

Aus der Abteilung für Toxikologie

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Universitätskrankenhaus Eppendorf

Direktor Prof. Dr. T. Eschenhagen

**Ernährung und Biomarker der Genotoxizität
in der humanen Brust**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Sea-Uck Lukas Jung

aus Hamburg

Hamburg, den 08.11.2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/-in:
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/-in:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Chemische Kanzerogenese	6
1.2	Veränderungen genetischen Materials	8
1.3	DNA Addukte	10
1.4	Lebensmittelmutagene	11
1.4.1	Natürliche Kanzerogene in pflanzlichen Nahrungsmitteln	11
1.4.2	Mykotoxine	13
1.4.3	Lebensmittelzusatzstoffe	13
1.4.4	Substanzen, die bei der Zubereitung von Nahrungsmitteln entstehen ...	15
1.5	Brustkrebs	23
1.5.1	Hereditäre Risikofaktoren	23
1.5.2	Hormon- und Reproduktionsfaktoren	24
1.5.3	Soziodemographische Risikofaktoren	26
1.5.4	Ernährungsfaktoren	27
1.5.5	Umweltfaktoren (Environment)	28
1.6	EPIC-Studie	29
1.7	Studienziel	30
2	Methoden	32
2.1	Patientengut	32
2.2	Kollagenase-Digestion	32
2.3	Extraktion	34
2.4	Ames-Test	36
2.5	Postlabeling	38
2.6	EPIC-Fragebogen	43
2.7	Adipozyten-Kultivierung	45
2.8	Statistische Analyse	45
3	Materialien und Geräte	47
3.1	Kollagenase-Digestion	47
3.2	Extraktion	47
3.3	Ames-Test	48
3.4	Postlabeling	50
4	Ergebnisse	52
4.1	Patientengut, Altersverteilung	52
4.2	Kollagenase-Digestion und DNA-Extraktion	52
4.3	Ames-Test	53
4.4	DNA-Addukte	60
4.4.1	Tabakrauchen	63
4.4.2	Alter und Klimakterium	64
4.4.3	BMI	65
4.5	EPIC-Fragebogen	67
4.5.1	Fleisch- und Fischkonsum – Verzehrshäufigkeiten	67
4.5.2	Fleisch- und Fischkonsum – Tägliche Aufnahmemengen	68
4.5.3	Fleisch- und Fischkonsum – Zubereitungsformen	70
4.5.4	Fleisch- und Fischkonsum – Bräunungsgrad	72
4.5.5	Alimentäre HAA-Aufnahme	74
4.5.6	Alimentäre HAA-Aufnahme und einzelne Fleischsorten	76
4.5.7	Antimutagene – Gemüse und Obst	83
4.5.8	Antimutagene – Vitamine und Ballaststoffe	84

4.5.9	Fettaufnahme	86
4.5.10	Alkohol	87
5	Diskussion	89
5.1	Interne Dosis: Addukt-Level	89
5.2	Externe Dosis: alimentäre HAA-Aufnahme.....	92
5.3	Addukte und HAA.....	95
5.4	Fett, Fettsäuren und Addukte.....	101
5.5	Alkohol und Addukte	104
5.6	Antimutagene und Addukte.....	105
5.7	Mutagenität und Ames-Test	107
6	Zusammenfassung	109
7	Abkürzungsverzeichnis	111
8	Anhang	112
8.1	Tabellenverzeichnis	112
8.2	Abbildungsverzeichnis	117
9	Literaturverzeichnis	119
10	Danksagung	127
11	Lebenslauf	128
12	Eidesstattliche Versicherung:	129

1 Einleitung

Krebserkrankungen zählen in den Industrienationen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. In Europa stirbt etwa jeder Dritte an einer Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems und jeder Vierte an einer Krebskrankheit¹. Bei Männern ist Lungenkrebs in einem Viertel aller Krebsfälle die Todesursache, bei Frauen ist Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung. An zweiter Stelle der Krebstodesursachen steht bei Frauen und Männern der Darmkrebs. Bei den Risikofaktoren aller Krebserkrankungen führt Rauchen die Rangliste an. Nimmt man die Risikofaktoren Rauchen, Ernährungsgewohnheiten, Alkoholkonsum und berufliche Exposition zusammen, so werden über zwei Drittel der Krebsfälle durch chemische Schädigung der DNA verursacht¹. Genetische Prädisposition und virale Infektionen sind in Deutschland dagegen nur mit etwa 5 bis 10% aller Krebsfälle ursächlich¹. Weltweit wird der Anteil viral induzierter Krebsfälle auf 15% geschätzt.

Die Erkenntnis, dass die größere Zahl der Krebsfälle vor allem auf Umwelt- und Ernährungsfaktoren beruhen, stützt sich auf epidemiologische Migrationsstudien der Inzidenz- bzw. Mortalitätsraten bei Auswanderern, die aus Ländern mit niedrigem Krebserkrankungsrisiko in Länder mit höheren Erkrankungsrisiken emigrierten. Wohingegen als bislang besonders wichtig eingestufte Faktoren, wie Umweltverschmutzung, Medikamenteneinnahme oder synthetische Schadstoffe, eine geringere Bedeutung in der Induktion von Tumorerkrankungen zukommt². Die besondere Bedeutung der Ernährung wird auch klar, wenn man bedenkt, dass ein Mensch bis zum 50. Lebensjahr etwa 50 000 kg an Nahrung (Frischgewicht) zu sich nimmt. Bei den alimentären Einflussfaktoren spielen Substanzen, die bei der Zubereitung von Lebensmitteln entstehen, eine zentrale Rolle. Zu dieser Substanzgruppe zählen die Nitrosamine, die polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sowie heterozyklische aromatische Amine (HAA). Heterocyclische aromatische Amine wurden erstmals Ende der Siebzigerjahre aus gebratenem, gegrilltem Fleisch- und Fisch-Produkten isoliert³. Sie entstehen unter Hitzeeinfluss aus Kreatin/ Kreatinin, Zuckern und Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass die in Fleisch- und Fisch-Produkten auftretenden Konzentrationen stark von der Erhitzungsdauer, Temperatur und Zubereitungsart (Kochen/ Dämpfen < Braten/ Backen < Grillen) abhängig und in ng/g-Mengen nachzuweisen sind. HAA binden kovalent an die DNA, sogenannte Addukte, und scheinen so maligne Prozesse initiieren können. Das genotoxische Potential kann mittels Bakterien-Mutagenitätstests nachgewiesen werden. So lassen sich HAA und deren genotoxische Wirkung in Fleisch- und Fischextrakten nachweisen. In tierexperimentellen Studien, in denen Ratten und andere Nagetiere mit HAA gefüttert wurden, konnten erhöhte Addukt-Werte sowie die Entstehung von

Tumorerkrankungen in verschiedenen Organen der Versuchstiere, wie z.B. im Magen, Kolon, Leber, Blase und auch in der Brust weiblicher Tiere, beobachtet werden. Auch im Gewebe gesunder und tumorkranker Patienten lassen sich Addukte nachweisen, wobei die an einem Tumor erkrankten Patienten höhere Werte aufweisen⁴.

Der Mensch ist im Zeitalter der Industrialisierung täglich einer Vielzahl von künstlichen Substanzen in Form von Nahrungsmittelzusätzen, Medikamenten, Körperpflegemitteln, Baustoffen und Schadstoffen in Luft und Wasser ausgesetzt. Eine Aufklärung dieser Faktoren und ihrer molekularbiologischen Mechanismen bilden die Grundlage einer erfolgreichen Prävention von Krebserkrankungen.

1.1 Chemische Kanzerogenese

Der aktuelle Kenntnisstand über kanzerogene Verbindungen beruht überwiegend auf tierexperimentellen Untersuchungen und Beobachtungen am Menschen. Daher sind chemische Kanzerogene definiert als Substanzen, die in den Kontrolltieren tierexperimentelle Studien Krebs induzieren, die Inzidenz von Tumorerkrankungen erhöhen oder die zu früherer Entwicklung von Tumoren führen.

Die kanzerogene Wirkung von chemischen Substanzen und der Einfluss von bestimmten Lebensweisen auf die Genese von Krebserkrankungen wurden bereits vor über 250 Jahren beobachtet (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Geschichtliche Übersicht über die Aufdeckung von Krebsursachen

Jahr	Autor	Krebsart, betroffene Personengruppe bzw. Ursache
1743	Ramazzini	Brustkrebs bei Nonnen
1761	John Hill	Nasenkrebs bei Tabakschnupfern
1775	Percival Pott	Hodenkrebs bei Schornsteinfegern
1795	Soemmering	Lippenkrebs bei Pfeifenrauchern
um 1820	Ayrton et al	Hautkrebs, Arsentherapie
1874	Volkmann	Hodenkrebs, Braunkohlenteer
1895	Rehn	Blasenkrebs bei Anilin-Arbeitern
1933	CIF (England)	Nasenkrebs, Nickelgewinnung
1935	Lynch und Smith	Lungenkrebs, Asbest
1940	Müller	Bronchialkrebs bei Zigarettenrauchern
1941	Vigliani	Leukämie, Benzol
1943	Wedler	Mesotheliom, Asbest
1974	Creech und Johnson	Leber-Hämangiosarkom, Vinylchlorid

Quelle: modifiziert nach Henschler, 1991

Bislang konnte das kanzerogene Potential für etwa über 500 Substanzen, ca. 20% aller verdächtigen Verbindungen, bestätigt werden⁵. Sie können bei ausreichender Dosis den kompletten Prozess der Tumorentstehung (komplette oder Solitärkanzerogene) oder

lediglich bestimmte Schritte des Mehrstufenprozesses der chemischen Kanzerogenese auslösen.

Das Konzept des Mehrstufenprozesses basiert auf den Versuchen von Beerenblum⁶ und besagt, dass mehrere Stufen der Krebsentstehung unterschieden werden können. Das Mehrstufenkonzept gliedert sich in die drei Phasen Initiation, Promotion und Progression auf. Die Initiation stellt eine irreversible und dauerhaft vererbare Schädigung der DNA dar. Es handelt sich um DNA-Veränderungen, die vom Reparatursystem der geschädigten Zelle nicht repariert werden bzw. nicht mehr repariert werden können und über den Schritt der Replikation zu einer Mutation der Zelle führt. Der Begriff der Promotion bezeichnet die Beschleunigung der Tumorentstehung durch die präferentielle Vermehrung initiiertter Zellen. Durch eine Initiation veränderte Zellen reagieren auf Tumorpromotoren in deutlich stärkerem Maße mit Proliferation als normale Zellen des gleichen Gewebes. Neue und zusätzliche Mutationen führen im weiteren Verlauf zu einer Zunahme der Wachstumsautonomie - dem destruierendem Potential und der Metastasierungsfähigkeit des Tumorgewebes. Diese Phase der zunehmenden Malignität wird als Progression bezeichnet.

Zu den chemischen Kanzerogenen gehören eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer Stoffklassen: darunter anorganische und organische Substanzen, Faser- und Plastikmaterialien, Hormone, etc. Auch einige Arzneimittel fördern das Tumorwachstum, wie zum Beispiel Chemotherapeutika⁵.

Die meisten chemischen Kanzerogene sind nicht als solche mutagen und kanzerogen, sondern bedürfen einer metabolischen Aktivierung durch den Wirtsorganismus. Die aktiven, elektrophilen Metaboliten sind chemisch hoch reaktiv und binden kovalent an nukleophilen Gruppen zellulärer Makromoleküle wie der DNA. Die chemisch veränderte DNA wird bei der Replikation nicht korrekt gelesen. Es werden falsche Sequenzen synthetisiert und es entstehen Mutationen.

Im Säugerorganismus sind eine Vielzahl von Enzymen und enzymatischer Reaktionen bekannt. Sie werden in zwei Klassen unterteilt: Enzyme der Phase-I-Reaktion, die die Oxidation, Reduktion und Hydrolyse körpereigener und körperfremder Substanzen katalysieren, und der Phase-II-Reaktion. Durch Konjugation endogener Substrate mit den zuvor veränderten Stoffen, wird in der Phase-II-Reaktion eine erhöhte Hydrophilie der Metaboliten erreicht. Die Aufgabe der Phase-I-Reaktion wird durch die sogenannte Funktionalisierung erreicht und beinhaltet die Einführung oder Freisetzung funktioneller Gruppen wie $-OH$, $-SH$, $-NH_2$ oder $-COOH$.

Die Enzyme der Biotransformation sind im ganzen Körper vorhanden, wobei die höchsten Konzentrationen in der Leber vorkommen. Die Enzyme sind in der Leber und in den anderen Organen nicht gleichmäßig verteilt. Bestimmte Zellen besitzen eine hohe

Konzentration an Enzymen, während andere Zelltypen im gleichen Organ nur eine geringe oder gar keine Kapazität für Reaktionen der Biotransformation aufweisen.

Tabelle 2: Übersicht über die Enzyme der Biotransformation

Enzyme der Phase-I-Reaktion
Cytochrom-P-450
Flavinabhängige Monooxygenase
Peroxidasen
Prostaglandinsynthase
Esterasen, Amidasen
Aldehyd-, Alkoholderhydrogenase, Aldehyd-, Ketonreduktase
Epoxidhydrolase
Enzyme der Phase-II-Reaktion
Glucuronidierung
Sulfatierung
Acetylierung
Glutathion-S-Transferasen

Die Biotransformation ist im großen Maße organ-, individuum- und speziesspezifisch, sowie substratabhängig induzierbar bzw. inhibierbar, die in einer unterschiedlichen Aktivität der Enzyme resultieren. Diese Variabilität bedingt auch noch die Problematik der quantitativen Beurteilung experimenteller Modellsysteme auf die Risiken für den Menschen.

Neben der Bildung reaktiver Moleküle durch metabolische Aktivierung sind eine Reihe weiterer Prozesse - metabolische Detoxifizierung, DNA-Reperatur und Apoptose - für die Mutagenese von Bedeutung.

1.2 Veränderungen genetischen Materials

Die DNA kann durch verschiedenste physikalische, chemische und virale Einflüsse geschädigt und verändert werden, die bei der Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle eine Rolle spielen. Dabei liegen verschiedene grundlegende Mechanismen der DNA-Schädigung zu Grunde.

Tabelle 3: Übersicht über die Arten der DNA-Schädigung und die zugehörigen molekulargenetischen Veränderungen

Art des DNA-Schadens	Beispiele, ursächliche Agentien
DNA-Basenmodifikation	- DNA-Addukte - O⁶-Methylguanin durch Dimethylnitrosamin - Oxidationsprodukte: Pyrimidinglykole, 8-Hydroxourine, Formamidopyrimidine - Thymindimere unter Einwirkung von UV-Strahlen
DNA-Strangbrüche	- DNA-Einzelstrangbrüche durch reaktive Sauerstoffradikale - DNA-Doppelstrangbrüche durch Aktivierung calciumabhängiger Endonucleasen
AP-Läsionen (Apurinische/Apyrimidinische Stelle)	- Verlust einer DNA-Base durch Hydrolyse der glykosidischen Bindung (wird z.B. durch die N7-Substitution erleichtert)
Crosslinks (Quervernetzungen)	durch bifunktionelle Elektrophile: - Quervernetzung zwischen zwei Basen des gleichen DNA-Stranges (intrastrand Crosslink) - zwischen den beiden DNA-Strängen (interstrand Crosslink) - zwischen der DNA und Kernproteinen (DNA-Protein-Crosslink)
Interkalation	- Veränderung der räumlichen Struktur des DNA-Doppelstranges durch flache Moleküle mit positiven Ladungen (z.B. Ethidiumbromid), welche sich zwischen die negativ geladenen Nukleotide einschieben

Die Folgen fremdstoffinduzierter und spontaner DNA-Schäden sind unterschiedlich. Die meisten der Schäden bleiben mehr oder weniger folgenlos, oder werden schnell und fehlerfrei von den DNA-Reparaturmechanismen der Zellen behoben. Andere Arten von DNA-Schäden können über eine Beeinträchtigung der DNA-Replikation und -Transkription zum Zelltod führen. Schließlich können Schäden der DNA zu Mutationen, zu bleibenden Veränderungen der DNA, führen⁷. Grundsätzlich können die in der Tabelle aufgeführten Mutationstypen unterschieden werden.

