77	137,1	0,21285	0,10643	1249,62
Ratte 7	126,0	0,50668	0,25334	537,67	111,8	0,21213	0,10607	1343,21
Ratte 8	117,3	0,32107	0,16054	413,94	126,7	0,15193	0,07597	1149,50
Ratte 9	132,3	0,60487	0,30244	314,84	123,1	0,34113	0,17057	1112,63
<b>VI</b>								
Ratte 1	121,2	0,62493	0,31247	0,00	135,6	0,19422	0,09711	0,00
Ratte 2	123,6	0,54538	0,27269	0,00	138,7	0,25083	0,12542	0,00
Ratte 3	131,3	0,59698	0,29849	0,00	128,6	0,18060	0,09030	0,00
Ratte 4	120,0	0,68585	0,34293	0,00	119,6	0,24725	0,12363	0,00
Ratte 5	115,4	0,56187	0,28094	0,00	140,3	0,17702	0,08851	0,00
Ratte 6	118,9	0,51385	0,25693	0,00	115,2	0,22073	0,11037	0,00
Ratte 7	122,0	0,70162	0,35081	0,00	119,2	0,22360	0,11180	0,00
Ratte 8	134,3	0,46655	0,23328	0,00	123,8	0,18132	0,09066	0,00
Ratte 9	134,0	0,64357	0,32179	0,00	126,7	0,26947	0,13474	0,00

Tab. A-3 Tierstudie 2, Chemoprävention, Fortsetzung 1

Gruppe	Leber				Lunge			
	Einwaage [mg]	c DNA [mg/mL]	Gehalt DNA [mg]	HPB [fmol/mg]	Einwaage [mg]	c DNA [mg/mL]	Gehalt DNA [mg]	HPB [fmol/mg]
<b>VII</b>								
Ratte 1	140,5	0,49880	0,24940	0,00	123,3	0,33970	0,16985	0,00
Ratte 2	114,4	0,35618	0,17809	0,00	138,0	0,18418	0,09209	0,00
Ratte 3	135,6	0,09930	0,04965	0,00	124,6	0,41853	0,20927	0,00
Ratte 4	116,3	0,29383	0,14692	0,00	122,0	0,61992	0,30996	0,00
Ratte 5	127,5	0,37840	0,18920	0,00	128,1	0,19637	0,09819	0,00
Ratte 6	113,8	0,33182	0,16591	0,00	129,3	0,09818	0,04909	0,00
Ratte 7	122,5	0,28237	0,14119	0,00	122,9	0,14405	0,07203	0,00
Ratte 8	128,0	0,38127	0,19064	0,00	114,2	0,24438	0,12219	0,00
Ratte 9	112,9	0,30745	0,15373	0,00	139,5	0,49952	0,24976	0,00
<b>VIII</b>								
Ratte 1	118,9	0,56760	0,28380	0,00	111,1	0,19170	0,09585	0,00
Ratte 2	139,1	0,40850	0,20425	0,00	123,2	0,41525	0,20763	0,00
Ratte 3	134,5	0,05350	0,02675	0,00	118,6	0,10800	0,05400	0,00
Ratte 4	118,9	0,38557	0,19279	0,00	126,4	0,37400	0,18700	0,00
Ratte 5	125,4	0,72813	0,36407	0,00	126,4	0,39215	0,19608	0,00
Ratte 6	111,8	0,49593	0,24797	0,00	128,2	0,61985	0,30993	0,00
Ratte 7	127,3	0,45938	0,22969	0,00	123,1	0,20845	0,10423	0,00
Ratte 8	140,2	0,36263	0,18132	0,00	128,2	0,38115	0,19058	0,00
Ratte 9	133,2	0,55470	0,27735	0,00	121,9	0,16995	0,08498	0,00
<b>IX</b>								
Ratte 1	123,1	0,33540	0,16770	0,00	129,2	0,12757	0,06379	0,00
Ratte 2	136,9	0,70162	0,35081	0,00	122,2	0,26445	0,13223	0,00
Ratte 3	127,5	0,09330	0,04665	0,00	123,1	0,21070	0,10535	0,00
Ratte 4	123,5	0,53965	0,26983	0,00	125,5	0,28595	0,14298	0,00
Ratte 5	115,7	0,57333	0,28667	0,00	132,1	0,74390	0,37195	0,00
Ratte 6	126,2	0,46727	0,23364	0,00	0,0	0,00000	0,00000	0,00
Ratte 7	110,2	0,59842	0,29921	0,00	135,4	0,17128	0,08564	0,00
Ratte 8	128,8	0,53463	0,26732	0,00	132,4	0,21285	0,10643	0,00
Ratte 9	127,6	0,79693	0,39847	0,00	135,8	0,29743	0,14872	0,00
<b>X</b>								
Ratte 1	130,9	0,26087	0,13044	257,27	116,2	0,14118	0,07059	646,51
Ratte 2	114,9	0,21858	0,10929	239,72	127,7	0,13975	0,06988	282,52
Ratte 3	133,7	0,17128	0,08564	245,77	137,1	0,09162	0,04581	528,11
Ratte 4	118,6	0,13330	0,06665	265,45	130,5	0,21070	0,10535	424,53
Ratte 5	117,2	0,43287	0,21644	190,93	118,9	0,18418	0,09209	439,42
Ratte 6	131,2	0,14835	0,07418	240,20	139,8	0,38987	0,19494	505,89
Ratte 7	125,0	0,22432	0,11216	224,16	122,4	0,14118	0,07059	666,79
Ratte 8	116,2	0,26660	0,13330	268,59	133,2	0,10678	0,05339	856,93
Ratte 9	122,1	0,24367	0,12184	257,15	114,3	0,15767	0,07884	499,17
<b>XI</b>								
Ratte 1	119,9	0,22432	0,11216	399,35	117,1	0,13473	0,06737	701,78
Ratte 2	123,6	0,21930	0,10965	412,85	134,0	0,10750	0,05375	820,07
Ratte 3	136,7	0,18490	0,09245	451,95	136,2	0,40993	0,20497	914,20
Ratte 4	124,1	0,56187	0,28094	197,16	127,1	0,78475	0,39238	949,55
Ratte 5	122,8	0,55900	0,27950	392,99	137,0	0,86932	0,43466	979,09
Ratte 6	129,7	0,44003	0,22002	289,36	131,5	0,07525	0,03763	803,30
Ratte 7	118,7	0,30673	0,15337	370,23	124,7	0,14763	0,07382	n.d.
Ratte 8	138,2	0,47013	0,23507	263,99	119,6	0,09890	0,04945	636,52
Ratte 9	128,2	0,38055	0,19028	325,38	137,9	0,20425	0,10213	705,29
<b>XII</b>								
Ratte 1	138,9	0,52890	0,26445	107,39	127,2	0,97610	0,48805	1664,89
Ratte 2	122,6	0,49880	0,24940	179,67	129,2	0,11252	0,05626	1557,68
Ratte 3	119,1	0,63425	0,31713	147,64	131,6	0,29455	0,14728	1421,66
Ratte 4	112,7	0,32895	0,16448	157,15	121,1	0,19135	0,09568	1334,31
Ratte 5	111,2	0,46512	0,23256	187,23	121,9	0,90157	0,45079	1717,13
Ratte 6	121,5	0,95245	0,47623	173,13	110,1	0,23363	0,11682	1146,05
Ratte 7	124,3	0,82632	0,41316	n.d.	132,3	0,24152	0,12076	1297,75
Ratte 8	119,1	0,42283	0,21142	n.d.	112,0	0,29670	0,14835	1958,61
Ratte 9	122,3	0,34543	0,17272	147,10	133,1	0,19278	0,09639	1399,02



Tab. A-3 Tierstudie 2, Chemoprävention, Fortsetzung 2

Gruppe	Leber				Lunge			
	Einwaage [mg]	c DNA [mg/mL]	Gehalt DNA [mg]	HPB [fmol/mg]	Einwaage [mg]	c DNA [mg/mL]	Gehalt DNA [mg]	HPB [fmol/mg]
<b>XIII</b>								
Ratte 1	137,8	0,33468	0,16734	272,10	133,1	0,09530	0,04765	563,88
Ratte 2	124,0	0,17773	0,08887	295,35	131,9	0,06310	0,03155	480,95
Ratte 3	112,3	0,51242	0,25621	254,19	135,8	0,31605	0,15803	502,56
Ratte 4	119,3	0,36335	0,18168	250,98	122,4	0,05630	0,02815	486,40
Ratte 5	127,4	0,40993	0,20497	217,56	128,3	0,46942	0,23471	485,01
Ratte 6	139,1	0,80338	0,40169	169,86	129,8	0,18425	0,09213	380,28
Ratte 7	121,0	0,48447	0,24224	234,57	134,0	0,35905	0,17953	575,99
Ratte 8	129,8	0,33397	0,16699	279,25	124,9	0,15408	0,07704	584,59
Ratte 9	128,8	0,42570	0,21285	181,60	114,8	0,22002	0,11001	558,31

Tab. A-4 Humanstudie

Nr.	Alter	Geschlecht	Rauchstatus	Anzahl /d	Zeitraum [a]	Beigebrauch	Anzahl /d	Zeitraum [a]	Ex-raucher	seit x a
1	39	männlich	Zigarette	20	15	nein	0	0	nein	0
2	30	weiblich	Zigarette	20	7	nein	0	0	nein	0
3	60	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
4	30	männlich	Snus	20	10	Zigarette	2	10	nein	0
5	19	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
6	16	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
7	48	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
8	26	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
9	30	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
10	38	männlich	Zigarette	10	10	nein	0	0	nein	0
11	29	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
12	70	weiblich	Zigarette	5	25	nein	0	0	nein	0
13	50	männlich	Zigarre	1	15	Zigarette	5	10	nein	0
14	52	männlich	Zigarre	10	10	nein	0	0	nein	0
15	30	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
16	35	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
17	40	männlich	Zigarette	15	19	nein	0	0	nein	0
18	34	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
19	29	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	ja	2,5
20	61	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
21	85	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
22	29	männlich	Zigarette	20	9	nein	0	0	nein	0
23	38	weiblich	Zigarette	20	7	nein	0	0	nein	0
24	22	weiblich	Zigarette	10	4	nein	0	0	nein	0
25	26	männlich	Zigarette	20	11	nein	0	0	nein	0
27	32	weiblich	Zigarette	20	15	nein	0	0	nein	0
29	30	weiblich	Zigarette	15	8	nein	0	0	nein	0
30	37	weiblich	Zigarette	18	18	nein	0	0	nein	0
32	59	männlich	Zigarette	20	39	nein	0	0	nein	0
33	36	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
34	30	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
35	54	weiblich	Zigarette	18	32	nein	0	0	nein	0
36	43	weiblich	Zigarette	30	26	nein	0	0	nein	0
37	33	weiblich	Zigarette	2	18	nein	0	0	nein	0
38	25	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	ja	0,5
39	31	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
40	26	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
41	45	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
42	24	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
43	59	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0
44	54	männlich	Zigarette	10	35	nein	0	0	nein	0
45	59	weiblich	Zigarette	15	20	nein	0	0	nein	0
46	53	weiblich	Zigarette	10	36	nein	0	0	nein	0
47	33	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	nein	0

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 1

Nr.	Alter	Geschlecht	Rauchstatus	Anzahl /d	Zeitraum [a]	Beige- brauch	Anzahl /d	Zeitraum [a]	Ex- raucher	seit x a
48	25	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
49	31	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	1	0,5
50	59	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	1	2
51	30	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
52	54	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
53	34	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
54	43	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
55	30	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
56	25	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	1	3
57	53	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
58	67	männlich	Zigarette	40	50	nein	0	0	0	0
59	72	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
60	33	männlich	Zigarette	3	15	nein	0	0	0	0
61	30	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
62	35	männlich	Zigarette	12	20	nein	0	0	0	0
63	28	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
64	30	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
65	54	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
66	30	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
67	35	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
68	31	männlich	Snus	6	10	nein	0	0	0	0
69	57	weiblich	Zigarette	25	35	nein	0	0	0	0
70	82	weiblich	Zigarette	20	60	nein	0	0	0	0
72	34	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
77	57	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
78	43	weiblich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
79	59	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
80	24	männlich	Zigarette	15	6	nein	0	0	0	0
81	28	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
82	27	männlich	Zigarette	10	7	nein	0	0	0	0
83	47	männlich	Nichtraucher	0	0	nein	0	0	0	0
93	50	männlich	Zigarillo	15	34	nein	0	0	0	0
101	22	männlich	Snus	12	2	Zigarette	10	7	0	0
102	41	männlich	Snus	50	32	Zigarette	10	6	0	0
103	66	männlich	Snus	15	40	nein	0	0	0	0
104	59	männlich	Snus	25	35	nein	0	0	0	0
105	36	männlich	Snus	6	22	nein	0	0	0	0
106	65	männlich	Snus	30	28	nein	0	0	0	0
107	79	männlich	Snus	7	59	nein	0	0	0	0
108	69	männlich	Snus	7	45	nein	0	0	0	0
109	42	männlich	Snus	10	31	nein	0	0	0	0
110	52	männlich	Snus	20	25	nein	0	0	0	0
111	54	männlich	Snus	16	27	nein	0	0	0	0
112	54	männlich	Snus	10	40	nein	0	0	0	0

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 2

Nr.	Alter	Geschlecht	Rauchstatus	Anzahl /d	Zeitraum [a]	Beige- brauch	Anzahl /d	Zeitraum [a]	Ex- raucher	seit x a
113	50	männlich	Snus	12	35	nein	0	0	0	0
114	60	männlich	Snus	10	40	nein	0	0	0	0
115	68	männlich	Snus	10	50	nein	0	0	0	0
116	50	weiblich	Snus	15	20	nein	0	0	0	0
117	21	männlich	Snus	6	2	Zigarette		15	0	0
118	36	männlich	Snus	16	24	nein	0	0	0	0
119	21	männlich	Snus	12	6	nein	0	0	0	0
120	35	männlich	Snus	10	15	nein	0	0	0	0
121	39	männlich	Snus	8	26	nein	0	0	0	0
122	63	männlich	Snus	2	45	nein	0	0	0	0
123	44	männlich	Snus	8	14	nein	0	0	0	0
124	36	weiblich	Snus	15	9	nein	0	0	0	0
125	61	männlich	Snus	30	37	nein	0	0	0	0
126	63	männlich	Snus	24	46	nein	0	0	0	0
127	48	männlich	Snus	24	15	Zigarette	10	20	0	0
128	39	weiblich	Snus	16	20	Kautabak	1	5	0	0
129	55	weiblich	Snus	10	10	nein	0	0	0	0
130	26	weiblich	Snus	10	8	Zigarette	2	7	0	0
131	43	männlich	Snus	10	10	nein	0	0	0	0
132	51	männlich	Zigarette	20	20	nein	0	0	0	0
133	37	männlich	Zigarette	20	15	nein	0	0	0	0
134	48	männlich	Zigarette	20	25	nein	0	0	0	0
135	37	männlich	Zigarette	40	20	nein	0	0	0	0
136	52	männlich	Zigarette	25	30	nein	0	0	0	0
137	24	männlich	Zigarette	15	5	nein	0	0	0	0
138	27	männlich	Zigarette	20	8	nein	0	0	0	0
139	24	männlich	Zigarette	15	30	nein	0	0	0	0
140	25	männlich	Zigarette	15	2	nein	0	0	0	0
141	53	männlich	Zigarette	20	30	nein	0	0	0	0
142	59	männlich	Zigarette	25	30	nein	0	0	0	0
143	22	männlich	Zigarette	20	5	nein	0	0	0	0
144	27	männlich	Zigarette	25	10	nein	0	0	0	0
145	50	männlich	Zigarette	20	30	nein	0	0	0	0
146	23	männlich	Zigarette	15	10	nein	0	0	0	0
147	42	männlich	Zigarette	20	27	nein	0	0	0	0
148	53	männlich	Zigarette	40	30	nein	0	0	0	0
149	33	männlich	Zigarette	17	15	nein	0	0	0	0
150	44	männlich	Zigarette	20	23	nein	0	0	0	0
151	58	männlich	Zigarette	20	16	nein	0	0	0	0
153	35	männlich	Zigarette	60	15	nein	0	0	0	0
154	25	männlich	Zigarette	20	2	nein	0	0	0	0
156	20	männlich	Zigarette	15	7	nein	0	0	0	0
157	54	männlich	Zigarette	16	38	nein	0	0	0	0
158	25	männlich	Zigarette	10	10	nein	0	0	0	0