Tabelle 4: Übersicht über die verschiedenen Formen der Mutation

Mutationsart	Beispiele
Genmutation	Basenpaarsubstitution, Deletion, Insertion, Genumlagerung, Genamplifikation
Chromosomenmutation	Chromosomenbrüche, Chromosomentranslokation
Genommutation	Chromosomenfehlverteilung, z.B. während der Mitose (numerische Chromosomenaberrationen)

Die meisten Mutationen verursachen keine Veränderung der zellulären Genexpression, da nur ein kleiner Teil des Genoms transkriptionell aktiv in der Zelle vorliegt. Dahingegen können Läsionen in den so genannten Protoonkogenen, den wachstumsregulierenden Genen, zu schwerwiegenden Folgen für die Zelle führen. Protoonkogene kodieren für Proteine der Signaltransduktion und sind an der Regulation von Zellproliferation und -

differenzierung beteiligt. Bei der Umwandlung einer normalen Zelle in eine maligne Zelle sind nicht nur Veränderungen in der Expression wachstumsfördernder Protoonkogene beteiligt, sondern auch der Verlust von so genannten Tumorsuppressorgenen, die ihrerseits die Expression von Zellteilungsproteinen hemmen und damit die Zellteilung kontrolliert verhindern.

Fremdstoffinduzierte Mutationen allein sind nicht unbedingt Voraussetzung für die Entstehung von Krebs. Im Gegensatz zu den DNA-schädigenden Kanzerogenen, die einen definierten Angriffspunkt in der Zelle haben, wirken die so genannten nicht-genotoxischen Kanzerogene über Veränderungen extragenomischer zellulärer Elemente, die meist in einer Induktion der Zellproliferation resultieren.

Grundsätzlich werden proliferationsinduzierende nicht-genotoxische Kanzerogene in zwei Gruppen eingeteilt. Die Gruppe der Stoffe mit zytotoxischer Wirkung verursachen Zellnekrosen mit reaktiver Zellproliferation, die den Versuch des betroffenen Organs, das zerstörte Gewebe zu ersetzen, darstellt. Im Gegensatz zu dieser regenerativen Hyperplasie induzieren Stoffe aus der zweiten Gruppe direkt die Zellteilung ohne die Anwesenheit von Zytotoxizität (additive Hyperplasie)⁵. Hier haben insbesondere hormonelle (Östrogen, Progesteron) und immunologische (Azathioprin, Cyclosporin) Einflüsse an Bedeutung gewonnen.

Letztendlich können sich genotoxische und nicht-genotoxische Substanzen gegenseitig beeinflussen und synergistisch auf die Induktion von Krebserkrankungen wirken.

1.3 DNA Addukte

Chemische Substanzen können direkt, oder indirekt nach Metabolisierung zu reaktiven Zwischenstufen, mit Lipiden, Proteinen und DNA in der tierischen Zelle reagieren. Diese Veränderungen führen zu Inhibition von Enzymen sowie strukturellen Veränderungen von Enzymen und Lipidmembranen. Letztendlich kann auch der Zelltod Folge sein. Die kovalente Bindung fremder Substanzen an die DNA kann bei der Replikation zur Ausbildung von Mutationen führen und die Genexpression beeinflussen. Diese Vorgänge werden als erste essentielle Schritte in der Induktion und Ausbildung von Tumoren betrachtet. Für dieses Modell spricht eine Reihe von experimentellen Befunden. Die Kanzerogenität innerhalb einer Substanzgruppe korreliert dabei mit dem Ausmaß der Addukt-Bildung im Zielorgan, wobei aktivierte Metabolite meist stärkere Kanzerogene als die Muttersubstanz darstellen. In Zellkulturen und tierexperimentelle Untersuchungen konnten über die Bildung von Addukten Mutationen und Tumoren induziert werden.

Die Bedeutung der Addukte als Biomarker kann durch die Einteilung in die drei Kategorien der Exposition (Dosis), der individuellen, genetischen Empfindlichkeit (Anfälligkeit) und der

molekulargenetischen Frühzeichen beschrieben werden⁸. Diese Kategorisierung ist unscharf und gibt die wirkliche Natur der Biomarker nur ungenau wieder, da erhebliche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Faktoren bestehen. Derzeit stellt die Deutung solcher Biomarker noch eine Herausforderung dar.

Protein-Addukte und DNA-Addukte sind Marker für die biologische effektive Dosis, aber ihre Bedeutung ist unterschiedlich. Während Protein-Addukte nicht repariert werden können, wird die Bildung der DNA-Addukte durch die individuelle Fähigkeit der zellulären Reparatur (Enzyme) beeinflusst⁸. Die Marker der genetischen Frühzeichen stellen eine heterogene Gruppe von Veränderungen dar, welche u. a. DNA-Mutationen und grobe chromosomale Schäden einschließen. Sie sind häufiger als der eigentliche Krebs selbst und lassen sich wesentlich früher nachweisen. Marker der Empfindlichkeit beinhalten die Fähigkeit kanzerogene Substanzen zu metabolisieren. DNA-Addukte, können also als Marker der Exposition und der individuellen genetischen Empfindlichkeit gegenüber bestimmter Krebserkrankungen betrachtet und genutzt werden, die durch Determinanten wie der Ernährung oder genetischer Merkmale (metabolischer Polymorphismus, Kapazität der DNA-Reparatur) modifiziert und beeinflusst werden. Die Betrachtung der DNA-Addukte als ‚kumulative, nicht-reparierte DNA-Schäden‘ erweist sich hierbei als hilfreich⁸.

Die wichtigsten Angriffspunkte für reaktive Metabolite an der DNA bilden die Stickstoff- und Sauerstoffatome der Purin- und Pyrimidinbasen. Für sehr viele (elektrophile) Metaboliten ist Guanosin der bevorzugte Reaktionspartner in der DNA.

Die Bildung von DNA-Addukten ist allerdings ein in der Zelle nur in sehr geringer Ausbeute ablaufender Schritt. Selbst potente Kanzerogene alkylieren nur eine von 10^4 bis 10^6 Basen in der DNA.

1.4 Lebensmittelmutagene

Im folgenden Kapitel werden einige wichtige Lebensmittelmutagene besprochen, über die Hinweise auf eine mögliche Krebsgefährdung vorliegen.

1.4.1 Natürliche Kanzerogene in pflanzlichen Nahrungsmitteln

Über die Kanzerogenität von pflanzlichen Nahrungsmitteln liegen wenige Daten vor. Erst 1990 veröffentlichte Ames⁹ eine Arbeit über natürlich vorkommende Kanzerogene in Pflanzen. Dabei erwies sich von 52 in tierexperimentellen Studien untersuchten Pflanzeninhaltsstoffen etwa die Hälfte als krebsauslösend. Diese „natürlichen“ Pestizide werden von Pflanzen produziert, um sich vor Fressfeinden zu schützen.

Tabelle 5: Darstellung ausgewählter pflanzlicher Kanzerogene und der durch diese induzierten Tumoren¹⁰

Kanzerogene Substanz	Pflanze, Vorkommen	Induktion von
Cycasin	Mehl aus Cycaden-Palmen, Cycaden-Nüsse	Lebertumoren im Tierversuch, Leberkrebs beim Menschen durch epidemiologische Studien
nicht bekannt	Adlerfarn (Pteridium aquilinum)	Intestinale Adenokarzinome, Blasen Tumoren bei Ratten; möglicherweise Ösophagustumoren beim Menschen
Sesamol	Sesam	Lebertumoren bei Ratten, DNA-Addukte in Mensch und Tier
Estragol	Basilikum	
Safrol	Safran	Blutgefäßtumoren bei Mäusen
Capsaicin	Paprika	
Methoxypsralene	Petersilie, Sellerie	
Kaffeinsäure	Getränke	
Katechol	Getränke	
Chlorogensäure	Gemüse	
Agaritin	Champignons	
Sinigrin	Kohl Gemüse	

Da anscheinend die Aufnahme geringer Mengen dieser pflanzlichen Kanzerogene mit der Nahrung kein erhebliches Gesundheitsrisiko für den Menschen darstellen, ist die Bedeutung und Interpretation von Tierversuchen genauestens zu überdenken. Positive Ergebnisse aus Hochdosierungsexperimente mit Labornagern können nicht unreflektiert auf den Menschen übertragen werden und können lediglich als Hinweis auf eine mögliche Krebsgefährdung bewertet werden. Ob tatsächlich ein Risiko durch pflanzliche und nicht-pflanzliche Kanzerogene für den Menschen besteht, kann derzeit nicht mit Sicherheit beurteilt werden.

Im Gegensatz dazu haben aktuelle epidemiologische und tierexperimentelle Studien eindeutig demonstriert, dass Gemüse und Obst eine krebshemmende Wirkung auf Mensch und Tier besitzen. So konnte für Personen mit einer gemüsereichen Ernährung ein protektiver Effekt auf die Genese von Gastrointestinaltrakt-, Lungen-, Brustdrüsen- und Prostatumoren ermittelt werden¹¹.

Ballaststoffe, wie z.B. Zellulose, Pektin oder Lignin, führen zu einer Steigerung des Stuhlvolumens und zu einer beschleunigten Darmpassage. Eine verminderte Exposition und Resorption von Kanzerogenen ist die Folge¹². Viele Obst- und Gemüsesorten sind reich an Vitamin C, E und β -Carotin (Vorläufer von Vitamin A), für die aufgrund ihrer Wirkung als Antioxidantien und Radikalfänger ein Schutzeffekt gegenüber Kanzerogenen diskutiert wird¹³. Schließlich kommen zahlreiche Verbindungen in Obst und Gemüse vor, denen eine tumorinhibierende Wirkung zugesprochen wird. Hierzu zählen unter anderem Isothiocyanate, Flavonoide, Indole und Glycosinolate in Kraut und Broccoli, Organosulfide in Knoblauch, Zwiebeln und Lauch, D-Limonen in Zitrusfrüchten¹⁴, Proteaseninhibitoren in Bohnen und verschiedenen Pflanzensamen¹² sowie viele andere¹⁵.

1.4.2 Mykotoxine

Die von Pilzen produzierten Toxine sind ebenfalls den natürlichen Kanzerogenen zuzurechnen. Aflatoxine werden von *Aspergillus*-Arten, einer Pinselschimmelart, produziert und befallen unter anderem für den Menschen wichtige Nahrungspflanzen. Das Aflatoxin B₁ (AFB₁) des *Aspergillus flavus* wird als einer der gefährlichsten Humankanzerogene eingestuft. *A. flavus* befällt vor allem verschiedene Nussarten und Feigen, und wird für die hohen Leberkrebsinzidenzen in Belastungsgebieten wie China und Zentralafrika verantwortlich gemacht. Es wird in der Leber in ein DNA-reaktives Epoxid metabolisiert und löst in Ratten bereits in geringen Dosen Lebertumoren aus. Jüngere Studien haben gezeigt, dass AFB₁ eine spezielle Mutation in einem bestimmten Genabschnitt (Codon 249) des Tumorsuppressorgens p53 auslöst. Durch Extraktion und Analyse von DNA-Proben aus Leberkrebszellen ist eine Beteiligung von AFB₁ in der Genese von Krebserkrankungen möglich¹⁶.

Ochratoxin, das von *Aspergillus ochraceus* und *Penicillium verrucosum* gebildet wird, löste in den achtziger Jahren in verschiedenen Balkanländern die sogenannte Balkan-endemische Nephropathie (BEN) aus. BEN-Patienten weisen neben einer nicht-entzündlichen Nierenverkleinerung eine stark erhöhte Inzidenz von Harnleiter- und Nierentumoren gegenüber der Normalbevölkerung auf. Es ist umstritten, ob Ochratoxine DNA-Addukte bilden und der Auslösung der Krebserkrankungen genotoxische Schäden zugrunde liegen.

1.4.3 Lebensmittelzusatzstoffe

Viele eingesetzte Lebensmittelfarbstoffe sind natürliche Substanzen, wie Vitamine, Provitamine oder Pflanzenfarbstoffe (Chlorophyll, Karotinoide). Im Hinblick auf ein mögliches kanzerogenes Potential sind vor allem synthetisch hergestellte Azofarbstoffe von Bedeutung. Durch die Spaltung der für die Azofarbstoffe typischen Stickstoff-Doppelbindung, durch z.B. intestinale Mikroorganismen, entstehen aromatische Amine, die u. a. Blasentumoren induzieren können¹⁷. Die als Lebensmittelzusatzstoffe zugelassenen Azofarbstoffe sind relativ gut untersucht und derzeit gibt es für die meisten Vertreter dieser Substanzklasse keinen Hinweis auf eine kanzerogene Wirkung. Doch aus Vorsichtsmaßnahmen und gelegentlich auftretender allergischer Reaktionen wurde der Einsatz von Azofarbstoffen bei der Lebensmittelherstellung in den letzten Jahren drastisch reduziert. Durch neue Ergebnisse sind die Diskussionen um den roten Farbstoff Erythrosin (E127), der u. a. für die Herstellung von Cocktailkirschen und Mischobstkonserven Verwendung findet, wieder neu aufgelebt. Zuvor stand Erythrosin bereits schon einmal im Verdacht kanzerogen zu sein, da es im Versuch mit Ratten durch eine Erhöhung der Thyroidea stimulierendes Hormon-Sekretion Schilddrüsentumoren auslöst. Diese

Ergebnisse können aber nicht auf den Menschen übertragen werden, da besonders Ratten auf solche Substanzen empfindlich reagieren, die über den genannten Mechanismus wirken¹⁸. Die neueren Daten zeigen, dass Erythrosin über eine Bindung an Östrogenrezeptoren auch die Teilung von Brustkrebszellen in vitro induzieren kann und darüber hinaus Mutationen im p53-Suppressorgen auslöst¹⁹.

Um dem Verderb von Nahrungsmittel durch Mikroorganismen entgegen zu wirken, findet der Einsatz von Konservierungsmitteln breite Verwendung. Als klassischer Vertreter dieser Substanzgruppe ist das 2-Furylfuramid (AF-2) zu nennen, dass zwischen 1965 und 1974 vor allem in Japan zur Konservierung von Tofu, Wurst- und Fischwaren angewandt wurde. AF-2 löst Vormagen-, Magen- und Brustkrebs bei Labornagern aus und wurde umgehend aus dem Verkehr gezogen²⁰. Auch der Zusatz von Nitrit dient der Unterdrückung von Bakterienwachstum. Durch eine zusätzliche Pökellung solch behandelter Fleischwaren können sich aus Nitrit und Nahrungs-Aminen Nitrosamine bilden. Propionsäure löst in höheren Dosierungen Vormagentumoren bei Ratten aus und wird aus Sicherheitsgründen nicht mehr verwendet²¹. Einsatz fand Propionsäure früher vor allem zur Konservierung von Schnittbrot.

Um Reaktionen mit Luftsauerstoff und so ein Ranzigwerden von Fetten zu verhindern, werden Nahrungsmitteln Antioxidantien zugesetzt. Hier stehen insbesondere die zwei phenolischen Substanzen butyliertes Hydroxytoluol (BHT, E 312) und butyliertes Hydroxyanisol (BHA, E 320) im Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen^{22 23}. BHT wird derzeit nur in Kaugummis verwendet, und BHA ist vor allem in Backwaren, wie Biskuits und Kuchen sowie in Rinderbrühe zu finden. In Fütterungsversuchen an Ratten zeigte sich, dass BHA Vormagentumoren auslöst. Der Mensch besitzt keinen Vormagen, jedoch weist das Epithel des unteren Teils der Speiseröhre strukturelle Ähnlichkeiten mit den Vormagenzellen auf. In Versuchen mit Primaten wurde durch BHA keine Kanzerogenität beobachtet. Daher wird angenommen, dass die Induktion von Tumoren in Nagern auf entzündliche und nicht auf genotoxische Wirkungen beruht. In Initiations-Promotions-Experimenten bewirkte BHA nach Behandlung von Labortieren mit initiiierenden Kanzerogenen eine Verstärkung der Krebsauslösung. Bei einer Vorbehandlung von Versuchstieren mit BHA dagegen wurden überwiegend antikanzerogene Eigenschaften beobachtet. Ähnliche Synergismen und Antagonismen wurden für BHT beobachtet. Aufgrund der derzeitigen Datenlage wird BHA als nicht genotoxische Substanz eingestuft.

Zu der Stoffgruppe der künstlichen Süßstoffe zählen Saccharin, Cyclamat, Aspartam und Acesulfam. Für Saccharin, das sowohl als Natrium-Salz (Na) als auch als Benzoessäurederivat Verwendung findet, konnte 1977 erstmals ein Zusammenhang mit erhöhten Blasenkrebsraten beim Menschen aufgezeigt werden. Seitdem wurden Saccharin und andere künstlichen Süßstoffe besonders heftig diskutiert. In großangelegten Folgestudien mit u. a. 21 000 Diabetikern konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden. In Studien mit Ratten konnte jedoch eine deutliche Erhöhung von

Blasenkarzinomen vor allem bei männlichen Tieren beobachtet werden²⁴. Bei weiblichen Versuchstieren trat dieser Effekt kaum auf, und auch Versuche mit anderen Spezies verliefen negativ. In Versuchen mit Na-Saccharin und Na-Salzen anderer Verbindungen (Na-Glutamat, Na-Citrat) konnte bei Ratten eine gesteigerte Zellproliferation des Harnblasenepithels und tumorpromovierende Effekte beobachtet werden, während Experimente mit Kalium- und Calcium-Salzen keine Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung lieferten. Im Gegensatz dazu weisen Genotoxizitätstests mit Na-Saccharin durchweg negative Ergebnisse auf. Im weiteren Verlauf konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen den Effekten von Na-Saccharin in Ratten mit einem hohen Proteingehalt und einem niedrigen pH-Wert des Harns der Tiere erbracht werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei Fütterung mit hohen Na-Saccharin-Dosen im Harn der Tiere Silikatkristalle ausfallen und vermutlich über eine mechanische Reizung des Blasenepithels zu Entzündungen und im weiteren zur Induktion von Tumoren führen. Da aber der menschlichen Harn anders zusammengesetzt ist und aufgrund einer vergleichsweise geringeren täglichen Aufnahmemenge sind diese Daten nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar. Und es ist anzunehmen, dass Na-Saccharin kein Risikofaktor in der Genese von Tumorerkrankungen beim Menschen darstellt²⁴.

1.4.4 Substanzen, die bei der Zubereitung von Nahrungsmitteln entstehen

Durch die Erhitzung bei der Zubereitung von Nahrungsmitteln entstehen verschiedene Klassen von genotoxischen Kanzerogenen.

1.4.4.1 Nitrosamine

Es sind derzeit etwa 200 nitrosaminhaltige Verbindungen bekannt, wobei vor allem für Modellsubstanzen, wie das hochkanzerogene Dimethylnitrosamin (NDMA), Nitrosopyrrolidin (NPYR) und Nitrosopiperidin (NPiP), genauere Daten vorliegen. Nitrosamine entstehen durch die Umsetzung sekundärer Amine mit salpetriger Säure bzw. deren Salzen und Ester, den Nitriten (nitrosierende Agentien). Die Bildung der Nitrosamine kann entweder exogen, bei der Pökellung von Fleisch, oder endogen, während der Passage durch das saure Milieu des Magens erfolgen. Im letzteren Fall spielen bei der Nitrosaminbildung die alimentäre Aufnahme von nitrathaltigem Trinkwasser und der Verzehr von nitrit- oder nitrathaltigem Gemüse eine Rolle. Nitrate werden dabei im Verdauungstrakt zu Nitriten umgewandelt. Fast alle Nitrosamine werden hauptsächlich in der Leber hydroxyliert und somit metabolisch aktiviert. Die so entstehenden α -Hydroxy-N-Nitrosamine sind instabil und zerfallen zu DNA-reaktiven Metaboliten. Nitrosamine lösen im Tierversuch Krebs aus, wobei je nach chemischer Struktur organspezifische und auch

speziesspezifische Unterschiede vorliegen. Dabei hängt zum einen die Wirkungsstärke der einzelnen Nitrosamine wesentlich von der Aktivierungskapazität der jeweiligen Gewebeart ab. Zum anderen nimmt das kanzerogene Potential von z. B. Alkylnitrosaminen mit steigender Kettenlänge ab. Im Tierversuch induzieren Nitrosamine u. a. Leber-, Ösophagus-, Blasen- und Nasenhöhliertumoren. Eine Reihe von Untersuchungen deutet darauf hin, dass Nitrosamine auch beim Menschen kanzerogenes Potential besitzt. So konnte beispielsweise für China regionale Unterschiede für die Inzidenz von Nasenkrebs ermittelt werden, für die der Konsum von nitrosaminhaltigem Trockenfisch verantwortlich gemacht wird. Auch die erhöhten Ösophaguskrebsraten in Gebieten mit stark nitratbelastetem Trinkwasser wurden mit Nitrosaminen in Zusammenhang gebracht. Auch bei der Auslösung von Krebserkrankungen durch Tabakrauch scheinen Nitrosamine eine wichtige Rolle zu spielen. Allerdings enthält Zigarettenrauch mehr als 1000 verschiedene Substanzen, die ebenfalls an der kanzerogenen Wirkung beteiligt sein können. Interessanterweise erhöht regelmäßiger Alkoholkonsum das Krebsrisiko von Rauchern. Dabei scheint das Enzym Cytochrom 2E1, das an der Aktivierung der Nitrosamine beteiligt ist, durch die induzierende Wirkung von Alkohol ursächlich zu sein. Übertragung der im Tierexperiment nicht-tumorauslösenden Dosierungen (no effect level – NOEL) auf den Menschen, ergeben sich für die stärksten Nitrosamine Werte von $\leq 1\mu\text{g}/\text{Person}/\text{Tag}$. Die tatsächlichen Belastungswerte liegen in Mitteleuropa im Bereich von 1 bis 33 und bei Rauchern von 5 bis 41 $\mu\text{g}/\text{Person}/\text{Tag}$. Ein Schwellenwert für Genotoxizität ist nicht definiert²⁵.

1.4.4.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

PAK entstehen bei der unvollständigen Verbrennung von organischen Substanzen. Es sind ubiquitär vorkommende Umweltschadstoffe, die vor allem in Abgasen vorhanden sind. An Staubteilchen gebunden gelangen sie in die Luft und können so Nahrungsmittel wie Gemüse und Obst kontaminieren. Sie entstehen aber auch beim Braten und Grillen über offener Flamme. PAK entstehen dabei aus dem in das Feuer tropfende Fett, das sich dann über den Rauch auf der Fleischoberfläche ablagert²⁶. Die metabolische Aktivierung erfolgt über hydrolytische Reaktionen (Epoxidhydrolase) des primären Metaboliten, einem Epoxid, zu einem Diol, welches wiederum durch Epoxidierung in Diolepoxide umgewandelt wird. Verbindungen mit einer Epoxidgruppe in der so genannten „bay-region“ weisen dabei ein besonders hohes DNA-reaktives Potential auf. Bei den PAK handelt es sich um Substanzen, die aus mehreren kondensierten aromatischen Ringen bestehen. Zu den kanzerogenen PAK mit fünf aromatischen Ringen zählen Benzo(a)pyren (BaP) und Dibenzo(a,h)pyren. Vor allem Verbindungen aus dieser Gruppe wurden über viele Jahre hinweg als Modellsubstanzen für die Entstehung von Lungen-, Brust- und Vormagenkrebs verwendet. Unter den Substanzen mit sechs Ringen sind die meisten kanzerogen, spielen

jedoch eine untergeordnete Rolle, da sie nur in sehr geringen Mengen in der Umwelt vorkommen. Die Einschätzung der Gefährlichkeit von PAK basiert hauptsächlich auf experimentelle Untersuchungen. Die Extrapolation dieser Ergebnisse auf den Menschen ist problematisch, da zum einen speziesspezifische Unterschiede bestehen und die Aufnahmewege für den Menschen, die primär über die Atemluft und die Nahrung erfolgt, verschieden sind von den im Tierexperiment angewandten dermalen Applikationen. Zum anderen werden beim Menschen nur etwa 10% der PAK aus dem Darm aufgenommen, wohingegen es bei Nagetieren etwa 50% sind.

1.4.4.3 Heterocyclische aromatische Amine

Derzeit sind etwas mehr als 20 heterozyklische aromatische Amine (HAA), die aus verschiedenen Lebensmitteln - wie z.B. Fleisch und Fisch, aber auch aus Wein und Bier - isoliert werden konnten, bekannt. HAA sind aber auch ubiquitär in der Umwelt nachweisbar, so z. B. in Raum- und Umgebungsluft, in Fluß-, Regen- und Abwasser, im Zigarettenrauch und in Diesel-Abgasen^{27 28 29}.

HAAs haben eine planare, aromatische Struktur mit einem oder mehreren Stickstoffatomen und einer exozyklischen Aminogruppe. Eine Ausnahme bilden die HAA Harman, Norharman und Lys-P-1. Die Bildung der HAA während der Zubereitung von Fleischprodukten ist von einigen verstärkenden und inhibierenden Faktoren abhängig. Zu diesen zählen unter anderem Zubereitungsdauer, Zubereitungsart und Temperatur, die Konzentration von Vorläufer-Produkten (Precursor) sowie der Wasser-, Fettgehalt und der pH-Wert³⁰. Während Amino-carboline (pyrolytische HAA) durch die Bildung freier Radikale bei Temperaturen über 300°C entstehen, bilden sich Aminoimidazoazaarene (thermische HAA) bereits bei gewöhnlichen Haushaltsmethoden (Kochen, Braten, Grillen, etc.) aus Kreatinin, Zucker und freien Aminosäuren. Diese so genannte Maillard-Reaktion ist auch für die Entstehung der Bräunung, des typischen Geschmacks und des aromatischen Duftes solcher Lebensmittel verantwortlich^{31 32 33}. Die häufigsten HAA in einer typischen westlichen Ernährung sind PhIP, MeIQx, DiMeIQx, IQ und AαC³⁴. Besonders häufig sind PhIP und MeIQx für die genotoxische Aktivität in entsprechend zubereiteten Fleischwaren verantwortlich³⁵.

Heterozyklische aromatische Amine haben sich nach metabolischer Aktivierung in vivo und in vitro als potente Mutagene erwiesen^{36 37}. In ihrer biologischen Wirkung weisen die Verbindungen starke Unterschiede auf, so gehören die Imidazo-quinoline und -quinoxaline zu den am stärksten mutagenen Substanzen im Amestest, einem bakteriellen Mutagenesetest. Allerdings zeigt sich dieser Effekt der Quinoline und Quinoxaline in anderen Kurzzeittests auf genotoxische Wirkung weniger stark ausgeprägt. Für die Amino-carboline sowie Pyridine, die im Amestest eine deutlich geringere Mutagenität aufweisen, zeigt sich in einigen Tests sogar vergleichbare oder auch stärkere Aktivität^{38 39}. Dieses trifft

allerdings nicht für Harman und Norharman zu, die in keiner dieser Kurztests Mutagenität aufweisen, aber das mutagene Potential anderer HAA verstärken können. Die Genotoxizität der HAA konnte anhand von Kultivierungsversuche mit Zellen der weiblichen Brust demonstriert werden, wobei die Induktion von Chromosomen-Aberrationen, der Austausch von Erbinformationen zwischen Schwesterchromatiden, DNA-Strang-Brüche und die Aktivierung des DNA-Reparatur-Systems beobachtet werden konnten.

Ein kanzerogenes Potential konnte vor allem für die Gruppen der Quinoline, Quinoxaline, Pyridine und Furopyridine in Langzeit-Studien an Ratten, Mäusen und auch Primaten nachgewiesen werden^{40 41} - vor allem in der Leber, aber auch in Kolon, Lunge, Brustdrüse, Prostata, Harnblase, Zymbaldrüse und der Haut der Labortiere konnte die Tumorenbildung provoziert werden. Hierbei zeigen sich Unterschiede zwischen Mäusen und Ratten, sowie in der Organspezifität zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren. Die Zusammenfassung der derzeitigen Daten über HAA als Mamma-Karzinogen in Versuchstieren schätzt die karzinogene Potenz der HAA in folgender absteigender Reihenfolge ein: PhIP $\geq$ MeIQ > IQ > MeIQx >> A(α)C⁴². Die TD₅₀-Werte (die täglichen Aufnahmemengen, die bei 50% der Versuchstiere zu Tumoren führen) liegen bei der Ratte für die meisten Substanzen zwischen 0,5 und 34 mg/ kg, bei Mäusen zwischen 5 und 41 mg/ kg⁴³. Die durchschnittlichen täglichen Aufnahmemengen wurden beim Menschen mit westlicher Ernährung auf 3,5 -100µg/ Tag geschätzt, eine Menge, die um den Faktor 1000 - 10 000 niedriger ist, als jene, die im Tierversuch erforderlich ist, um Tumore zu induzieren⁴³.

HAAs werden in zwei Schritten metabolisch aktiviert. Dabei stellt der erste Schritt die Hydroxylierung (Oxidation) der exozyklischen Aminogruppe dar. Diese Reaktion zu den entsprechenden Hydroxylaminen wird vor allem durch das Phase-I-Enzym Cytochrom P450 (CYP1A2)⁴⁴ katalysiert. Aber auch für die Cytochrom-Isoenzyme CYP1A1 und CYP1B1 konnte ein geringer Effekt auf die N-Hydroxylierung einiger HAA nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf erfolgt die Esterbildung mit Acetyl- oder Sulfatgruppen mittels O- oder N-Acetyltransferasen bzw. Sulfotransferasen⁴⁵. Die kovalente Bindung solch aktivierter HAA erfolgt hauptsächlich über die exozyklische Aminogruppe an das Kohlenstoffatom in Position acht des Guanins⁴⁶. Auch für die Epithelzellen der humanen Brust konnten die entsprechenden Enzyme der Phase-I- und der Phase-II-Reaktion nachgewiesen werden, woraus sich schließen lässt, dass eine Aktivierung bzw. Deaktivierung potentieller Karzinogene in den Zellen des Brustgewebes vermutet werden kann⁴⁷.

Beim Menschen wird zusätzlich zwischen „schnellen“ und „langsamen“ Acetylierern unterschieden. Langsame Acetylierer weisen in einem der Gene, die für die N-Acetyltransferase 2 (NAT2) kodieren, Mutationen auf, die zu einer Beeinträchtigung der Funktion führen. Humanstudien haben gezeigt, dass Personen mit NAT1-Genotyp (schnelle Acetylierer) mit einer zusätzlich hohen CYP1A2-Aktivität ein hochsignifikantes

Risiko an Dickdarmkrebs zu erkranken besitzen, wenn gleichzeitig ein hoher Fleischkonsum besteht^{48 49}.

Diese Ergebnisse, zusammen mit den Beobachtungen aus epidemiologischen Studien, lassen die HAA als potentielle Risikofaktoren in der Ätiologie des humanen Mammakarzinoms und anderer Tumorerkrankungen vermuten.