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 3

Nr.	Alter	Geschlecht	Rauchstatus	Anzahl /d	Zeitraum [a]	Beige- brauch	Anzahl /d	Zeitraum [a]	Ex- raucher	seit x a
159	22	männlich	Zigarette	10	2	nein	0	0	0	0
160	42	männlich	Zigarette	15	25	nein	0	0	0	0
161	30	männlich	Zigarette	1	2	nein	0	0	0	0
162	51	männlich	Zigarette	10	20	nein	0	0	0	0
163	37	männlich	Zigarette	20	20	nein	0	0	0	0
164	27	männlich	Zigarette	20	8	nein	0	0	0	0
165	64	männlich	Zigarette	20	45	nein	0	0	0	0
166	26	männlich	Zigarette	12	8	nein	0	0	0	0
167	33	männlich	Zigarette	15	15	nein	0	0	0	0
168	28	männlich	Zigarette	30	10	nein	0	0	0	0
169	23	männlich	Zigarette	15		nein	0	0	0	0
170	49	männlich	Zigarette	35	30	nein	0	0	0	0
171	37	männlich	Zigarette	15	3	nein	0	0	0	0
172	21	männlich	Zigarette	15	5	nein	0	0	0	0
173	42	männlich	Zigarette	25	25	nein	0	0	0	0
174	25	männlich	Zigarette	15	7	nein	0	0	0	0
175	50	männlich	Zigarette	30	30	nein	0	0	0	0
176	71	männlich	Zigarette	15	18	nein	0	0	0	0
177	23	männlich	Zigarette	20	8	nein	0	0	0	0
178	59	männlich	Zigarette	30	40	nein	0	0	0	0
179	19	männlich	Zigarette	15	7	nein	0	0	0	0
180	41	männlich	Zigarette	30	20	nein	0	0	0	0
181	38	männlich	Zigarette	20	20	nein	0	0	0	0
182	35	männlich	Zigarette	20	15	nein	0	0	0	0
183	48	männlich	Zigarette	20	25	nein	0	0	0	0
184	23	männlich	Zigarette	15	3	nein	0	0	0	0
185	56	männlich	Zigarette	25	35	nein	0	0	0	0
186	58	männlich	Zigarette	20	30	nein	0	0	0	0
187	51	männlich	Zigarette	25	18	nein	0	0	0	0
188	27	männlich	Zigarette	16	11	nein	0	0	0	0
189	23	männlich	Zigarette	18	4	nein	0	0	0	0
190	24	männlich	Zigarette	20	8	nein	0	0	0	0
191	31	männlich	Zigarette	30	10	nein	0	0	0	0
192	47	männlich	Zigarette	20	27	nein	0	0	0	0
193	23	männlich	Zigarette	20	11	nein	0	0	0	0
194	25	männlich	Zigarette	20	9	nein	0	0	0	0
195	21	männlich	Zigarette	20	4	nein	0	0	0	0
196	64	männlich	Zigarette	20	40	nein	0	0	0	0
197	47	männlich	Zigarette	20	20	nein	0	0	0	0
198	59	männlich	Zigarette	30	40	nein	0	0	0	0
199	45	männlich	Zigarette	20	20	nein	0	0	0	0

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 4

Nr.	Bil- dung	Hauptmahlzeiten	Snack	salzige Speisen	scharfe Speisen	Tempe- ratur	Geschwindi- gkeit
1	FH	alles	nein	selten	selten	heiß	normal
2	Uni	Mittag+Abend	nein	selten	selten	heiß	normal
3	Uni	Frühstück+Abend	nein	selten	gelegentlich	heiß	normal
4	Uni	alles	ja	gelegentlich	gelegentlich	warm	hastig
5	Lehre	alles	ja	gelegentlich	selten	warm	normal
6	Lehre	alles	ja	gelegentlich	selten	warm	normal
7	Lehre	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
8	Uni	alles	nein	selten	gelegentlich	heiß	normal
9	Uni	alles	ja	häufig	gelegentlich	warm	normal
10	Uni	alles	ja	selten	selten	heiß	normal
11	Uni	alles	ja	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
12	Lehre	Frühstück+Abend	nein	häufig	häufig	warm	normal
13	Uni	alles	nein	selten	gelegentlich	heiß	normal
14	Lehre	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	heiß	normal
15	Uni	Mittag+Abend	ja	häufig	häufig	heiß	normal
16	Uni	Mittag	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
17	Lehre	Mittag+Abend	nein	gelegentlich	gelegentlich	heiß	normal
18	Uni	alles	ja	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
19	Lehre	alles	ja	gelegentlich	gelegentlich	heiß	langsam
20	Uni	alles	nein	selten	selten	warm	hastig
21	Uni	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	heiß	langsam
22	Uni	Abendessen	ja	häufig	gelegentlich	heiß	normal
23	FH	alles	ja	gelegentlich	selten	warm	normal
24	Lehre	Mittag+Abend	ja	gelegentlich	gelegentlich	warm	hastig
25	Lehre	Mittag+Abend	ja	gelegentlich	häufig	heiß	langsam
27	Uni	Frühstück+Abend	ja	selten	selten	kalt	normal
29	Uni	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	kalt	normal
30	Uni	alles	nein	selten	selten	warm	normal
32	Lehre	alles	nein	selten	selten	warm	normal
33	Uni	Frühstück+Abend	ja	selten	selten	heiß	hastig
34	Uni	alles	ja	gelegentlich	gelegentlich	heiß	normal
35	Lehre	alles	nein	selten	selten	warm	normal
36	Lehre	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
37	Uni	alles	nein	selten	gelegentlich	warm	normal
38	Uni	alles	ja	selten	selten	warm	normal
39	FH	alles	ja	gelegentlich	selten	warm	normal
40	Uni	alles	ja	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
41	Uni	alles	nein	gelegentlich	häufig	heiß	normal
42	Lehre	alles	nein	selten	häufig	heiß	normal
43	Lehre	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
44	Uni	alles	ja	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
45	Lehre	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
46	Lehre	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
47	FH	Frühstück+Mittag	nein	selten	selten	warm	hastig

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 5

Nr.	Ausbildung	Hauptmahlzeiten	Snack	salzige Speisen	scharfe Speisen	Temperatur	Geschwindigkeit
48	Uni	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
49	FH	alles	ja	häufig	gelegentlich	warm	normal
50	Lehre	alles	ja	gelegentlich	selten	warm	normal
51	Uni	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
52	FH	alles	nein	selten	selten	warm	normal
53	Uni	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	hastig
54	Lehre	Frühstück+Abend	ja	selten	gelegentlich	heiß	hastig
55	FH	alles	nein	selten	selten	heiß	normal
56	Uni	alles	nein	selten	gelegentlich	heiß	normal
57	Lehre	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	heiß	normal
58	Lehre	alles	nein	häufig	häufig	warm	normal
59	Lehre	Mittag	nein	selten	selten	heiß	normal
60	Uni	alles	ja	selten	selten	warm	normal
61	FH	alles	ja	selten	gelegentlich	heiß	hastig
62	FH	Frühstück	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
63	Uni	alles	nein	häufig	selten	heiß	normal
64	Uni	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
65	Uni	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
66	Uni	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
67	Uni	alles	ja	selten	gelegentlich	warm	normal
68	Lehre	alles	nein	häufig	gelegentlich	kalt	hastig
69	Lehre	Abendessen	nein	gelegentlich	selten	warm	normal
70	Lehre	Abendessen	ja	selten	selten	warm	langsam
72	Lehre	alles	ja	häufig	gelegentlich	warm	langsam
77	Uni	alles	nein	selten	gelegentlich	heiß	hastig
78	Lehre	Frühstück	ja	selten	gelegentlich	warm	normal
79	Uni	Frühstück+Abend	nein	gelegentlich	selten	warm	hastig
80	Uni	alles	ja	selten	gelegentlich	heiß	hastig
81	Uni	Frühstück+Abend	nein	häufig	häufig	warm	langsam
82	Uni	Mittag+Abend	nein	häufig	häufig	heiß	normal
83	FH	Frühstück+Mittag	nein	selten	gelegentlich	warm	normal
93	Uni	Frühstück+Mittag	nein	selten	gelegentlich	heiß	normal
101	Lehre	Abendessen	ja	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
102	Lehre	Mittag+Abend	ja	selten	gelegentlich	warm	normal
103	Lehre	Frühstück+Abend	ja	gelegentlich	gelegentlich	heiß	normal
104	Lehre	Frühstück+Abend	nein	selten	gelegentlich	warm	hastig
105	Lehre	alles	ja	selten	gelegentlich	warm	normal
106	Uni	alles	nein	gelegentlich	häufig	warm	normal
107	Lehre	alles	nein	selten	selten	warm	normal
108	Uni	alles	nein	gelegentlich	selten	warm	normal
109	Lehre	Frühstück+Abend	nein	häufig	selten	warm	hastig
110	Lehre	alles	ja	selten	selten	warm	hastig
111	Lehre	alles	ja	häufig	häufig	heiß	normal
112	Uni	alles	ja	häufig	gelegentlich	heiß	normal