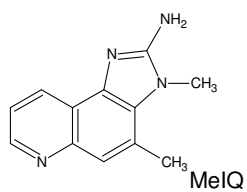
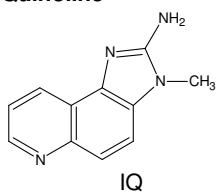
Tabelle 6 Übersicht, Klassifikation und Abkürzungen der heterozyklischen aromatischen Amine

Name und Klassifikation	Abkürzung
Aminoimidazo-Azaarene	
2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinolin	IQ*
2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinolin	MeIQ*
2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalin	IQx
2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalin	4-MeIQx
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalin	8-MeIQx*
2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalin	4,8-DiMeIQx
2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalin	7,8-DiMeIQx
2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalin	TriMeIQx
2-Amino-4-Hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalin	4-CH ₂ OH-8-MeIQx
2-Amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5- <i>g</i>]quinoxalin	7,9DiMeIgQx
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5- <i>b</i>]pyridin	PhIP*
2-Amino-1,6-dimethylimidazol[4,5- <i>b</i>]pyridin	DMIP
2-Amino-1,5,6-trimethylimidazol[4,5- <i>b</i>]pyridin	TMIP
2-Amino-1-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)imidazol[4,5- <i>b</i>]pyridin	4'-OH-PHIP
2-Amino-1,6-dimethylfuro[3,2- <i>e</i>]imidazol[4,5- <i>b</i>]pyridin	IFP
Amino-carboline	
2-Amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indol	AαC*
2-Amino-3-methyl-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indol	MeAαC*
1-Methyl-9 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indol	H
9 <i>H</i> -Pyrido[4,3- <i>b</i>]indol	NH
3-Amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indol	Trp-P-1*
3-Amino-1-methyl-5 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indol	Trp-P-2*
2-Amino-6-methyldipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazol	Glu-P-1*
2-Aminodipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazol	Glu-P-2*
2-Amino-5-phenylpyridin	Phe-P-1
4-Amino-6-methyl-1 <i>H</i> -2,5,10 <i>b</i> -tetraazafluoranthren	Orn-P-1
4-Amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -pyrrolo[3,4- <i>f</i>]benzimidazole-5,7-dion	Cre-P-1
3,4-Cyclopentenopyrido[3,2- <i>a</i>]carbazol	Lys-P-1

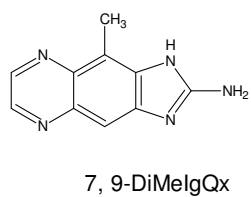
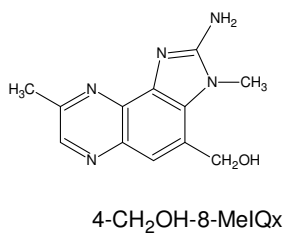
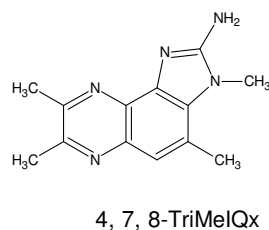
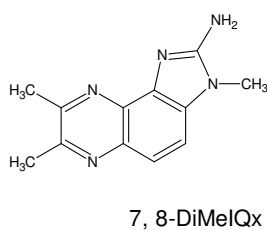
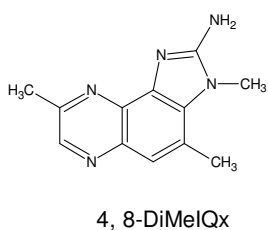
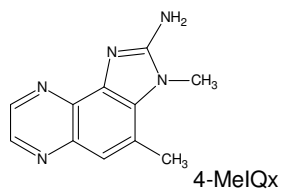
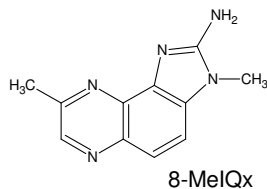
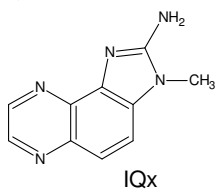
* mutagen und carcinogen

Abbildung 1 Darstellung der Einteilung und Strukturformeln der heterozyklischen aromatischen Amine I

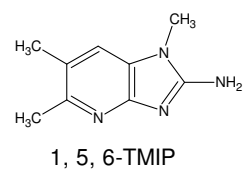
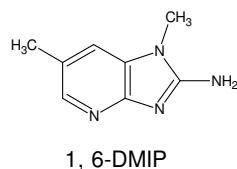
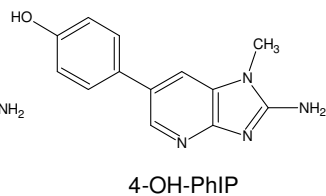
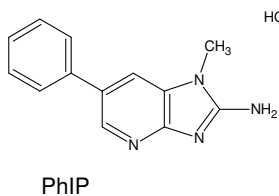
Quinoline



Quinoxaline



Pyridine



Fuopyridine

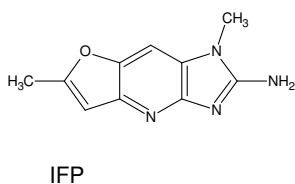
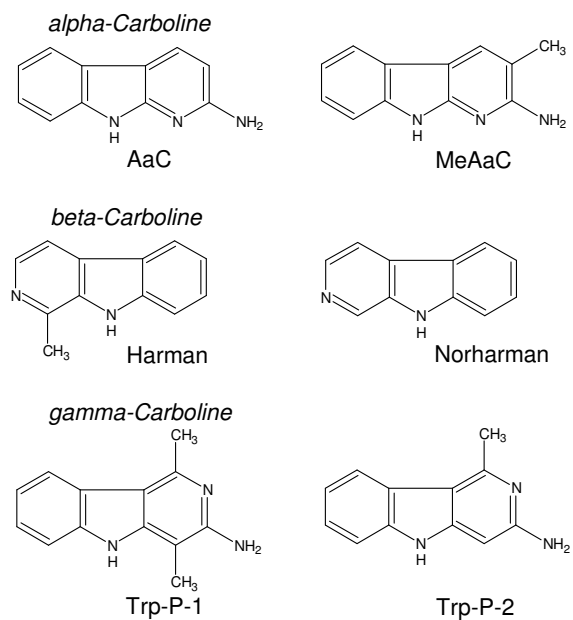
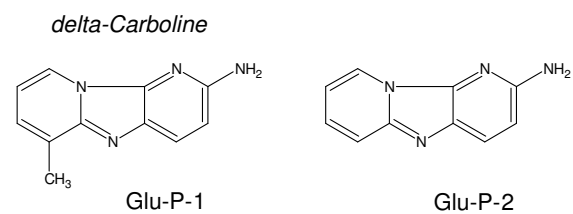


Abbildung 2 Darstellung der Einteilung und Strukturformeln der heterozyklischen aromatischen Amine
II

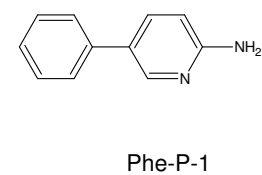
Pyridoindole



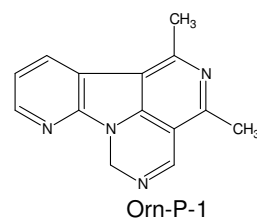
Pyridoimidazole



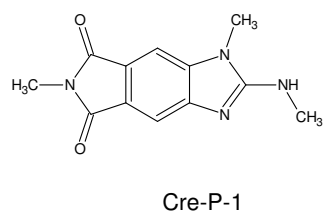
Phenylpyridine



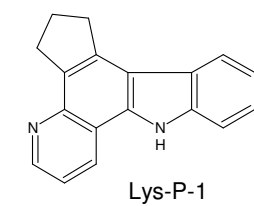
Tetraazafluorantene



Benzimidazole



Carbazole



1.4.4.4 Acrylamid

Ähnlich wie die HAA entsteht Acrylamid als Nebenprodukt über die so genannte Maillard-Reaktion aus Proteinen und Kohlenhydraten. Bislang konnten drei wesentliche Faktoren für die Bildung von Acrylamid identifiziert werden^{50 51}. Das Kohlenstoffgerüst des Acrylamids, das zu der Gruppe der α , β -ungesättigten Carbonylverbindungen zählt, liefert die Aminosäure Asparagin. Des Weiteren ist die Gegenwart von reduzierenden Zuckern sowie Temperaturen von über 100 °C Voraussetzung. Insbesondere konnte Acrylamid in stärkehaltigen Lebensmitteln, wie z.B. Kartoffel- (Chips, Pommes Frites) und Getreideprodukten (Kekse, Knäckebrot, Brot, Zwieback, Zerealien), nachgewiesen werden. Die tägliche alimentäre Aufnahmemenge von Acrylamid wird auf der Basis schwedischer Untersuchungen auf 50 μg / Tag geschätzt⁵².

Tabelle 7: Acrylamidgehalt ausgewählter Lebensmittel [μg / kg Lebensmittel]⁵³

	Median	min -max
Kartoffelchips	750	130-3680
Pommes Frites	410	300-1100
Butterkekse	300	140-890
Knäckebrot	140	-2840
Frühstückszerealien	50	-640

Acrylamid besitzt neben einer neurotoxischen Wirkung auf das periphere und zentrale Nervensystem, welche tierexperimentell und an exponierten Arbeitern nachgewiesen werden konnte⁵⁴, ein kanzerogenes Potential. Dieses konnte mittels Kanzerogenitätsstudien an Ratten eindeutig belegt werden, bei denen die Tiere mit Dosen zwischen 0,5 und 2 mg/ kg Körpergewicht/ Tag Acrylamid gefüttert wurden. Hierbei ließen sich vor allem Skrotummesotheliome sowie Tumoren der Schilddrüse und der Mamma nachweisen^{55 56}.

Die Datenlage zur Kanzerogenität beim Menschen ist nicht so eindeutig. Drei Kohortenstudien, die keine signifikante Korrelation zwischen einer Exposition am Arbeitsplatz und Krebsinzidenzen ermitteln konnten, müssen aufgrund einer zu geringen Anzahl untersuchter Personen oder einer zu geringen Acrylamid-Exposition im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Einschränkung betrachtet werden^{57 58 59}. Und auch eine schwedische Fall-Kontroll-Studie an Tumorpatienten, die die Einflüsse eines Verzehrs potentiell Acrylamid-belasteter Lebensmittel auf die Bildung von Dickdarm-, Nieren- und Blasen Tumoren untersuchte und keine Zusammenhänge ermitteln konnte, muss aufgrund methodischer Schwächen mit Vorsicht bewertet werden⁶⁰.

Die bisher vorliegenden Daten zu Mutagenität und Genotoxizität von Acrylamid weisen auf ein nur schwaches mutagenes und genotoxisches Potential hin. Acrylamid ist in in-vitro Mutagenitätstests mittels Bakterien- und Säugerzellkulturen mit und ohne metabolische

Aktivierung negativ, während Glycidamid, das während der Phase-I-Reaktion durch die Epoxidierung von Acrylamid mittels der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase entsteht und wesentlich leichter mit der DNA reagiert als Acrylamid, mutagenes Potential zeigt. Für Acrylamid konnte in vivo und in vitro die Induktion von Mikrokernen, Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatid-Austausch beschrieben werden, die auf die Bildung von Chromosomenmutationen hindeuten. Doch zeigen in vivo Studien an Nagern, das hierfür Dosen von 3-150 mg/ kg Körpergewicht benötigt werden⁶¹, und in tierexperimentellen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, das Acrylamid extrem langsam mit der DNA reagiert und Addukte mit Glycidamid überwiegen.

Ingesamt betrachtet, ist eine endgültige Aussage über die Gefährdung des Menschen durch Acrylamide, insbesondere durch Acrylamid-haltige Lebensmittel, aufgrund der derzeitigen Datenlage nicht möglich.

1.5 Brustkrebs

Das Mammakarzinom ist in der Bundesrepublik Deutschland die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen. 1999 lag die Zahl der weiblichen Krebstoten bei 102 565, davon starben 17 616 an Brustkrebs (WHO/ IARC, 1999). Die geschätzte Zahl der Neuerkrankungen liegt bei jährlich 42 600 Fällen. (DKFZ).

Es sind zahlreiche Risikofaktoren⁶², die mit Brustkrebs assoziiert sind, bekannt. Und dennoch ist die Ätiologie des humanen Mammakarzinoms nicht genau verstanden.

1.5.1 Hereditäre Risikofaktoren

Die hereditären Risikofaktoren für das Mammakarzinom stellen einen bedeutenden Risikofaktor dar, doch nur bei etwa 10 Prozent der Frauen mit Brustkrebs kann eine familiäre Belastung vorgefunden werden. Dabei sind Verwandtschaftsgrad und Alter der Patientinnen sowie das Alter und die Anzahl der Verwandten mit Brustkrebs beeinflussende Faktoren⁶³.

Auch genetische Korrelate (Mutationen), in Genen wie z. B. BRCA1, BRCA2, p53, ATM, PTEN, MLH1 und MSH2 konnten identifiziert werden. Die genaue Bedeutung der meisten Mutationen ist nicht hinreichend geklärt. Diese prädisponieren teilweise für spezifische metabolische Eigenschaften und damit zur Detoxifikationsfähigkeit DNA-schädigender Substanzen, die wiederum zur Initiation und Promotion von Brusttumoren und anderer Krebserkrankungen führen.

Das Mammakarzinom zeigt eine deutliche Geschlechtspräferenz und betrifft Frauen hundertmal häufiger als Männer. Das Risiko einer Brustkrebserkrankung nimmt bis zum 50. Lebensjahr stark zu und erhöht sich langsam weiter mit zunehmenden Alter. Derzeit wird angenommen, dass diese altersspezifische Veränderung den Einfluss der hormonellen Veränderungen im Rahmen der Menopause widerspiegelt.

1.5.2 Hormon- und Reproduktionsfaktoren

Östrogene und Progesterone sind essentielle Hormone für die normale Entwicklung und Funktion der Brustdrüse. Sie regulieren die Proliferation der Brustzellen und stimulieren die Synthese von DNA, die Zellteilung sowie die Produktion von Wachstumsfaktoren. Die Produktion der Östrogene (Estradiol, Estriol, Estron) wird durch die ovariäre Funktion moduliert und bedingt Menarche, Menstruationszyklus, Gravidität und Menopause der Frau. In der Postmenopause wird die Östrogenproduktion in den Ovarien eingestellt. Es wird dann vor allem Dehydroepiandrosteron (DHEA) in den Nebennieren gebildet und im peripheren Fettgewebe zu Estradiol und Estron metabolisiert⁶⁴.

Zu den Schlüsselerisikofaktoren des Brustkrebses zählen die so genannten Reproduktionsfaktoren: Alter bei Menarche, Alter bei der ersten Lebendgeburt, Alter bei einsetzender Menopause, Parität und Stillen, und können vor allem durch die Exposition gegenüber Östrogenen und ihren Spiegel in Blut und Gewebe sowie deren zeitliche Variation erklärt werden. Diese hormonellen Einflüsse konnten tierexperimentell und anhand verschiedener anderer Studien bestätigt werden^{65 66 68}. Frühe Menarche, Nulliparität, späte Menopause und eine Hormonsubstitutionstherapie gehen über erhöhte oder verlängerte Östrogen-Exposition mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher. Andererseits wirken sich eine voll ausgetragene Schwangerschaft in jungen Jahren oder Stillen über erniedrigte und verkürzte Östrogen-Spiegel protektiv aus. Einige Arbeiten haben auch gezeigt, dass nach metabolischer Aktivierung Östrogene selbst zytotoxische und genotoxische Eigenschaften besitzen. Eine mögliche Bedeutung der Hormone Progesteron, Prolaktin und insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor in der Genese des Mammakarzinoms ist bislang nicht eindeutig geklärt.

Auch im Knochengewebe finden sich Östrogen-Rezeptoren, die hoch-sensibel auf zirkulierendes Östrogen reagieren. Daher könnte die Mineralisationsdichte des Knochens als Marker für eine Langzeitexposition gegenüber endogenem Östrogen dienen. Bislang gibt es nur vereinzelt Studien hierzu.