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 6

Nr.	Aus- bildung	Hauptmahlzeiten	Snack	salzige Speisen	scharfe Speisen	Tempe- ratur	Geschwindi- gkeit
113	Uni	Frühstück+Mittag	ja	selten	häufig	heiß	hastig
114	Uni	alles	ja	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
115	Lehre	alles	ja	häufig	häufig	warm	langsam
116	Uni	alles	ja	selten	gelegentlich	warm	normal
117	Lehre	Frühstück+Mittag	ja	häufig	gelegentlich	warm	hastig
118	Lehre	Abendessen	ja	selten	gelegentlich	warm	normal
119	Lehre	alles	ja	häufig	gelegentlich	heiß	normal
120	Lehre	Abendessen	ja	häufig	häufig	warm	hastig
121	Uni	alles	nein	gelegentlich	häufig	warm	langsam
122	Lehre	Frühstück	nein	selten	gelegentlich	warm	normal
123	Lehre	alles	ja	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
124	Lehre	Abendessen	nein	selten	häufig	warm	hastig
125	Lehre	Mittag+Abend	ja	gelegentlich	gelegentlich	kalt	hastig
126	Lehre	Frühstück+Abend	nein	häufig	häufig	warm	normal
127	Uni	alles	nein	gelegentlich	gelegentlich	warm	normal
128	Lehre	alles	ja	häufig	häufig	warm	hastig
129	Lehre	alles	nein	selten	gelegentlich	warm	normal
130	Lehre	Abendessen	nein	gelegentlich	häufig	warm	hastig
131	Lehre	Mittag	ja	gelegentlich	gelegentlich	warm	langsam



Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 7

Nr.	Brotsorte	bürgerlich	Mediterran	Vollwertkost	Vegetarisch	Fast Food	Obst/Gemüse	Fisch
1	Vollkorn	ja	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
2	Vollkorn	ja	ja	nein	ja	nein	gelegentlich	gelegentlich
3	Vollkorn	nein	ja	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
4	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	ja	täglich	gelegentlich
5	Weißbrot	ja	nein	nein	nein	ja	gelegentlich	gelegentlich
6	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	niemals
7	Schwarzbrot	nein	ja	nein	ja	nein	täglich	gelegentlich
8	Vollkorn	ja	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	niemals
9	Vollkorn	nein	nein	ja	ja	nein	täglich	gelegentlich
10	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
11	Vollkorn	nein	ja	ja	ja	nein	täglich	gelegentlich
12	Weißbrot	nein	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
13	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
14	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
15	Vollkorn	nein	ja	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
16	Vollkorn	nein	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
17	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
18	Vollkorn	nein	ja	ja	nein	nein	täglich	gelegentlich
19	Vollkorn	ja	ja	ja	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
20	Vollkorn	nein	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
21	Vollkorn	nein	ja	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
22	Vollkorn	nein	ja	nein	ja	ja	gelegentlich	niemals
23	Vollkorn	ja	ja	ja	nein	nein	gelegentlich	niemals
24	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
25	Schwarzbrot	nein	nein	ja	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
27	Vollkorn	nein	nein	nein	ja	nein	täglich	niemals
29	alles	ja	ja	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
30	alles	ja	ja	ja	ja	nein	täglich	gelegentlich
32	alles	ja	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
33	Schwarzbrot	ja	ja	ja	ja	ja	gelegentlich	gelegentlich
34	Vollkorn	ja	ja	nein	ja	nein	gelegentlich	niemals
35	alles	ja	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
36	alles	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
37	Vollkorn	nein	ja	ja	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
38	alles	ja	ja	ja	ja	nein	täglich	gelegentlich
39	Schwarzbrot	nein	ja	nein	nein	nein	täglich	niemals
40	Schwarzbrot	ja	ja	ja	ja	nein	täglich	gelegentlich
41	Weißbrot	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
42	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	niemals
43	alles	ja	ja	ja	ja	nein	täglich	gelegentlich
44	alles	ja	ja	ja	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
45	alles	ja	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
46	alles	ja	ja	ja	ja	nein	täglich	gelegentlich
47	Vollkorn	ja	ja	ja	nein	ja	gelegentlich	niemals

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 8

Nr.	Brotsorte	bürgerlich	Mediterran	Vollwertkost	Vegetarisch	Fast Food	Obst/Gemüse	Fisch
48	Vollkorn	nein	ja	nein	ja	nein	täglich	niemals
49	alles	ja	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
50	alles	ja	ja	ja	ja	nein	täglich	gelegentlich
51	Vollkorn	nein	nein	nein	ja	nein	täglich	niemals
52	alles	ja	ja	ja	ja	nein	gelegentlich	gelegentlich
53	Schwarzbrot	ja	ja	nein	nein	ja	niemals	gelegentlich
54	Vollkorn	ja	nein	ja	nein	nein	täglich	gelegentlich
55	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
56	Schwarzbrot	ja	nein	ja	nein	nein	täglich	gelegentlich
57	Schwarzbrot	nein	nein	ja	nein	nein	täglich	gelegentlich
58	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
59	alles	ja	ja	ja	ja	nein	gelegentlich	gelegentlich
60	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	niemals
61	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
62	Vollkorn	ja	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	niemals
63	alles	ja	ja	ja	ja	nein	täglich	gelegentlich
64	alles	ja	ja	ja	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
65	alles	ja	nein	nein	nein	nein	niemals	niemals
66	Schwarzbrot	ja	ja	ja	nein	nein	täglich	gelegentlich
67	Vollkorn	nein	nein	ja	nein	nein	gelegentlich	niemals
68	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
69	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
70	Vollkorn	ja	ja	nein	ja	ja	gelegentlich	gelegentlich
72	Schwarzbrot	ja	ja	ja	ja	nein	täglich	gelegentlich
77	Vollkorn	nein	nein	ja	nein	nein	täglich	gelegentlich
78	Schwarzbrot	ja	ja	ja	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
79	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	niemals
80	Schwarzbrot	ja	ja	nein	nein	ja	gelegentlich	niemals
81	Weißbrot	ja	nein	nein	nein	nein	niemals	niemals
82	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
83	Schwarzbrot	nein	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	niemals
93	Weißbrot	ja	ja	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
101	alles	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
102	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
103	Vollkorn	nein	nein	ja	nein	nein	niemals	gelegentlich
104	Vollkorn	nein	ja	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
105	Vollkorn	nein	nein	ja	nein	nein	täglich	gelegentlich
106	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
107	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
108	Weißbrot	ja	nein	nein	nein	nein	niemals	gelegentlich
109	Weißbrot	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	niemals
110	Schwarzbrot	ja	ja	ja	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
111	Schwarzbrot	nein	ja	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
112	Vollkorn	nein	ja	nein	ja	nein	täglich	niemals

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 9

Nr.	Brotsorte	bürgerlich	Mediterran	Vollwertkost	Vegetarisch	Fast Food	Obst/Gemüse	Fisch
113	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
114	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
115	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
116	Vollkorn	nein	ja	ja	nein	nein	täglich	gelegentlich
117	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
118	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
119	Vollkorn	nein	nein	ja	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
120	Vollkorn	nein	nein	ja	nein	nein	gelegentlich	niemals
121	Weißbrot	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
122	Schwarzbrot	ja	ja	ja	ja	ja	gelegentlich	gelegentlich
123	Vollkorn	nein	nein	ja	nein	nein	täglich	gelegentlich
124	Vollkorn	ja	ja	nein	nein	nein	gelegentlich	niemals
125	alles	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
126	Schwarzbrot	ja	nein	nein	nein	nein	täglich	gelegentlich
127	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
128	Vollkorn	ja	ja	ja	ja	ja	täglich	gelegentlich
129	Vollkorn	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich
130	Vollkorn	nein	nein	nein	nein	ja	gelegentlich	gelegentlich
131	Weißbrot	ja	nein	nein	nein	nein	gelegentlich	gelegentlich

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 10

Nr.	Fleisch	Wurst	Geräucher-tes	Schokolade	Süßigkeiten/ Gummibären	Kuchen	Milch- produkte
1	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	niemals	niemals	täglich
2	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	täglich
3	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
4	täglich	gelegentlich	niemals	niemals	niemals	niemals	täglich
5	gelegentlich	gelegentlich	niemals	täglich	gelegentlich	niemals	gelegentlich
6	gelegentlich	gelegentlich	niemals	täglich	niemals	niemals	gelegentlich
7	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich	gelegentlich	täglich
8	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	gelegentlich	niemals	täglich
9	niemals	niemals	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	täglich
10	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	gelegentlich
11	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	täglich
12	gelegentlich	niemals	niemals	gelegentlich	niemals	gelegentlich	gelegentlich
13	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
14	gelegentlich	täglich	niemals	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
15	gelegentlich	niemals	niemals	täglich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
16	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
17	täglich	täglich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	niemals
18	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
19	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	niemals	gelegentlich	gelegentlich
20	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
21	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	niemals	gelegentlich	niemals
22	gelegentlich	täglich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
23	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	niemals	niemals	gelegentlich
24	gelegentlich	täglich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
25	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	täglich
27	niemals	niemals	niemals	gelegentlich	niemals	gelegentlich	täglich
29	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
30	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich
32	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
33	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	gelegentlich
34	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
35	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
36	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
37	niemals	täglich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	gelegentlich
38	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
39	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
40	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
41	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
42	gelegentlich	täglich	niemals	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
43	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
44	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
45	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
46	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
47	gelegentlich	täglich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	niemals	gelegentlich

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 11

Nr.	Fleisch	Wurst	Geräucher-tes	Schokolade	Süßigkeiten/ Gummibären	Kuchen	Milch- produkte
48	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich
49	niemals	gelegentlich	niemals	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
50	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
51	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
52	niemals	niemals	niemals	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
53	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
54	gelegentlich	gelegentlich	niemals	täglich	niemals	niemals	gelegentlich
55	gelegentlich	täglich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
56	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	täglich
57	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
58	gelegentlich	täglich	gelegentlich	niemals	niemals	gelegentlich	gelegentlich
59	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
60	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
61	täglich	täglich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals
62	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich
63	täglich	täglich	niemals	gelegentlich	niemals	niemals	gelegentlich
64	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
65	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
66	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals
67	gelegentlich	täglich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
68	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	niemals	gelegentlich	gelegentlich
69	gelegentlich	täglich	niemals	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
70	gelegentlich	niemals	gelegentlich	täglich	niemals	gelegentlich	gelegentlich
72	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
77	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	täglich
78	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
79	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
80	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich	niemals	niemals	täglich
81	täglich	gelegentlich	gelegentlich	täglich	niemals	niemals	niemals
82	täglich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	niemals	niemals	gelegentlich
83	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
93	gelegentlich	gelegentlich	niemals	täglich	niemals	gelegentlich	gelegentlich
101	täglich	gelegentlich	gelegentlich	täglich	gelegentlich	gelegentlich	täglich
102	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	niemals	niemals	gelegentlich
103	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich
104	gelegentlich	gelegentlich	niemals	niemals	niemals	niemals	täglich
105	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	täglich
106	gelegentlich	niemals	gelegentlich	gelegentlich	niemals	niemals	täglich
107	gelegentlich	gelegentlich	niemals	täglich	gelegentlich	niemals	täglich
108	gelegentlich	gelegentlich	niemals	niemals	niemals	gelegentlich	täglich
109	gelegentlich	gelegentlich	niemals	niemals	niemals	niemals	täglich
110	täglich	gelegentlich	niemals	niemals	niemals	niemals	täglich
111	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	gelegentlich	niemals	gelegentlich
112	gelegentlich	niemals	niemals	täglich	gelegentlich	gelegentlich	täglich



Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 13

Nr.	Trinkmenge	Mineralwasser	Tee	Cola/Softdrinks	Saft	Kaffee
1	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	ja	ja
2	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
3	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
4	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
5	0,5-1 L/d	ja	ja	nein	ja	nein
6	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	nein
7	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
8	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	ja	ja
9	> 2 L/d	ja	ja	nein	ja	nein
10	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	ja	ja
11	> 2 L/d	ja	ja	nein	ja	nein
12	0,5-1 L/d	ja	nein	nein	nein	nein
13	> 2 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
14	> 2 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
15	0,5-1 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
16	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	ja	ja
17	1-1,5 L/d	nein	nein	ja	nein	ja
18	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	nein
19	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	nein
20	1,5-2 L/d	nein	nein	nein	nein	ja
21	> 2 L/d	ja	ja	nein	nein	nein
22	> 2 L/d	nein	nein	nein	ja	ja
23	> 2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
24	1-1,5 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
25	> 2 L/d	nein	ja	nein	ja	ja
27	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	nein	nein
29	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
30	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
32	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
33	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
34	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	nein
35	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
36	1,5-2 L/d	ja	ja	ja	ja	ja
37	1-1,5 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
38	1,5-2 L/d	ja	ja	ja	ja	ja
39	> 2 L/d	ja	ja	nein	ja	nein
40	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
41	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	nein
42	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
43	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
44	1,5-2 L/d	ja	ja	ja	ja	ja
45	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
46	> 2 L/d	ja	ja	ja	ja	ja
47	> 2 L/d	ja	ja	nein	ja	nein

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 14

Nr.	Trinkmenge	Mineral- wasser	Tee	Cola/Soft- drinks	Saft	Kaffee
48	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
49	> 2 L/d	ja	ja	nein	nein	nein
50	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
51	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
52	1-1,5 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
53	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
54	1,5-2 L/d	ja	ja	ja	nein	nein
55	1,5-2 L/d	ja	nein	ja	ja	nein
56	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	nein	nein
57	> 2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
58	> 2 L/d	nein	ja	nein	nein	ja
59	> 2 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
60	1,5-2 L/d	ja	ja	ja	ja	ja
61	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
62	> 2 L/d	ja	nein	nein	ja	nein
63	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	ja	nein
64	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
65	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
66	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
67	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	nein
68	> 2 L/d	ja	nein	nein	ja	ja
69	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	nein	nein
70	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
72	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	nein
77	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
78	> 2 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
79	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	ja	ja
80	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	nein
81	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	nein
82	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	nein
83	1-1,5 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
93	1-1,5 L/d	nein	ja	nein	nein	ja
101	1,5-2 L/d	ja	ja	ja	ja	ja
102	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
103	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
104	> 2 L/d	ja	nein	nein	ja	ja
105	1,5-2 L/d	ja	nein	ja	ja	ja
106	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
107	1,5-2 L/d	nein	nein	nein	nein	ja
108	1,5-2 L/d	nein	ja	nein	nein	ja
109	0,5-1 L/d	nein	nein	nein	nein	ja
110	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
111	1-1,5 L/d	nein	nein	nein	ja	ja
112	1-1,5 L/d	ja	ja	nein	ja	nein



Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 15

Nr.	Trinkmenge	Mineral- wasser	Tee	Cola/Soft- drinks	Saft	Kaffee
113	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
114	1,5-2 L/d	nein	nein	nein	ja	ja
115	1-1,5 L/d	nein	ja	nein	nein	ja
116	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
117	> 2 L/d	nein	nein	nein	nein	ja
118	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
119	> 2 L/d	nein	nein	ja	nein	ja
120	1,5-2 L/d	nein	nein	ja	nein	ja
121	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja
122	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
123	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	nein
124	1-1,5 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
125	> 2 L/d	nein	nein	nein	ja	ja
126	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
127	1,5-2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
128	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	nein	ja
129	> 2 L/d	ja	nein	nein	nein	ja
130	1,5-2 L/d	ja	nein	ja	ja	ja
131	1,5-2 L/d	ja	ja	nein	ja	ja