Eine früh einsetzende Menarche ist mit einem erhöhtem Risiko Brustkrebs zu entwickeln, assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich abhängig vom Zeitpunkt der Menarche das Brustkrebsrisiko in etwa zwei Jahresschritten um jeweils zehn Prozent reduziert⁶⁷. Anhand von Zwillingsstudien konnte festgestellt werden, dass bei Zwillingen mit eher einsetzender

Menarche sich Brustkrebs früher entwickelt als bei den Zwillingsgeschwistern⁶⁸. Das spätere Einsetzen des Menstruationszyklus und die damit spätere und insgesamt kürzere Exposition gegenüber Östrogenen könnte eine Erklärung für diese Beobachtung sein.

Je jünger Frauen bei ihrer ersten voll ausgetragenen Schwangerschaft sind, desto niedriger ist ihr Brustkrebsrisiko⁶⁹. So haben Frauen, die nach dem 30. Lebensjahr erstmals schwanger werden, sogar ein höheres Risiko als Frauen ohne Schwangerschaften. Hierbei scheinen sich die während der Gravidität auftretenden zellulären Differenzierungen protektiv auf die Entwicklung einer Krebserkrankung auszuwirken.

Frauen ohne Schwangerschaften haben ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs als Frauen mit einer oder mehreren Schwangerschaften⁶⁶, insbesondere scheinen hiervon Frauen im Alter von 45 und 50 Jahren betroffen zu sein. Ob mehrere Schwangerschaften sich protektiv auf das Brustkrebsrisiko auswirkt, ist in der Vergangenheit kontrovers diskutiert worden.

Im Rahmen von zahlreichen Fall-Kontroll- und Kohorten-Studien konnte ein protektiver Effekt des Stillens aufgezeigt werden^{68 70 71 72}. Das Stillen scheint hierbei die Wiederherstellung des ovarialen Zyklus und dessen Einfluss auf die Östrogenhomöostase hinauszuzögern. Andererseits könnte sich dieser Zusammenhang durch die erhöhten Prolaktin-Spiegel und die gleichzeitig niedrigen Östrogen-Spiegel erklären.

In der Milch stillender Mütter konnten aber auch verschiedene Substanzen wie Xenobiotika, Umweltschadstoffe⁷³, wie z. B. Organochlorverbindungen, identifiziert werden, die in Nagetieren kanzerogen wirken und deren Signifikanz für den humanen Brustkrebs bislang nicht bestätigt werden konnten. Seit kurzem sind weitere karzinogene Substanzen in das Interesse der Wissenschaft gerückt, die in der Brustmilch von Menschen⁷⁴ und Tieren^{75 76 77} nachweisbar sind und denen eine Rolle in der Genese von Brusttumoren zu zuschreiben ist.

Ein höheres Brustkrebsrisiko zeigt sich auch bei Frauen mit später Menopause. Für Frauen unter dem 40. Lebensjahr mit bilateraler Ovariectomie konnte ein um etwa 50 Prozent reduziertes Brustkrebsrisiko aufgezeigt werden⁷⁸, was auf eine verkürzte prämenopausale Exposition gegenüber endogenen Hormonen zu beruhen scheint.

Für reduzierte Östrogenwerte, im Rahmen von Ovariectomien oder medikamentöser Therapien mit Antiöstrogenen (Tamoxifen), konnte ein geringeres Risiko ermittelt werden. Ungeachtet der genannten Beobachtungen zeigt sich in anderen Studien, dass die Korrelation zwischen Brustkrebsrisiko und Östrogen-Serum- und Östrogen-Urin-Spiegel nicht konsistent ist.

Nach derzeitigem Stand ist von einem Zusammenhang zwischen einer Hormonersatztherapie und einem erhöhtem Brustkrebsrisiko auszugehen. Eine Langzeit-Substitution mit Östrogenen ist dabei mit dem höchsten Risiko assoziiert, wohingegen eine Kurzzeit-Therapie anscheinend das Risiko an Brustkrebs zu erkranken nicht signifikant beeinflusst. Und auch eine simultane Substitution von Östrogenen und Progesteron/ Progestin scheinen das Risiko positiv zu verändern^{79 80}. Zahlreiche epidemiologische

Studien konnten auch keine Assoziation zwischen oralen Kontrazeptiva und einem Brustkrebsrisiko demonstrieren⁸¹.

Der Östrogen-Spiegel der prämenopausalen Frau ist während des Menstruationszyklus und der Schwangerschaft ständigen Fluktuationen unterworfen und aufgrund von intra- und interindividuellen Schwankungen der Hormonkonzentrationen werden reproduzierbare Messungen in den prämenopausalen Jahren erschwert. Daher zeigt sich die Datenlage nicht einheitlich. So gibt es nur eine geringe Anzahl von prospektiven Studien, die den Zusammenhang zwischen Serum-Östrogen-Konzentration und Brustkrebsrisiko untersucht haben. Dahingegen zeigt sich die Datenlage postmenopausaler Frauen klarer^{82,83}. Eine Übersicht neun prospektiver epidemiologischer Studien konnte eine positive Beziehung zwischen Estradiol-Serum-Konzentration und Brustkrebsrisiko aufzeigen⁸⁴. Für adipöse postmenopausale Frauen konnten erhöhte Östrogen-Spiegel nachgewiesen werden, die auf der im Fettgewebe ablaufenden Konversion von adrenalen Androgenen zu Östrogenen beruhen, und mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs einhergehen⁸⁵.

1.5.3 Soziodemographische Risikofaktoren

Die Brustkrebsinzidenz zeigt geographische und ethnische Unterschiede. Mittels epidemiologischer Beobachtungen der Krebsinzidenz bei Einwanderern und Beobachtungen geografischer Unterschiede, ließ sich der Einfluss von Umweltfaktoren und Lebensweisen auf die Ätiologie von Brustkrebs- und anderer Krebserkrankungen aufzeigen. So ist die Brustkrebsinzidenz in Nord-Amerika und Nord-Europa am höchsten und am niedrigsten in Asien, Afrika und den mediterranen Ländern⁸⁶. Allerdings stieg in den letzten Jahren, einhergehend mit einer zunehmend westlicheren Lebensweise, die Mortalitätsrate für Brustkrebs auch in Japan und China an⁸⁷. Für Einwanderinnen und deren nachfolgenden Generationen konnte eine Angleichung der Brustkrebsinzidenz auf das Niveau der einheimischen Bevölkerung beobachtet werden⁸⁸.

Mortalität und Inzidenz weisen aber auch regional Unterschiede auf. So lassen sich z. B. für Deutschland in erster Linie deutliche Unterschiede zwischen den alten und neuen Bundesländern mit den niedrigeren Raten im Osten und den höheren Raten im Westen erkennen. Eine gewisse Häufung von Regionen mit höheren Raten deutet sich für das westliche Rheinland und einige Regionen im Nordwesten Niedersachsens an (DKFZ, 2004). Durch Untersuchungen an den zahlreichen, multikulturellen Bevölkerungsgruppen in den Vereinigten Staaten konnte für die ethnischen Hauptgruppen gezeigt werden, dass Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung aller Frauen ist. Dennoch bestehen deutliche ethnische Unterschiede für die Inzidenz- und Mortalitätsraten⁸⁹. Dieser zwischen den ethnischen Gruppen bestehende Unterschied scheint mit den Faktoren sozioökonomischen Status und Lebensweise assoziiert zu sein⁹⁰. Frauen mit höherem sozioökonomischem

Status (Ausbildungs-, Berufsgrad) haben ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Dabei scheint das unterschiedliche Reproduktionsverhalten innerhalb der einzelnen sozioökonomischen Gruppen über die Modulation der Reproduktionsfaktoren das Brustkrebsrisiko zu beeinflussen⁹¹.

1.5.4 Ernährungsfaktoren

Zahlreiche tierexperimentelle und ökologische Studien zeigen eine positive Korrelation zwischen der Aufnahme von Fett mit der Ernährung und einem erhöhten Brustkrebsrisiko. Doch die Datenlage ist nicht eindeutig. Hierbei muss zwischen Ergebnissen aus prospektiven Fall-Kontroll-Studien und Kohortenstudien unterschieden werden.

In einer gepoolten Analyse mit über 300 000 Frauen aus Kohortenstudien konnte keine Beziehung zwischen der Aufnahme gesättigter und ungesättigter Fettsäuren sowie Brustkrebs aufzeigt werden⁹². Diese Untersuchungen wurden mit Frauen in der Postmenopause durchgeführt. Im Gegensatz dazu konnte eine Assoziation zwischen Brustkrebs bei prämenopausalen Frauen und einer erhöhten alimentären Fettaufnahme im Rahmen der 'Nurses' Health Study', bei der 90 655 Frauen im Alter zwischen 26 und 45 einen Fragebogen zu Ernährungsgewohnheiten ausfüllten und nach vier Jahren nochmals befragt wurden, gefunden werden⁹³. Im Rahmen von Metaanalysen, die im Juli 2003 durchgeführt wurden, konnte ein gering signifikanter Einfluss einer hohen Fetternährung und einem Brustkrebsrisiko ermittelt werden⁹⁴. Diese Untersuchungen wurden mit Frauen in der Prä- und Postmenopause durchgeführt.

Während einige Studien einen protektiven Effekt einer fettarmen Ernährung auf das Brustkrebsrisiko aufzeigt haben, konnte dies durch andere Studien nicht bestätigt werden. Obwohl diese Frage immer noch kontrovers diskutiert wird, scheint sich aber insgesamt nur ein geringer Zusammenhang abzuzeichnen. Auch die Rolle der alimentären Fettaufnahme während der Kindheit und des Erwachsenen Alters, die Bedeutung der alimentären Aufnahme von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren sowie die genaueren Mechanismen bleiben unklar.

In einer Fall-Kontroll-Studie in Uruguay wurde ein Zusammenhang zwischen einer Ernährung mit myoglobinhaltigem Fleisch und Brustkrebsrisiko beobachtet⁹⁵. Eine neuere Studie konnte eine Assoziation zwischen der häufigen Aufnahme von stark gebratenem/ gegrillten Fleisch und Brustkrebs aufzeigen⁴⁷. Trotz allem sind die genaueren Mechanismen der tumorfördernden Wirkung einer fleischreichen Ernährung nicht endgültig geklärt. Dabei scheint eine hohe Aufnahme von so genannten versteckten Fetten im Fleisch und/ oder aber auch die Aufnahme von bei der Zubereitung von Fleischprodukten entstehenden genotoxischen Substanzen eine ursächliche Rolle.

Körpergewicht und -größe sind Indikatoren für den Ernährungszustand. Ein hoher BMI scheint dabei kein Risiko für Frauen in der Prämenopause darzustellen. Bei Frauen in der Postmenopause ist der BMI nur ein schwacher Risikofaktor⁹⁶ und scheint dabei auf erhöhten Östrogenwerten zu beruhen.

Die Beziehung von Alkoholkonsum und Brustkrebsrisiko sind seit mehreren Jahrzehnten untersucht. Im Vergleich zu Nicht-Trinkern⁹⁷ konnte für eine tägliche Alkoholaufnahme von mindestens 60 g/ d ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken, ermittelt werden^{98 99}. Die genaueren, zum Tragen kommenden Mechanismen sind aber bislang nicht geklärt. Mit Alkoholkonsum einhergehende Östrogen- und insulinähnlicher Wachstumsfaktor-Spiegel scheinen dabei eine Rolle zu spielen^{100 101}. Beobachtungen an postmenopausalen Frauen mit regelmäßigem Alkoholkonsum und niedriger Folsäure-Aufnahme, für die ein größeres Brustkrebsrisiko ermittelt werden konnte, scheinen dies zu bestätigen^{102 103}.

Vermehrter Koffeingenuss wurde in Zusammenhang mit Schmerzen im fibrozystisch-veränderten Brustgewebe gebracht^{96 104}. Neuere Untersuchungen konnten allerdings eine Beziehung zwischen Koffein, Schmerzsymptomatik und Brustkrebs nicht bestätigen.

Die zwei karzinogenen Hauptvertreter, die durch Hitzeeinwirkung aus Fleischprodukten entstehen und die Ernährung aufgenommen werden, sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und heterozyklische aromatische Amine. Die PAK entstehen durch Pyrolyse von Fett. Beim Grillen von Fleisch z. B. führt das Tropfen von Fett auf die Kohle zur Bildung von PAK, das sich dann über den Rauch im Fleisch ablagert. Doch bislang konnte kein Beweis für den Einfluss dieser Substanzen auf das Erkrankungsrisiko für Brustkrebs und anderer Tumorerkrankungen erbracht werden.

Auch die Datenlage zum Einfluss einer Ernährung mit Obst und Gemüse ist nicht eindeutig^{105 106}. Für die beinhaltenen Vitamine α -, β -Carotine, Vitamin A und C, Tocopherol und Lutein konnte vor allem für prämenopausale Frauen mit positiver Familiengeschichte für Brustkrebs ein protektiver Effekt nachgewiesen werden^{107 108}.

Für die Bildung benignen und malignen Kolon-Tumoren hat sich eine medikamentöse Therapie mit nicht-steroidalen Antirheumatika als protektiv erwiesen. Untersuchungen an Brustkrebs erkrankten, konnten keinen Zusammenhang aufzeigen¹⁰⁹. Die Studienergebnisse mit COX₂-Hemmern werden derzeit erwartet.

1.5.5 Umweltfaktoren (Environment)

Die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung in jungen Jahren ist mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko verbunden. Dabei scheint die empfindlichste Phase im Alter zwischen 10 und 14 Jahren - in der präpubertalen Phase - zu liegen. Doch zeigt sich die größte Risikoerhöhung bei einer Strahlenexposition ab dem 45. Lebensjahr¹¹⁰.

Die Beziehung von Rauchen und Brustkrebserkrankungen wird kontrovers diskutiert. Während für Lungenkrebs Rauchen als kausales Agens identifiziert werden konnte¹¹¹, bleibt der Einfluss von Rauchen auf die Genese von Brustkrebs ungeklärt. Einige Studien fanden keinen Zusammenhang⁹⁶, andere wiederum eine schwache Korrelation und andere wieder fanden einen negativen Zusammenhang. Letzterer scheint dabei auf Anti-Östrogene Wirkungen des Rauchens zu beruhen. Dabei scheinen Alkoholkonsum und hormonelle Faktoren das Risiko zu beeinflussen.

Infektionen mit viralen Erregern sind an der Entstehung von Leberkrebs (Hepatitis B- und Hepatitis C-Viren), Gebärmutterhalskrebs (Papillomviren), Lymphomen (Epstein-Barr-Virus), einer bestimmten Leukämie (HTLV-1) sowie möglicherweise noch anderen Krebsarten beteiligt. Bei der Entstehung von Magenkrebs ist ein ursächlicher Zusammenhang mit einer Infektion mit *Helicobacter pylori* sehr wahrscheinlich. Die Bedeutung der Identifizierung von Fragmenten des Epstein-Barr-Virus Genoms im Gewebe von invasiven Brustkrebstumoren ist nicht geklärt^{112 113}.

Substanzen mit Östrogen-ähnlichen Eigenschaften sind in den letzten Jahren in Verdacht geraten die Ausbildung von Brusttumoren zu beeinflussen. Diese Substanzgruppe, darunter Organochlorverbindungen (DDT)⁹⁶ oder Parabene, reichern sich im Körpergewebe an. Der Zusammenhang ist weiterhin umstritten.