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 16

Nr.	Milch	CO <sub>2</sub> -haltige Getränke	Alkohol	Kaffe	Schwarzer Tee	Grüner Tee
1	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
2	ja	täglich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
3	ja	täglich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
4	ja	niemals	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
5	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d
6	ja	niemals	< 2 Gläser/d	niemals	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d
7	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
8	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
9	ja	niemals	niemals	niemals	niemals	> 5 Tassen/d
10	ja	täglich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
11	ja	niemals	< 2 Gläser/d	niemals	niemals	2-5 Tassen/d
12	ja	niemals	niemals	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
13	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d
14	ja	täglich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	2-5 Tassen/d	niemals
15	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
16	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
17	nein	täglich	niemals	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
18	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	niemals	< 2-5 Tassen/d	niemals
19	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
20	ja	täglich	> 2 Gläser/d	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
21	nein	täglich	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	2-5 Tassen/d	niemals
22	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
23	ja	niemals	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d
24	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
25	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	2-5 Tassen/d	niemals
27	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
29	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
30	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
32	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
33	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
34	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
35	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
36	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
37	nein	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
38	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
39	nein	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
40	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d
41	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	2-5 Tassen/d	niemals
42	ja	täglich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
43	ja	niemals	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
44	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
45	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
46	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d
47	ja	niemals	niemals	niemals	< 2-5 Tassen/d	2-5 Tassen/d

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 17

Nr.	Milch	CO <sub>2</sub> -haltige Getränke	Alkohol	Kaffe	Schwarzer Tee	Grüner Tee
48	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d
49	nein	niemals	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
50	ja	niemals	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
51	ja	niemals	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
52	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
53	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	> 5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
54	nein	gelegentlich	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
55	ja	täglich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
56	nein	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
57	ja	gelegentlich	niemals	2-5 Tassen/d	2-5 Tassen/d	niemals
58	ja	niemals	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
59	ja	gelegentlich	niemals	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
60	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
61	ja	niemals	niemals	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
62	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
63	ja	täglich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
64	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
65	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
66	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
67	ja	täglich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d
68	ja	niemals	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
69	ja	niemals	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
70	ja	täglich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
72	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
77	ja	täglich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	< 2-5 Tassen/d
78	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
79	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
80	ja	niemals	< 2 Gläser/d	niemals	niemals	> 5 Tassen/d
81	nein	gelegentlich	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
82	ja	täglich	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
83	ja	täglich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
93	ja	niemals	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	> 5 Tassen/d	2-5 Tassen/d
101	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
102	ja	gelegentlich	niemals	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
103	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
104	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
105	ja	gelegentlich	niemals	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
106	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
107	ja	gelegentlich	niemals	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
108	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals
109	nein	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
110	ja	niemals	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
111	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
112	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	niemals	> 5 Tassen/d	niemals

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 18

Nr.	Milch	CO <sub>2</sub> -haltige Getränke	Alkohol	Kaffe	Schwarzer Tee	Grüner Tee
113	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
114	ja	täglich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
115	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	< 2-5 Tassen/d
116	ja	täglich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
117	ja	niemals	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
118	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
119	ja	täglich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
120	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
121	ja	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
122	nein	gelegentlich	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
123	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	niemals	< 2-5 Tassen/d	niemals
124	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	2-5 Tassen/d	niemals
125	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
126	ja	täglich	< 2 Gläser/d	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
127	nein	gelegentlich	> 2 Gläser/d	2-5 Tassen/d	niemals	niemals
128	nein	niemals	> 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
129	ja	gelegentlich	niemals	> 5 Tassen/d	niemals	niemals
130	ja	täglich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	niemals	niemals
131	ja	gelegentlich	< 2 Gläser/d	< 2-5 Tassen/d	< 2-5 Tassen/d	niemals

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 19

Nr.	HPB r	HPB l	HPBm	Median	Myosmin Speichel	Nicotin Speichel	Cotinin Speichel	Myosmin Nagel	Nicotin Nagel	Cotinin Nagel
1	23800,34	15690,31		19745,33	1,090		100,452	0,039	1,860	0,735
2	4677,38	4831,26		4754,32	0,725		101,903	0,069	2,452	0,781
3	1765,14	620,57		1192,86	0,582		14,364	0,039	0,155	n.d.
4	17216,00	44795,66		31005,83				0,079	1,631	0,784
5	2618,95	2927,92		2773,44	1,000		1,163	0,039	1,144	1,003
6	1622,60	2777,87		2200,24	0,778		n.d.	0,051	0,115	1,003
7	918,02	1707,46		1312,74	0,265		n.d.	0,023	0,201	n.d.
8	3366,29	8012,13		5689,21	0,204		n.d.	0,011	0,183	n.d.
9	5309,24	2688,67		3998,96	2,336		2,953	0,008	0,202	n.d.
10	6455,41	8011,96		7233,69	0,952		31,916	0,014	0,628	0,477
11	309,61	112,39		211,00	1,152		1,224	0,011	0,163	n.d.
12	7950,79	3101,32		5526,06	3,300		100,036	0,033	1,361	0,446
13	42412,84	40405,89		41409,37	0,870		1,163	0,003	0,284	0,235
14	66696,06	31251,24		48973,65	1,779		155,673	0,030	1,834	2,988
15	1077,17	870,46		973,82	0,306		n.d.	0,016	0,226	n.d.
16	n.d.	2678,73		2678,73				0,022	0,088	n.d.
17	12623,41	6893,16		9758,29	1,016		n.d.	0,034	0,425	0,291
18	1881,77	1387,40		1634,59	0,980		n.d.	0,010	n.d.	n.d.
19	457,23	808,93		633,08	0,290		n.d.	0,032	0,075	n.d.
20	630,26	99,39		364,83	0,402		n.d.	0,022	0,010	n.d.
21	253,33	927,31		590,32						
22	10432,95	10281,98		10357,47	10,860		107,110	0,050	3,004	1,896
23	1400,74	1427,26		1414,00				0,027	1,726	0,794
24	5934,36	7343,68		6639,02	3,470		68,920	0,213	2,554	3,770
25	7056,34	8092,40		7574,37	2,600		188,970	0,161	2,696	2,706
27	4375,26	6328,65		5351,96	1,354		326,728	0,030	1,548	0,624
29	5039,05	10198,87		7618,96	0,454		25,382	0,057	2,137	0,535
30	11872,31	8956,67		10414,49	0,589		38,169	0,078	1,642	2,519
32	9021,68	12290,42		10656,05	3,056		51,691	0,029	0,979	1,493
33	4618,16	4264,37		4441,27	0,410		n.d.			
34	10522,76	10139,04		10330,90	0,820		0,660			
35	1426,98	2281,88		1854,43	0,757		12,040	0,082	1,723	0,394
36	10586,94	9728,29		10157,62						
37	8669,80	3799,67		6234,74	2,950		26,540			
38	156,80	n.d.		156,80	1,554	n.d.	n.d.			
39	1574,78	1567,11		1570,95	1,820		3,860			
40	1932,46	2155,33		2043,90	0,296		n.d.			
41	310,33	415,04		362,69	0,197		n.d.			
42	n.d.	320,51		320,51						
43	109,59	138,35		123,97	0,490		1,970			
44	6705,66	5782,83		6244,25						
45	6808,66	6016,43		6412,55						
46	1289,38	1078,30		1183,84						
47	240,46	671,65		456,06	n.d.		n.d.			