1.6 EPIC-Studie

Bei der „European Prospective Investigation in Cancer and Nutrition“ – Studie (EPIC) handelt es sich um eine epidemiologische, prospektive Kohortenstudie, die 1989/90 ins Leben gerufen wurde. Derzeit nehmen die Länder Frankreich, Niederlande, Italien, Spanien, Deutschland, Griechenland, Großbritannien, Dänemark, Schweden und Norwegen mit insgesamt 475 000 Probanden an dieser Studie teil. Als einer der Hauptbestandteile stellt die EPIC-Studie die wissenschaftliche Aktivität des europäischen Programms „Europe against Cancer“ dar, mit dem Ziel Zusammenhänge zwischen Ernährung, Krebserkrankungen sowie chronischen Erkrankungen zu untersuchen¹¹⁴. Mit zwischen über 50 000 Studienteilnehmern ist die deutsche EPIC-Studie die erste und größte Kohortenstudie dieser Art in Deutschland. In Deutschland nehmen mit 25 212 Studienteilnehmern das deutsche Krebsforschungszentrum in Heidelberg und mit 26 270 Probanden das Deutsche Institut für Ernährungsforschung in Potsdam an dieser Studie teil. Im Rahmen der EPIC-Studie wurde nach den Richtlinien des EPIC-Protokolls für jedes einzelne Land ein eigener bebildeter Ernährungshäufigkeits-Fragebogen (FFQ) zur Ernährung entwickelt, der die kulturellbedingten Ernährungsunterschiede der Länder berücksichtigt und es ermöglicht, die individuellen Ernährungsgewohnheiten zu erheben. Da es sich bei der EPIC-Studie um eine prospektive Kohortenstudie handelt, werden die

Teilnehmer im Rahmen von Follow-up Erhebungen über einen Zeitraum von mehreren Jahren beobachtet und das Neuauftreten von Krebserkrankungen und anderen Erkrankungen festgehalten.

Eine Weiterentwicklung des FFQ der EPIC-Studie ermöglichte 2000 erstmals eine Abschätzung der alimentären HAA-Aufnahme über Fleischprodukte für die deutsche Population, Teilnehmern der EPIC-Studie, abzugeben¹¹⁵. Zur Berechnung der HAA werden die Verzehrsmengen der einzelnen Fleischprodukte, deren Verzehrshäufigkeit sowie der dabei verwendeten Bräunungsgrad und die Zubereitungsart berücksichtigt und fließen in die Berechnungen ein. Um eine Abschätzung über die HAA-Aufnahme des hier untersuchten Patientengutes abgeben zu können, wurde der FFQ mit freundlicher Unterstützung vom DKFZ in Heidelberg zur Verfügung gestellt und verwendet.

1.7 Studienziel

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung und der Vergleich einer alimentären HAA-Aufnahme, molekulargenetischer Veränderungen und der Genotoxizität im Fettgewebe der weiblichen Brust.

Erstmals konnte genotoxische Aktivität im Brustfett gesunder Frauen 1996¹¹⁶ nachgewiesen werden, die aufgrund der dabei angewandten Extraktionsmethode den HAA zu zuschreiben ist. Die Isolierung der HAA wurde u. a. mit der Methode nach Gross¹¹⁷ modifiziert nach Toribio¹¹⁸ durchgeführt. Mit dieser Methode lassen sich vor allem leicht polare und weniger-polare, und damit ein breites Spektrum an HAA, isolieren. Ursprünglich wurde die Methode für den Nachweis von HAA in Lebensmittelprodukten entwickelt. Dennoch, eine genauere Identifizierung und Charakterisierung der für die in den Extrakten des Brustfettes verantwortlichen, genotoxischen Substanzen gelang bislang nicht.

Für die Studie wurden Gewebeproben von Patientinnen gesammelt, bei denen eine chirurgische Mammareduktion durchgeführt wurde. Aufgrund der morphologischen Struktur der weiblichen Brust, die zu 70- 90% aus Fettgewebe besteht, können lipophile Stoffe wie HAA dort kumulieren.

Der Nachweis und die Messung von HAA im Fett der Gewebeproben sind Bestandteil dieser Studie. Hierzu wird versucht, HAA aus dem Fett zu extrahieren, zu reinigen und zu konzentrieren. Die so gewonnenen Extrakte werden anschließend auf ihre Mutagenität mit dem Bakterienstamm *Salmonella typhimurium* YG 1019, im sogenannten Ames-Test, untersucht.

Die epithelialen Bestandteile der Mammaresektate ("Organoide") werden mit Hilfe der ³²P-Postlabeling-Methode auf kovalente HAA-DNA-Addukte untersucht. Mit dieser Methode lassen sich Addukte mit einer Empfindlichkeit von einem Addukt pro 10¹⁰ Nukleotiden detektieren und benötigt hierfür nur etwa 10 µg DNA.

Der Vergleich der mittels Fragebogen abgeschätzten HAA-Aufnahme mit der Genotoxizität im Brustfett und der DNA-Addukte soll klären, ob ein Zusammenhang zwischen nachweisbarer Genotoxizität im Brustfett sowie molekulargenetischer Veränderung der DNA aus den Brustdrüsenzellen gesunder Frauen und einer alimentären Aufnahme von HAA angenommen werden kann - und um somit weitere Hinweise auf die Bedeutung der HAA in der Ätiologie von Brustkrebserkrankungen aufzeigen zu können.

2 Methoden

2.1 Patientengut

Von Dezember 2001 bis Juli 2003 wurden Mamma-Gewebeproben von Patientinnen, die sich einer elektiven Mammareduktion im Diakonie Krankenhaus Alten Eichen unterzogen haben, gesammelt. Die Patientinnen wurden zuvor über die Studie informiert und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur toxikologischen und biochemischen Analyse ihrer Gewebeproben. Nach der Operation erhielten die Patientinnen den EPIC-Ernährungsfragebogen sowie einen Fragebogen, der die anthropometrischen und Reproduktionsdaten der Patienten erfragt. Beide Fragebögen füllten die Patientinnen nach einer Einführung und Erklärung selbstständig aus. Es wurden Proben von Frauen im Alter von 15 und 67 Jahren gesammelt. Da der EPIC-Fragebogen für Deutschland konzipiert worden ist, wurden nicht aus Deutschland stammende Patientinnen aufgrund von kulturellen und ernährungsbedingten Unterschieden nicht in die Untersuchung eingeschlossen.

Proben von Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Operation bereits über 30 Jahre alt waren, wurden in der Pathologie des Allgemeinen Krankenhauses Altona makroskopisch auf pathologische Veränderungen untersucht. Im Anschluss wurden die Gewebeproben zur Gewinnung des Brustfettes und der zellulären Bestandteile mit PBS-Puffer gewaschen sowie mit Kollagenase verdaut, und die fettigen und zellulären Extrakte bis zur weiteren Analyse bei -70 °C zwischengelagert.

2.2 Kollagenase-Digestion

Die gesammelten Gewebeproben wurden wie in der Arbeit von Martin¹¹⁶ beschrieben nach der Methode von Easty et al.¹¹⁹ aufgearbeitet. Dabei wird der Hauptbestandteil des extrazellulären Bindegewebes mit Hilfe von Kollagenase gespalten, und damit epitheliale Zellverbände aus dem Stroma isoliert.

Versuchsdurchführung

1. Tag

Medium-Ansatz: 500ml Dulbecco's Medium (GIBCO BRL)
 + 25ml (5%) FB-Serum mit 1% PenStrep
 + 5ml (1%) Glutamat-Lösung (100x)
 + zusätzlich 5ml (1%) PenStrep-Lösung

1. ca. 200ml des Mamma-Gewebes mit einer sterilen Schere so klein wie möglich zerschneiden und über einen sterilen Trichter in eine sterile 500ml Glasflasche geben
2. die Flasche mit dem oben angesetzten Medium bis auf 450ml auffüllen
3. 0,2g Kollagenase in 50ml des selben Mediums suspendieren, die Suspension mit einem Nalgene Filter (0,2µm) steril filtrieren und das Filtrat in die Glasflasche zugeben
4. einen großen, sterilen Magnetührstab hinzugeben und das Ganze über Nacht bei 37°C rühren lassen, den Drehverschluß nicht zu fest drehen

2. Tag

Extraktion des Fetts und des Zell-Pellets

1. Sollte das Gewebe nicht vollständig verdaut sein, die Lösung durch einen sterilen Gaze-Filter filtrieren
2. die verdaute Gewebslösung auf 50ml Röhrchen verteilen und bei 2500rpm 5min. zentrifugieren
3. den öligen Überstand der 1.Phase vorsichtig mit einer Pipette absaugen, Aliquot in einem 50ml Röhrchen sammeln und bei -80°C einfrieren
4. die restlichen Überstände in den einzelnen 50ml Röhrchen vorsichtig abgießen, so dass die Zell-Pellets auf dem Boden der Röhrchen zurückbleiben und zunächst eins der Pellets mit etwa 10ml Medium (s. 1.TAG) resuspendieren
5. die so gewonnene Pellet-Lösung in das nächste 50ml Röhrchen mit Pellet geben, homogenisieren und so alle Pellets nacheinander zusammenführen

Entfernung der Erythrozyten

1. da noch sehr viel Fett im Pellet ist, die Lösung erneut bei 2500rpm 5min zentrifugieren, Überstand abgießen und mit 5ml Medium suspendieren
2. 20ml Aqua dest. hinzugeben und das ganze leicht durchschütteln - nach etwa 40sek. 20ml Medium (s. 1.TAG) dazugeben und bei 800rpm 10min. zentrifugieren
3. die hämolysierten Erythrozyten im Überstand abgießen und das Pellet mit etwa 10ml Medium resuspendieren - dies sollte die roten Blutkörperchen komplett entfernen
4. anschließend die Lösung im Kühlschrank für etwa 1-2 Std. absetzen lassen

Filtration und Gewinnung der drüsigen Organoide

1. steriles Nylonnetz mit der Maschengröße 140µm zurecht schneiden und in ein dafür vorgesehenes Glasgefäß einspannen
2. nun die Pellet-Lösung auf das eingespannte Netz geben und filtrieren; evtl. etwas Medium hinzugeben, um das filtrieren zu erleichtern
3. das in dem Glasbecher aufgefangene Filtrat wird erneut durch ein Nylonnetz mit Maschengröße 53µm filtriert
4. Nylonnetz mit den aufgefangenen Organoiden in ein Becherglas, der Becherwand anliegend, legen und die Zellverbände mit einigen Millilitern Medium und einer 10ml Pipette von dem Netz herunter spülen
5. die so erhaltene Organoidlösung auf 20ml Röhrchen verteilen, diese bei 2500rpm 5 min. zentrifugieren, die Pellets in etwa 5ml Medium resuspendieren und das ganze mit den Aliquots des Fettgewebes bei -70°C einfrieren

2.3 Extraktion

Die chemischen Voraussetzungen dieser Methode sind die unterschiedlichen Löslichkeiten von Feststoffen und Flüssigkeiten in verschiedenen Lösungsmitteln, wodurch eine Produktisolierung, die Trennung von Stoffgemischen und die Entfernung von Verunreinigungen möglich werden.

Homogenisation und Hydrolyse

Das aus der Kollagenase-Digestion gewonnene Lipid aus dem Mammagewebe wird mechanisch mit einem Ultra Turrax sowie thermisch homogenisiert und mit Salzsäure bzw. Natronlauge hydrolysiert.

Festphasen-Extraktion

Bei dieser Methode der Extraktion wird die wässrige Phase mit dem zu analysierenden Stoff auf einen chemisch-inerten, stationären Träger aufgebracht. Hier findet Kieselgur als Material Anwendung. Die wässrige Probe wird von dem Kieselgur adsorbiert, setzt sich in den Poren fest und bildet so einen dünnen Film auf der Kieselgurmatrix. Als nächstes werden lipophile Substanzen mit organischen, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln eluiert. Die Substanzen aus der wässrigen Phase werden in die organische Phase extrahiert und die wässrige Phase verbleibt auf dem Kieselgurträger.

In den nächsten Schritten werden weitere feste Adsorbenzien eingesetzt, die Bindungsstellen für die gesuchte Substanz besitzen und diese zurückhält, so dass Verunreinigungen herausgewaschen werden können und die gesuchte Substanz in gereinigter und konzentrierter Form vorliegt. Die hier verwendeten C18- und SCX-2-Kartuschen besitzen vor allem Bindungsstellen für HAA.

Diese Methode der Extraktion wurde erstmals von Gross¹¹⁷ beschrieben und fand in modifizierter Form nach Toribio¹¹⁸ et al Verwendung. Als eine weitere Modifikation wurden statt der beschriebenen PRS-Säulen SCX-2-Kartuschen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem Verfahren sich sowohl polare (IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Glu-P-1 und Glu-P-2) als auch weniger-polare Amine (PhIP, A α C, Nor-, Harman, Trp-P-1 und Trp-P-2) extrahieren lassen. Mit dieser Vereinfachung lässt sich die aufwendige Analyse in kürzerer Zeit durchführen, und eignet sich vor allem zum Screening unbekannter Proben.

Flüssig-Flüssig-Extraktion

Bei dieser Extraktionsform wird die zu bestimmende Substanz direkt aus der wässrigen Phase ohne stationäre Phase mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert.

Nach entsprechenden Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) wurde Salzsäure als wässrige Phase (statt Natronlauge) und Dichlormethan (DCM) verwendet.

Als positive Kontrollen wurden für beide Extraktionsmethoden einzelne Fettproben mit 4 μ l A α C (500ng/ μ l)/ 4ml versetzt.

Versuchsdurchführung

SCX2-C18-Tandem-Extraktion des Mammafettes

Etwa 2-3g Mammafett in 12ml 1M NaOH bei 70°C mit einem Ultra-Turrax homogenisieren. Als nächstes das Homogenisat mit Extrelut-20 (Kieselgur) gründlich vermischen und in entsprechende Extraktions-Kartuschen geben. Anschließend die SCX-2-Kartuschen mit 5ml 0,1M HCl, 10ml H₂O und 5ml Methanol preconditionieren.

Die Extrelut-Kartuschen nun mit Dichlormethan eluieren und mit den SCX-2-Kartuschen verbinden, sobald das Lösungsmittel aus den Extrelut-Kartuschen läuft. Die Flussrate von etwa 1ml/ min kann dabei durch Aufsetzen von Einmal-Injektions-Kanülen reguliert werden. Die Extraktion beenden, sobald 40ml DCM durchgelaufen sind. Die SCX-2-Kartuschen vorsichtig auf einer Vakuumpumpe vollständig trocknen und die Kartuschen mit 15ml MeOH:H₂O (4:6) und 2ml H₂O waschen. Nun werden die C18-Kartuschen mit 1ml MeOH, 3ml 0,1M HCL sowie 3ml H₂O aktiviert, die SCX-2 aufgesteckt und mit 20ml 0,5M Ammoniumacetat (pH8) eluiert.

Die C18-Kartuschen mit 10ml H₂O waschen und mit 0,8ml Methanol Ammoniak (25%) eluieren. Das Eluat wird in einem sterilen Zentrifugenröhrchen aufgefangen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Den Rückstand in 80µl DMSO aufnehmen.

Liquid-Liquid-Extraktion des Mammafettes

Jeweils 4ml der Fettproben mit 2ml 5N HCl mit einem Ultra Turrax mischen. Zur weiteren Homogenisation wurden bei dieser Methode die Proben für 15 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend für etwa 1h in einem 70°C heißen Wasserbad geschüttelt.

Im Anschluss werden die Proben 5 Minuten bei 2000 RPM zentrifugiert und die untere, wässrige Phase abpipettiert. Zu den so gewonnen Proben werden jeweils 2,5ml 10N NaOH zur Alkalisierung hinzugeben, kräftig geschüttelt und abgekühlt.

Jeweils 4ml Dichlormethan werden zu den einzelnen Proben geben, das Ganze kräftig geschüttelt und 5 Minuten bei 3000 RPM zentrifugiert. Die jeweils pipettierten unteren Phasen in ein neues steriles Zentrifugenröhrchen geben. Die Proben mit Stickstoff und unter leichtem Erwärmen abdampfen lassen und den Rückstand in 80µl DMSO aufnehmen.