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 20

Nr.	HPB r	HPB l	HPBm	Median	Myosmin Speichel	Nicotin Speichel	Cotinin Speichel	Myosmin Nagel	Nicotin Nagel	Cotinin Nagel
48	2257,90	2428,02		2342,96	1,137		n.d.			
49	605,69	797,27		701,48	0,710		1,300			
50	9965,98	10351,50		10158,74						
51	1179,08	485,23		832,16						
52	1466,86	295,01		880,94	1,846		n.d.			
53	2338,08	2470,61		2404,35	1,172		n.d.			
54	6485,61	661,05		3573,33	1,170		n.d.			
55	1818,74	1901,57		1860,16	0,870		n.d.			
56	3841,16	1955,36		2898,26	0,600		4,480			
57	96,78	131,44		114,11						
58	7863,57	9073,80		8468,69	8,350		99,770			
59	1211,69	460,54		836,12						
60	4510,54	7847,30		6178,92	0,934		n.d.			
61	714,36	988,06		851,21	0,620		1,060			
62	7540,93	7436,97		7488,95	1,740		21,550			
63	440,66	507,83		474,25	1,819		n.d.			
64	1607,22	669,09		1138,16	0,865		n.d.			
65	7869,91	0,00		3934,96						
66	5868,82	6413,37		6141,10						
67	390,53	287,63		339,08	1,340		0,650			
68	15362,89	15224,98	13884,52	<b>14824,13</b>	0,924		29,057			
69	4584,86	4355,32		4470,09						
70	8119,66	9475,14		8797,40						
72	525,17	978,33		751,75	0,651		n.d.			
77	628,68	536,20		582,44						
78	511,46	1431,16		971,31						
79	1134,63	2217,07		1675,85						
80	7489,65	9309,38		8399,52	18,480		136,710			
81	1325,43	1017,30		1171,37	0,350		0,790			
82	9772,94	11466,88		10619,91	0,720		16,600			
83	1452,89	809,77		1131,33						
93	8832,05	6182,74		7507,40	11,727	641,848	237,155			
101	31667,81	16994,39	18988,43	22550,21	1,179	866,395	143,130	0,148	6,258	3,650
102	11774,97	16624,01	15728,28	14709,09	7,392	112,955	45,551	0,145	2,778	2,079
103	18944,92	20440,64	19534,87	19640,14	2,405	721,868	113,269	0,023	1,766	2,057
104	12872,55	17557,41	9448,63	13292,86	3,104	164,692	97,938	0,188	4,305	4,385
105	12492,83	12473,06	21897,81	15621,23	0,716	303,908	41,861	0,015	2,528	2,609
106	9190,02	8797,67	10795,23	9594,31	3,035	323,344	120,717	0,085	1,841	1,901
107	11824,25	22072,52	9963,25	14620,01	0,618	166,264	153,632	0,168	0,912	1,291
108	11785,96	7409,76	6511,36	8569,03	3,362	96,018	72,268	0,389	16,016	1,924
109	8974,43	8003,43	7724,05	8233,97	1,228	167,540	74,531	0,651	8,031	3,273
110	22617,66	17120,93	24583,99	21440,86	0,816	843,733	53,278	0,030	0,479	0,476
111	6860,11	20223,11	10018,61	12367,28	1,407	950,968	74,299	0,014	0,688	0,728
112	12004,47	11205,13	8709,14	10639,58	0,461	344,660	59,771	0,030	0,872	0,877

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 21

Nr.	HPB r	HPB l	HPBm	Median	Myosmin Speichel	Nicotin Speichel	Cotinin Speichel	Myosmin Nagel	Nicotin Nagel	Cotinin Nagel
113	7732,95	9855,45	12249,11	9945,84	2,336	567,782	139,869	0,035	2,173	5,294
114	10154,31	21924,48	7291,40	13123,40	4,985	400,005	111,550	0,047	1,445	2,222
115	19916,40	26497,07	24999,40	23804,29	4,129	436,747	125,817	0,037	2,390	3,603
116	7914,83	20487,80	9733,90	12712,18	9,163	208,029	87,155	0,053	0,921	4,205
117	9459,76	12331,25	10497,01	10762,67	6,554	139,862	115,859	0,010	0,880	5,315
118	25660,40	17239,15	23328,59	22076,05	20,723	102,886	112,030	0,036	1,090	2,412
119	11813,00	n.d.	20417,97	16115,49	2,927	927,497	119,725	0,025	1,183	3,068
120	21788,82	15109,77	22726,22	19874,94				0,045	0,923	4,002
121	27846,16	27143,04	37716,02	30901,74	2,501	366,520	77,687	0,086	5,793	2,212
122	43913,28	28442,51	33422,53	35259,44	0,951	953,462	113,283	0,117	11,999	4,375
123	16658,41	16015,63	29193,14	20622,39	3,944	726,911	167,136	0,050	2,943	1,514
124	21215,89	22578,97	19864,97	21219,94	11,175	210,805	147,905	0,277	4,643	1,936
125	16363,15	18158,77	16835,55	17119,16	33,524	311,726	338,596	0,163	7,963	0,329
126	20176,45	13042,50	18326,23	17181,73	6,808	483,907	154,126	0,039	5,611	2,620
127	16751,37	20913,51	30055,49	22573,46	1,585	1267,623	212,130	0,069	6,143	4,152
128	22297,06	24873,95	24935,52	24035,51	6,055	147,566	172,415	0,014	2,282	0,993
129	11292,29	9668,61	11212,43	10724,44	0,598	356,067	89,421	0,033	3,294	0,805
130	6964,05	8486,88	9175,93	8208,95	2,054	1220,863	172,541	0,085	5,080	0,920
131	22177,51	33391,65	35233,38	27784,58						
132	12413,95	11376,00		11894,98						
133	14787,22	13271,78		14029,50						
134	16520,67	15790,54		16155,61						
135	14435,44	14167,82		14301,63						
136	15529,27	13456,21		14492,74						
137	13994,27	13062,90		13528,59						
138	14033,52	14278,58		14156,05						
139	13766,07	13144,67		13455,37						
140	14578,29	14167,25		14372,77						
141	18166,36	17097,71		17632,04						
142	18734,33	17522,81		18128,57						
143	17757,65	17054,09		17405,87						
144	12573,26	12295,80		12434,53						
145	14001,85	13368,61		13685,23						
146	14622,72	15025,16		14823,94						
147	17428,36	15022,96		16225,66						
148	15591,71	16190,76		15891,24						
149	9015,82	8713,89		8864,86						
150	11441,44	13626,45		12533,95						
151	10399,09	11725,77		11062,43						
153	8352,75	9044,20		8698,48						
154	8200,51	9168,17		8684,34						
156	10280,01	10639,11		10459,56						
157	14145,96	16432,53		15289,25						
158	13900,87	13976,10		13938,49						

Tab. A-4 Humanstudie, Fortsetzung 22

Nr.	HPB r	HPB l	HPBm	Median	Myosmin Speichel	Nicotin Speichel	Cotinin Speichel	Myosmin Nagel	Nicotin Nagel	Cotinin Nagel
159	9177,82	8548,10		8862,96						
160	12314,33	11639,22		11976,78						
161	13400,87	13196,47		13298,67						
162	7169,89	7954,58		7562,24						
163	7386,93	8554,69		7970,81						
164	9854,71	8490,09		9172,40						
165	9384,75	9028,45		9206,60						
166	12810,29	12981,80		12896,05						
167	12331,23	10379,65		11355,44						
168	16504,88	14939,04		15721,96						
169	13169,75	12199,58		12684,67						
170	8850,59	7954,98		8402,79						
171	9144,94	8710,20		8927,57						
172	17640,99	17247,06		17444,03						
173	10107,68	7458,83		8783,26						
174	12068,00	11557,09		11812,55						
175	16359,77	15937,79		16148,78						
176	9023,59	7259,91		8141,75						
177	14610,76	11610,00		13110,38						
178	9235,87	9595,67		9415,77						
179	16250,36	16863,49		16556,93						
180	12222,56	11628,11		11925,34						
181	7019,86	7568,18		7294,02						
182	13791,08	13581,19		13686,14						
183	8401,46	8562,79		8482,13						
184	11968,41	10443,93		11206,17						
185	6578,66	8585,82		7582,24						
186	8533,67	8391,13		8462,40						
187	12917,74	12900,01		12908,88						
188	9725,40	10898,77		10312,09						
189	10480,98	9979,51		10230,25						
190	15450,38	13390,20		14420,29						
191	13153,55	12815,28		12984,42						
192	10014,04	10149,69		10081,87						
193	13832,92	12900,80		13366,86						
194	9913,36	9701,45		9807,41						
195	11959,43	10133,98		11046,71						
196	8385,20	7542,64		7963,92						
197	8980,66	8188,37		8584,52						
198	7482,34	7947,08		7714,71						
199	10982,17	11691,16		11336,67						



## Fragebogen – Seite 1

**Bestimmung von HPB-DNA-Addukten in  
Zellen der Mundschleimhaut und der  
Zehennägel**

Name, Vorname  .....

Geburtsdatum  .....

Geschlecht  m  w

**Soziokulturelle Faktoren**

---

Höchster Schul- bzw.  
Hochschulabschluss  .....