2.4 Ames-Test

Der Ames-Test dient der Untersuchung von Chemikalien und Substanzen auf Mutagenität - auf ihre Eigenschaft das Erbgut zu verändern. Hierzu werden Histidin-auxotrophe *Salmonella typhimurium* Stämme verwendet. Die eingesetzten Stämme sind Träger eines Gen-Defekts, der die Bakterien an der Synthese der essentiellen Aminosäure Histidin hindert. In Gegenwart mutagener Substanzen kann dieser Defekt in den ursprünglichen, funktionsfähigen Zustand rückmutieren (*reverse mutation*, *reversion*). Die dann in Histidin freier Agarose als wachsende Kolonien erkennbaren Mutanten, mit der Fähigkeit Histidin wieder zu synthetisieren, werden als Revertante bezeichnet.

Etliche Stoffe zeigen erst nach ihrer Metabolisierung mutagene Eigenschaften. Das *Salmonella* Bakterium verfügt über kein eigenes metabolisches System. Bei entsprechenden Testsubstanzen wird daher Rattenleberenzym (S9) zugegeben, um so den Bakterien eine metabolische Konversion dieser Stoffe zu ermöglichen. Eine Verdoppelung der Revertanzahl gegenüber der spontanen Reversionssrate, wird als positives Ergebnis gewertet. Spontanmutationen werden über parallel durchgeführte negativ-Kontrollen, Systeme ohne mutagene Testsubstanz, ermittelt.

Viele der mit dem Ames-Test positiv getesteten Substanzen zeigen allerdings im Tierexperiment eine deutlich geringere kanzerogene Wirkung. Auch die genaue Bedeutung der nachgewiesenen Mutagenität in der Kanzerogenese im Menschen ist nicht eindeutig

geklärt. Dennoch ist der Ames-Test ein wichtiges Instrument im Screening verdächtiger Substanzen, der nicht zuletzt auf Grund seiner Kostengünstigkeit breite Anwendung findet.

Der mit dem *Salmonella typhimurium* Stamm YG 1019 modifizierte Ames-Test, besitzt eine hohe Sensitivität für HAA. Mit Anwendung dieses Stammes lassen sich die HAA bis in den pg-Bereich nachweisen.

Gemäß dem Protokoll von Maron und Ames¹²⁰ wurde der Ames-Test als Präinkubationsassay nach Yahagi et al.¹²¹ durchgeführt, und der Bakterienstamm YG 1019, der von Prof. Dr. Josephy (University of Guelph, Ontario, Canada) zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Dieser Teststamm leitet sich vom Bakterienstamm TA1538 ab und verfügt über eine hohe N-Acetyltransferase-Aktivität^{122 123}. Die Bakterienstammkulturen wurden bei -80 °C gelagert und die genetischen Eigenschaften in regelmäßigen Abständen überprüft.

Versuchsdurchführung

Die Salmonellabakterien werden in einem gepufferten System inkubiert und ein metabolisches Aktivierungssystem zugesetzt, da es sich bei der Gruppe der HAA um indirekte Lebensmittelmutagene handelt. Hierzu wird eine S9-Enzymfraktion verwendet, die durch die Induktion von Rattenleber mit Aroclor1254 und anschließender Zentrifugation (supernatant nach Zentrifugation bei 9000g) gewonnen wird. Aroclor1254 stellt ein komplexes Homogenat aus polychlorierten Biphenylen dar und induziert das hepatische Monooxygenasen-Enzymsystem¹²⁴. Zur Kontrolle der spontanen Reversion des Bakterienstammes wird Wasser verwendet. Als negative Kontrolle dient das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Des Weiteren wird als Postivkontrolle das indirekte Mutagen 2-Aminoanthracen (AAC) eingesetzt.

Zur Anzucht der Bakterienkultur werden 20ml Nährbouillon mit der Stammkultur beimpft. Die Kultur wird für sieben Stunden in einem Inkubationsschüttler bei 37 °C und 90U/ min inkubiert, so dass am Ende eine Dichte zwischen $0,5-1,5 \times 10^8$ Bakterien/ ml vorliegt.

Je nach Zahl der zu untersuchenden Proben werden 5ml bzw. 10ml und entsprechend der aufgeführten Tabelle 8 S9-Enzymfraktion sowie Kofaktoren in eine gepufferte Lösung (S9-Mix) angesetzt.

Tabelle 8 Übersicht zur Herstellung von 10ml S9-Mix

		S9-Mix
I	NADP in 500µl Phosphatpuffer gelöst	31,5mg
II	Glu-6-P in 500µl Phosphatpuffer suspendiert	17mg
III	0,04M MgCl ₂ / 1,55M KCl-Lsg.	100µl
	NADP-Lsg. (aus I)	500µl
	Glu-6-P -Lsg. (aus II)	500µl
	Phosphatpuffer	7,9ml
	S9-Enzymfraktion	1000µl

Für den Mutagenese-Test werden je Ansatz 100µl Bakterien-Bouillon, 100µl S9-Mix und jeweils 20µl der zuvor gewonnen Fettextrakte oder eine der drei Kontrollsubstanzen zusammengegeben, homogenisiert und für 30 Minuten in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 120U/ min. präinkubiert. Für alle Substanzen werden jeweils zwei Parallelbestimmungen durchgeführt. Die Kontrollsubstanz AAC wird in einer Konzentration von 50ng/ 10µ DMSO für den Mutagenese-Test mit dem Stamm YG1019 eingesetzt.

Anschließend werden den einzelnen Ansätzen jeweils 2ml eines zuvor angesetzten und auf 45°C erwärmten Top-Agars, der eine 0,05mM Histidin-Biotin-Lösung enthält, zugegeben. Die Ansätze kurz mischen und auf Minimal-Glucose-Agar Platten blasenfrei ausplattieren. Die Inkubation erfolgt in einem Trockenschrank für 48 Stunden bei 37°C.

Die Revertantenzahl wird mit Hilfe eines Zählgeräts ermittelt und der Mittelwert der drei Parallelbestimmungen bestimmt. Zur automatischen Berechnung und Darstellung der Ergebnisse findet die Computer-Software Bio-Sys, Ames-Test III (Rev. 3.2.4) Verwendung. Als positives Ergebnis im Ames-Test wurde eine Verdoppelung der Anzahl der Revertanten/ Platte gegenüber der Rate der spontanen Revertantenzahl definiert. Ein Test ist nur dann gültig, wenn die spontane und die durch die Kontrollsubstanz induzierte Revertantenzahl einem bestimmten durchschnittlichen Erwartungswert für den Teststamm entsprechen.

2.5 Postlabeling

Der ³²P-Postlabeling Assay ist eine empfindliche Methode zur Detektion von DNA-Addukten. Die gebildeten Addukte führen zu Mutationen und Veränderung der Gene und gelten als initiiierende Schritt der chemischen Kanzerogenese. Des Weiteren stellen Addukte einen wichtigen Marker für die tatsächlich an der DNA wirksame Dosis dar (s. Kapitel 1.3).

Dieser Bioassay besteht aus folgenden Schritten:

- 1) DNA Extraktion modifiziert nach Gupta¹²⁵ (1993),
die Modifizierung der originalen Vorschrift¹²⁶ zeigt sich in der Vereinfachung einzelner Arbeitsschritte und damit in einer Isolierung der DNA in kürzerer Zeit.
- 2) Hydrolyse der Fettproben
- 3) Anreicherung der DNA-Addukte mittels Festphasen-Extraktion
- 4) Radioaktive Markierung der Addukte durch Phosphorylierung mit ³²P-ATP
- 5) Chromatographische Auftrennung der markierten Addukte

Durchführung

DNA-Phenolextraktion modifiziert nach Gupta (1993)

- Die zuvor mittels Kollagenase-Digestion gewonnen und in DMSO-Medium aufgenommenen Zell-Pellets(ca. 5-10 Mio. Zellen/ Pellet) werden zunächst zentrifugiert und der flüssige Überstand abkantiert.
- Die Pellets werden in 1ml TE-Puffer suspendiert und homogenisiert. Ein weiteres Mal zentrifugiert, der Überstand kantiert und in weitere 0,5ml TE-Puffer aufgenommen. Zusätzlich werden 100µl RNase T1 und 7,5 µl RNase A zugeben und alles 30 min. lang bei 37°C inkubiert.
- Anschließend werden 60µl 10%iges SDS und 10 µl Proteinkinase K hinzugeben und die Proben weitere 30 min. lang bei 37°C inkubiert.
- Die einzelnen Proben werden nun mit 1 vol Phenol (TE gesättigt) aufgenommen, homogenisiert und sieben minutenlang zentrifugiert. Die obere Phase wird anschließend in ein neues Probenröhrchen geben (und dieses zentrifugiert).
- In das neue Röhrchen werden 1 vol Phenol/ Sevag (1:1) zugeben, homogenisiert und nochmals sieben minutenlang zentrifugiert.
- Die sich oben absetzenden Phasen werden in neue Zentrifugenröhrchen pipettiert (und zentrifugiert) und 1 vol Sevag hinzugegeben, wiederum homogenisiert, fünf minutenlang zentrifugiert und die obere Phase nochmals in ein neues Röhrchen überführt (anschließend zentrifugieren).
- Nun etwa 70µl (= etwa 1/10 des Volumens) 5M NaCl-Lsg. zugeben und die DNA durch Zugeben von 1-2 vol Ethanol ausfällen, zentrifugieren

UV-photometrische Quantifizierung der DNA

Die gewonnenen DNA-Pellets werden mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 200-2000 μ l 1/100 SSC homogenisiert.

Die DNA-Konzentration wird photometrisch über die Extinktion bei 260nm ermittelt, wobei eine Absorptionseinheit einer Konzentration von 50 μ g/ml DNA entspricht (Gupta 1993). Zur Reinheitskontrolle der isolierten DNA wird zusätzlich die Extinktion bei $\lambda = 280$ nm ermittelt und der Quotient aus E_{260}/E_{280} einen Wert von 1,8 ergeben. Ein Wert über 1,8 ist Hinweis auf eine Verunreinigung mit RNA hin, wohingegen ein Wert von unter 1,8 auf eine Protein-Verunreinigung hinweist.

DNA Hydrolyse

Da die Mikrokokken Nuklease (MN) mit Oligonukleotiden kontaminiert ist und Milz-Phosphodiesterase (SPD) in Ammoniumsulfat gelöst vorliegt, welche den Einbau von ^{32}P am 5'-Ende der Nukleotide müssen beide Lösungen dialysiert werden. Hierzu wird MN mit H_2O auf eine Konzentration von ~450 U/ml und SPD-Lsg auf eine Konzentration von 16 U/ml gelöst und die Enzyme in einen Dialyseschlauch pipettiert und dreimal gegen drei Liter Wasser für drei Stunden bei 4 °C dialysiert.

Für die Hydrolyse von 10 μ g trocken zentrifugierter DNA werden 2,3 μ l MN-Lsg., 3,8 μ l SPD-Lsg. und 3 μ l einer zuvor angesetzten Puffer-Lsg. bestehend aus 100 mMol/l Na-Succinat und 25 mMol/l CaCl_2 (pH 6) in 5,9 μ l H_2O homogenisiert und bei 37 °C 4h lang inkubiert.

Anreicherung der DNA-Addukte¹²⁷

Nach der enzymatischen Hydrolyse der DNA wird diese chromatographisch mittels Festphasenextraktion gereinigt und angereichert.

- Die SPE-Säulen mit 2ml Methanol und 5ml H_2O preconditionieren und anschließend vorsichtig Vakuum-getrocknet.
- Das DNA-Hydrolysat mit 100 μ l 1/10 Na-Succinat/ CaCl_2 – Puffer verdünnen und auf die unter Vakuum SPE-Kartuschen pipettiert. Dann die Säulen mit 2ml 1/10 Na-Succinat/ CaCl_2 – Puffer und mit 5ml H_2O waschen und die Säulen von der Vakuum-Manifold nehmen. Diese zunächst mit 2ml Methanol und anschließend mit 1 μ l Tris eluieren.

- Das Eluat in einer Speed Vac abdampfen und in weiter 100 µl Methanol aufnehmen sowie ein weiteres Mal in der Speed Vac abdampfen lassen. Zuletzt werden die Proben in 10µl H₂O aufgenommen.

Markierung der DNA-Addukte mit ³²P-ATP

Die enzymatische Markierungsreaktion erfolgt mit T4-Polynukleotidkinase (PNK) und [γ -³²P]ATP. Die DNA-Hydrolysate werden in 2µl einer Pufferlösung, bestehend aus 230mM Bicin, 115mM MgCl, 115mM Dithiothreitol und 5,8mM Spermidin, homogenisiert. Um die 3'-Phosphataseaktivität der PNK zu reduzieren, findet die Reaktion bei pH9 statt. Die Addukte werden unter ATP-Unterschuß-Bedingungen mit 100µCi trägerfreiem [γ -³²P]ATP inkubiert, so dass für 15,4 nmol Nukleotide etwa 30-100pmol ATP zur Verfügung steht. Die spezifische Aktivität wird für jede Charge bestimmt und beträgt in der Regel 1000-3000 Ci/mmol. Nach Zugabe von 0,5µl PNK (11,5-15U/ µl) wird das Homogenisat für 30 min. bei 37°C inkubiert.

Multidirektionale Anionenaustauscher-Dünnschichtchromatographie

Für die chromatographische Auftrennung der DNA-Addukte werden die ³²P-markierten Proben auf 10x10cm große Polyethylenimin-Cellulose (TLC) Platten aufgetragen und unter Verwendung verschiedener Laufpuffersysteme in Kombination mit einer multidirektionalen Entwicklung der TLC-Platten die lipophilen Bisphosphatnukleosidaddukte nach folgender Vorgehensweise (s. Abbildung 3) aufgetrennt:

Das Homogenisat auf die TLC-Platten auftragen und über Nacht den D1-Puffer in D1-Richtung über die Platte laufen lassen. Hierdurch wird der größte Teil der Radioaktivität in Form von ³²P-Orthophosphat auf ein angeheftetes Filterpapier (Wick, Whatman No 17 Chr, 10x7cm) aufgetrennt, die DNA-Addukte verbleiben dabei am Auftragungspunkt. Anschließend das Filterpapier wieder entfernen und die TLC-Platten mit destilliertem Wasser, Ammoniumformiat-Puffer und nochmals dest. Wasser waschen.

Den D2-Puffer entsprechend der Abbildung in D2-Richtung über die getrocknete TLC-Platte laufen lassen. Die Platte dann fünf minutenlang mit 13mM Tris, anschließend mit dest. Wasser waschen und trocknen. Analog zu den beiden ersten Schritten die Entwicklung in D3-Richtung durchführen und die Platten wiederum mit dest. Wasser waschen und trocknen.

Die D2- und D3-Entwicklung dienen der Auftrennung der unterschiedlichen markierten DNA-Addukte des aufgetragenen Homogenisats über die TLC-Platte.

Daraufhin werden ein weiteres Mal radioaktive Verunreinigungen mittels eines angehefteten Filterpapiers (Whatman No1, 10x10) und D4-Puffer in D4-Richtung entwickelt.

Als Positivkontrolle wurde in jedem Postlabeling Ansatz eine Probe modifizierter DNA parallel in Doppelbestimmung mitgeführt. Hierbei handelt es sich um DNA aus dem Pankreas von Ratten, die mit PhIP behandelt worden waren.