Höchster berufsbildender  
Abschluss  .....

Momentan ausgeübter Beruf  .....

**Rauchstatus**

---

Sind Sie Raucher?  ja  nein

Wie lange rauchen Sie bereits?  
Angabe in Monaten / Jahren  .....

Rauchen Sie regelmäßig?  ja  nein

Was rauchen / verwenden Sie?  Zigaretten  .....Stück/Tag  .....Jahre  
 Zigarren  .....Stück/Tag  .....Jahre  
 Pfeife  .....Stück/Tag  .....Jahre  
 Kautabak  .....Stück/Tag  .....Jahre  
 Schnupftabak  .....Stück/Tag  .....Jahre

- bevorzugte Marke

Wann rauchten Sie das letzte Mal  
vor der Probenentnahme?  .....

Wieviele Zigaretten / Zigarren  
rauchten Sie am Entnahmetag?  .....

Raucht -abgesehen von Ihnen-  
jemand in Ihrem Haushalt bzw. an  
Ihrem Arbeitsplatz?  ja  nein

## Fragebogen – Seite 2

**Ernährung**

- 
- Welche Hauptmahlzeiten nehmen Sie regelmäßig ein?  Frühstück  Mittag  Abendessen
- Nehmen Sie häufig Zwischenmahlzeiten ein?  ja  nein
- Salzen Sie meist Ihr Essen nach?  selten  gelegentlich  sehr häufig
- Essen Sie gern scharf gewürzte Speisen?  selten  gelegentlich  sehr häufig
- Wie heiß essen Sie Ihre Speisen?  eher kalt  lauwarm  sehr heiß (vom Herd)
- Wie schnell essen Sie?  hastig (schlingen)  normal  bewusst langsam
- Welche Brotsorte bevorzugen Sie?  Weißbrot  Schwarzbrot  Vollkornbrot
- Welche Küche bevorzugen Sie?  Bürgerlich  Mediterran  Vollwertkost  
 Vegetarisch  Fast Food
- Essen Sie regelmäßig
- |  |                              |   |                                  |
|--|------------------------------|---|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Obst/ Gemüse/ Salat   | <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche | <input type="checkbox"/> täglich |
| <input type="checkbox"/> Fisch   | <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche | <input type="checkbox"/> täglich |
| <input type="checkbox"/> Fleisch   | <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche | <input type="checkbox"/> täglich |
| <input type="checkbox"/> Wurst   | <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche | <input type="checkbox"/> täglich |
| <input type="checkbox"/> geräucherte Nahrungsmittel                                  | <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche | <input type="checkbox"/> täglich |
| <input type="checkbox"/> Schokolade  | <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche | <input type="checkbox"/> täglich |
| <input type="checkbox"/> Bonbons / Gummibärchen                                      | <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche | <input type="checkbox"/> täglich |
| <input type="checkbox"/> Kuchen / Torten   | <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche | <input type="checkbox"/> täglich |
| <input type="checkbox"/> Milch / Milchprodukte (z.B. Joghurt / Kefir / Buttermilch)? | <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche | <input type="checkbox"/> täglich |
- Gesamte Trinkmenge / Tag  ..... l / Tag
- Was trinken Sie hauptsächlich?  Mineralwasser  Tee  Cola / Limo  
 Saft  Kaffee  Sonstiges  
.....  
.....

**Fragebogen – Seite 3**

Bevorzugen Sie kohlenensäurehaltige Getränke?  nie  gelegentlich  häufig

Trinken Sie Alkohol?  nie  gelegentlich  häufig

Wenn ja, wieviel?  
(Gläser/Woche)

<input type="checkbox"/> Bier	<input type="checkbox"/> ....Gläser/Wo.	<input type="checkbox"/> Seit wann?
<input type="checkbox"/> Wein	<input type="checkbox"/> ....Gläser/Wo.	<input type="checkbox"/> .....
<input type="checkbox"/> Schnaps	<input type="checkbox"/> ....Gläser/Wo.	<input type="checkbox"/> .....

Wieviele Tassen trinken Sie täglich:

<input type="checkbox"/> Kaffee	<input type="checkbox"/> ..... Tassen / Tag
<input type="checkbox"/> Schwarzer Tee	<input type="checkbox"/> ..... Tassen / Tag
<input type="checkbox"/> Grüner Tee?	<input type="checkbox"/> ..... Tassen / Tag

**Zehennägel**

---

Lackieren Sie Ihre Zehennägel?  ja  nein

Wenn ja, wie häufig?  ..... x pro Woche  ..... x pro Monat

Wann haben Sie das letzte Mal Ihre Zehennägel lackiert?  ..... Tage vor der Entnahme

Hatten Sie in den letzten 6 Monaten eine Nagelerkrankung?  ja  nein

Wenn ja, auf welcher Seite?  rechter Fuß  linker Fuß

**Einverständniserklärung**

---

Ich erkläre mich einverstanden, dass die entnommenen Gewebeprobe der Mundschleimhaut, des Speichels und der Zehennägel für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden.

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.

München,

Unterschrift

## Danksagung

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

Sehr herzlich danke ich meinem Betreuer Herrn Professor Dr. Elmar Richter. Sie haben mir stets ein offenes Ohr für einen wissenschaftlichen Gedankenaustausch geliehen und waren für mich ein wertvoller Ratgeber für neue Aufgabenstellungen. Die Teilnahme an mehreren internationalen Meetings und Kongressen verdanke ich Ihrem steten Drang zur wissenschaftlichen Diskussion. In besonders schöner Erinnerung sind mir der Princess Chulabhorn International Science Congress im November 2007 in Bangkok, Thailand und die Tagung der AACR im April 2008 in San Diego, USA geblieben.

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 Proben der Benutzer des schwedischen Snus möchte ich mich bei Prof. Karl Olov Fagerström, Helsingborg, Schweden recht herzlich bedanken. Diese Zusammenarbeit war für mich stets mit Herzlichkeit und viel Freude verbunden.

Dem Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz, Polen gilt mein besonderer Dank für die umfassende Bereitstellung der Rattenproben und der tatkräftigen Unterstützung bei der Probengewinnung von starken Rauchern. Ebenso erinnere ich mich sehr gern an die stets informativen und unterhaltenden wissenschaftlichen Meetings, die an mehreren wundervollen Plätzen in Europa stattgefunden haben.

Der Firma SMS GmbH, Idstein, vertreten durch Herrn Volker Grau, Herrn Stefan Lang und Frau Karen Biermann, gilt ein spezieller Dank für die kompetente und schnelle Unterstützung bei technischen Problemen mit den verwendeten GC/MS-Geräten.

Herrn Dr. Manuel Maier möchte ich einen Dank aussprechen für die rasche Einarbeitung in die Laborpraxis und die freundliche Unterstützung bei analytischen Fragestellungen.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Christopher Heppel, meinem „Laborabschnittsgefährten“ während der gesamten Dauer der Dissertation. Wir haben wissenschaftliche Höhen und Tiefen meisterlich durchlaufen. Bei Frau Dr. Katharina Schütte-Borkovec und Frau Brigitte Mayerhofer möchte ich mich für die Hilfe bei der Aufarbeitung vieler Proben bedanken. Insgesamt danke ich dem kompletten Team des Arbeitskreises, das mich sehr freundlich aufgenommen und immer unterstützt hat.

Der größte Dank gilt meiner Familie und Freunden, die mir häufig eine starke Schulter geboten haben, wenn ich wissenschaftliche Täler durchwandern musste und die mich auf dem Weg meiner beruflichen Laufbahn freundlich begleitet haben.

## Lebenslauf

- Name: Heling
- Vorname: Anne-Kathrin
- Geburtsdatum: 20. März 1980
- Geburtsort: Weimar
- Staatsangehörigkeit: deutsch

### Beruflicher Werdegang:

- 07/1998 Abitur, Hoffmann-von-Fallersleben-Gymnasium, Weimar
- 1998-2003 Studium der Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
- 12/2003 - 06/2004 Praktikum in der St. Alto Apotheke, Unterhaching
- 06/2004 – 12/2004 Praktikum im Institut für Rechtsmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- 12/2004 Staatsexamen Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
- 01/2005 - 03/2009 Doktorand am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München bei Prof. Dr. Elmar Richter
- seit 04/2009 Trainee, AstraZeneca GmbH, Wedel