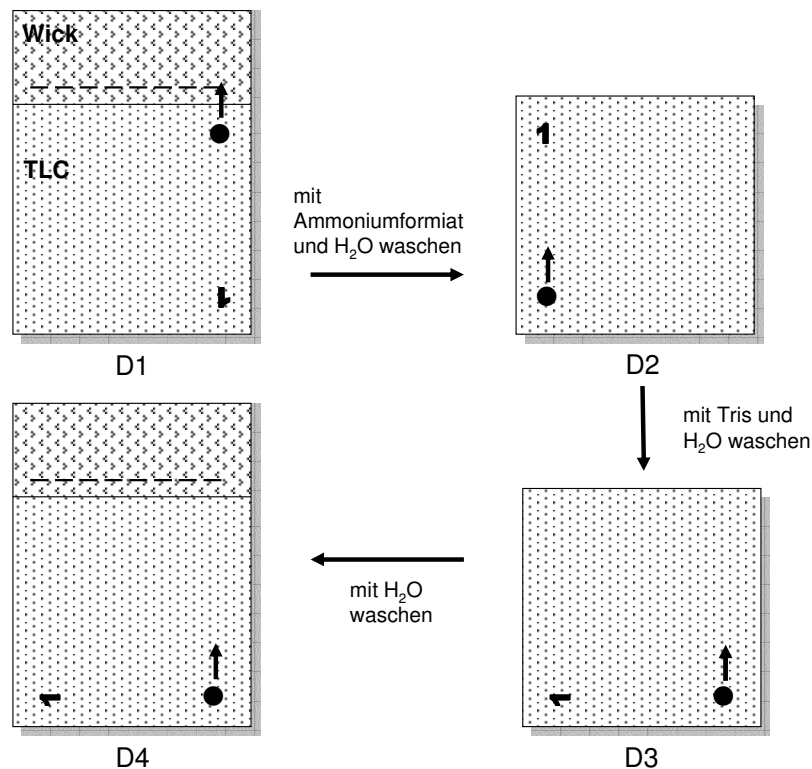
Zur Berechnung der Addukt-Level werden zunächst Röntgenfilme (Kodak-X-OMat AR) mit den getrockneten TLC-Platten in einer entsprechenden Expositionskassette bei -80 °C und für etwa einen Tag autoradiographiert. Nach der Entwicklung des Röntgenfilms werden geschwärzte Flecken sichtbar, die als DNA Addukt-Spots bezeichnet werden und den chromatographisch aufgetrennten und markierten DNA-Addukten entsprechen. Zur Quantifizierung werden nun die den Addukt-Spots entsprechenden Bereiche auf der TLC-Platte ausgeschnitten und die Cerenkov-Strahlung mit einem Szintillationszähler gemessen. Durch Subtraktion der Untergrundstrahlung, die durch die Messung von Kontrollflächen auf den einzelnen TLC-Platten bestimmt wird, ergibt sich die Netto-Zählrate.

Die Berechnung der relativen Addukt-Level (RAL) ergibt sich unter Berücksichtigung der Netto-Zählrate, der spezifischen Aktivität, dem Zerfallsfaktor und der eingesetzten DNA-Menge nach folgender Formel:

$$\text{RAL} = \frac{\text{Netto-Zählrate [dpm]}}{\text{Spez. Aktivität [dpm/fmol]}} \times \frac{\text{DNA-Menge [\mu g]}}{\text{Zerfallsfaktor}}$$

Dabei entsprechen 1fmol Addukte/ μg DNA etwa 33 Addukten/ 10^8 nicht-modifizierter Nukleotiden.

Abbildung 3 Schematische Darstellung des Ablaufes der multidirektionalen Anionenaustauscher-Dünnschichtchromatographie



2.6 EPIC-Fragebogen

Bei dem Ernährungsfragebogen der deutschen EPIC-Studie handelt es sich um ein Erhebungsinstrument, bei dem 158 Fragen Multiple-Choice-Fragen zu den verzehrten Lebensmitteln eingesetzt werden. Dabei sollen die Ernährungsgewohnheiten der letzten 12 Monate berücksichtigt werden.

Zur Ermittlung der täglichen Aufnahmemengen [g/d] wurden einzelnen Lebensmitteln entsprechende Fotografien mit verschiedenen, bekannten Portionsgrößen präsentiert¹²⁸. Daneben wurden relativ standardisierte Mengenangaben wie z. B. ‚ein Teelöffel‘, ‚ein Glas‘ und ‚eine Wurst‘, etc. verwendet, um die Lebensmittelmengen zu berechnen.

Zur Ermittlung Verzehrhäufigkeit wurde eine zehnstufige Skala im Fragebogen verwendet:

- | | |
|--------------------------|-------------------------|
| - 1x/ Monat oder weniger | - 1x/ Tag |
| - 2-3x/ Monat | - 2x/ Tag |
| - 1x/ Woche | - 3-4x/ Tag |
| - 2-3x/ Woche | - 5x/ Tag oder häufiger |
| - 4-6x/ Woche | - nie |

Die Tabelle 37 in Anhang zeigt eine Liste der mit dem für Deutschland konzipierten EPIC-Fragebogen ermittelbaren Lebensmittelprodukte. Aus Portionsgröße und

Verzehrhäufigkeit lassen sich die durchschnittlichen Verzehrsmengen einzelner Lebensmittel pro Tag errechnen.

Zur Untersuchung der HAA-Aufnahme wurden zusätzlich Fragen zu den einzelnen Zubereitungsarten (Grillen, Kurzbraten, Braten/ Schmoren) und Abbildungen zur Ermittlung des Bräunungsgrades den einzelnen Fleisch- und Fisch-Lebensmitteln hinzugefügt, so dass sich die alimentäre HAA-Aufnahme berechnen und abschätzen lässt. Für die Auswertungen und Berechnungen wurden keine eigenen Analysen zu den einzelnen Lebensmitteln, Zubereitungsarten und Bräunungsgraden durchgeführt, sondern auf Literaturdaten zurückgegriffen, die in standardisierter Form für die gleichen oder ähnlichen Lebensmittel sowie für die Bräunungsgrade HAA-Daten ermittelt hatten^{129 130 131 132 133}.

Diese Fragen wurden im Rahmen der Entwicklung eines Kurzfragebogens zur Ermittlung der alimentären HAA-Aufnahme innerhalb der EPIC-Studie erstellt¹³⁴. Der in unserer Studie verwendete Fragebogen stellt dabei die Kombination des ursprünglich entwickelten FFQs und des HAA-Kurzfragebogens dar.

Zusätzlich werden von jeder Patientin Daten, wie z.B. Alter, anthropometrische Maße, Lebensgewohnheiten, Krankengeschichte und Ernährungsgewohnheiten, erhoben. Daneben wurden Kernfragen zum Lebensstil konzipiert und festgelegt (sog. Core Protocol), die jedes teilnehmende Land zusätzlich erheben sollte. Neben den allgemeinen anthropometrischen Fragen gehören hierzu:

- Raucheranamnese
- derzeitiger und früherer Alkoholkonsum
- Schul- und Berufsausbildung
- derzeitig ausgeübter Beruf
- Reproduktionsgeschichte
- Fragen zu Menstruation und Menopause
- Fragen zur Verwendung von Kontrazeptiva bzw. Hormonbehandlung
- Erkrankungsgeschichte
- gegenwärtige körperliche Aktivität

Während der Pilotphase der EPIC-Studie - Oktober 1991 bis Oktober 1992 - wurden die Reliabilität und die Validität des FFQ getestet. Die Reliabilität wurde durch eine weitere Erhebung sechs Monate später mit denselben Fragen zu den Lebensmitteln überprüft. Zur Kontrolle der relativen Validität wurden die mittels FFQ ermittelten Daten mit Referenz-Messungen von zwölf weiteren 24-h Erhebungen zu den Ernährungsgewohnheiten verglichen. Auf eine detaillierte Beschreibung der Entwicklung des FFQ-Fragebogens wird an anderer Stelle eingegangen¹³⁵.

2.7 Adipozyten-Kultivierung

Aufgrund des hohen Lipid-Anteils verklumpen Adipozyten in Kulturen, schwimmen auf der Oberfläche des Mediums und haben nicht ausreichenden Zugang zu Nährstoffen. Morphologische und andere Veränderungen können so nicht beobachtet werden und der Hauptteil der Adipozyten lysiert innerhalb einer Inkubationszeit von 72 Std.

Die 'Decken-Kultur' ist eine Methode zur Kultivierung ausgereifte Adipozyten, die die schwimmende Fähigkeit der Fettzellen nutzt und es diesen ermöglicht, sich an der oberen inneren Oberfläche von Kulturflaschen, welche komplett mit Medium gefüllt sind, anzuheften und sich weiterzuentwickeln¹³⁶.

Zur Kultivierung von Adipozyten aus dem Fettgewebe der gesammelten Proben wurden zunächst etwa 40ml einer Gewebeprobe zerkleinert und in eine sterile 100ml Flasche gegeben. Diese wurde mit 12,5g Kollagenase auf 50ml Medium versetzt und mit dem oben genannten Mediumansatz (s. Kapitel 2.2) auf 100ml aufgefüllt. Das Gewebe wurde dann bei 37°C für eine Stunde verdaut, anschließend zentrifugiert und etwa 200µl des fettigen oberen Überstandes in eine mit equilibrierten Mediumansatz gefüllte T25 Kulturflasche gegeben. Aufgrund der geringeren Dichte der Adipozyten wurden die Kulturflaschen auf den Kopf gestellt und bei 37°C und 4,8% CO₂-Gehalt inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Kulturflaschen mikroskopisch mit 40-facher Vergrößerung untersucht.

In einem weiteren Kultivierungsversuch wurde der Boden einer Kulturflasche mit einigen Millilitern Fetal-bovinen-Serum (FBS) benetzt und getrocknet. Zusätzlich wurde dem Mediumansatz 1% Gentamycin sowie 1% Nystatin zugesetzt. Im weiteren wurde der Versuch analog zum Vorversuch durchgeführt.

In beiden Fällen konnten nach zweitägiger Inkubation mikroskopisch keine Adipozyten nachgewiesen werden. Damit konnten keine weiteren Untersuchungen mit diesen Zellen durchgeführt werden.

2.8 Statistische Analyse

Für alle statistischen Berechnungen wurde die Statistik-Software SPSS, Vers. 12.0 verwendet. Hierzu wurden die einzelnen Parameter zunächst mittels Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung hin überprüft. Die im Rahmen dieser Untersuchung relevanten Daten zu den Lebensmitteln wiesen teilweise keine Normalverteilung auf, so dass die entsprechenden Korrelationen mittels des Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten berechnet wurden. Dieser wird auf der Basis der Ränge der Messwerte ermittelt. Für signifikante Parameter im Kolmogorov-Smirnov Test wurde der zweiseitige Pearson

Korrelationskoeffizient für lineare Zusammenhänge berechnet. Zur grafischen Veranschaulichung der Daten und Maßzahlen wurden diese zum Teil mittels Box-Whisker-Plots dargestellt. Ausgangspunkt dieser Darstellung (bei vertikaler Ausrichtung) bildet eine Box, deren obere und untere Begrenzung durch das obere und untere Quartil (Q_1 und Q_3) der Messergebnisse festgelegt ist. In diesem Bereich fallen 50% der Beobachtungen. Innerhalb der Box wird der Median durch eine horizontale Linie markiert. Die Linienendpunkte der Whiskers sind durch den kleinsten und größten Messwert definiert. Wenn allerdings diese Werte vom oberen bzw. unteren Rand der Box zu weit entfernt liegt ($>1,5(Q_3-Q_1)$), endet die Whiskerlinie bei dem höchsten bzw. niedrigsten Messwert, der gerade noch innerhalb dieses Bereiches liegt. Ausreißer-Werte ($>1,5(Q_3-Q_1)$ und $<3(Q_3-Q_1)$) werden in den einzelnen Darstellungen mit einem ‚o‘ markiert, Extremwerte ($>3(Q_3-Q_1)$) mit einem ‚★‘.

Zusätzlich wurden die erhobenen Daten mittels Histogrammen, Regression und Bestimmtheitsmaß analysiert.

3 Materialien und Geräte

3.1 Kollagenase-Digestion

Materialien

PBS-Puffer: 8g NaCl, 1,15g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,2g KH₂PO₄, 0,2g KCl, pH 7,6 / 1L dest

Dulbecco's Medium, w/o Phenol Red, with Sodium Pyruvate, 1000mg/l Glucose

Pyridoxine; GIBCOBRL, LIFE TECHNOLOGIES

Fötale Kälberserum, Gibco, Eggenstein

Collagenase (Clostridiopeptidase A; EC3.4.24.3) from clostridium histolyticum Type IA; collagen digestion activity: 350 Units/ mg solid, FALGPA hydrolysis activity: 1,1 units/ mg solid; SIGMA

Sterilization Filter Unit (CN), OTY: PK 12 Size: 0,2mic., 115ml; Nalge Company, 120-0020

Hartmann ES Kompressen, steril (gauze swaps); 10x10cm, 100% Baumwolle

BlueMax 50 ml polypropylene conical tubes, 30x115mm style, nonpyrogenic, sterile; Falcon - Becton Dickinson

Disposable conical tubes, 15ml, sterile; Nunc Braud products

25ml serological pipets, polystyrene, nonpyrogenic, sterile; Becton Dickinson Labware.

Serological pipets, 10ml, sterile; Sarstedt

LatexExam Gloves, powder-free; Safeskin SatinPlus, Kimberly-Clark

Nylon-Polyamid-Präzisions-Siebgewebe, Maschenweite 150µm (Art.Nr.: 5109528) und Maschenweite 50 µm

Geräte

Ultrazentrifuge L870, Rotor SW40; Beckmann

Reine Werkbank mit Abzug für mikrobiolog. und biotechn. Arbeiten unterhalb der Sicherheitsstufe S2; HA 2448 GS, Heraeus-LaminAir.

3.2 Extraktion

Chemikalien

Natriumhydroxid Plätzchen, J.T. Baker

HCl Salzsäure, Suprapur Merck 1.00018.0250

MeOH Methanol, LiChroSolv Merck 1.06018.2500

DCM Dichlormethan, SupraSolv Merck 1.06054.2500

Ammoniumacetat, Fractopur Merck 1-16103

Ammoniak, Merck

2-Aminoantracen (AAC), Aldrich Chemicals, Steinheim

2-Amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridin (PhiP), Toronto Research Chemical, Canada

Materialien

Isolute SCX-2 500mg (sorbent mass), 3ml reservoir volume, Int. Sorbent Techn. 532-0050-B.

Isolute MFC18 100mg (sorbent mass), 1ml reservoir volume, Int. Sorbent Techn. 240-010-A.

EXtrelut NT, Nachfüllpackung, Merck 1.15093.0001

EXtrelut NT20 Fertigsäulen, Merck

Geräte

SPE-Vakuumvorrichtung, Baker, Niederlande

Vakuumzentrifuge, Univapo 15OH, Uniequip, Refrigerated Vapor Trap RVT100, Savant

Drehscheiber-Vakuumpumpe, Vacuubrand

Ultraschallbad, Sanorex RK 510, Transistor, Bandelin

Wasserbad, Köttermann

UltraTurrax, Polytron PT1200, Kinematica AG, Dispersing and Mixing Techn.

3.3 Ames-Test

Chemikalien

Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)

Zitronensäure-Monohydrat

Kaliumhydrogenphosphat $\times 3\text{H}_2\text{O}$

Natriumammoniumhydrogenphosphat $\times 4\text{H}_2\text{O}$

D(+)-Glukose-Monohydrat

NaCl

d-Biotin

L-Histidin*HCL

Glucose-6-Phosphat

NADP- Na_2

KCl

$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

$\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Merck

Materialien

Salmonella-YG1019

Nutrient Broth No. 2

Nutrient Agar (Oxoid)

Agar purif. (Oxoid)

Geräte

Schüttelinkubator 3022, GFL

Trockeninkubator Bk7, Ehret GmbH

Kolonie-Zählgerät, Artec Counter Model 880, Imaging Products International

Vollagar

28 g Nutrient Agar unter Erwärmen in 1000 ml dest. Wasser lösen, autoklavieren und Portionen von etwa 20 - 30 ml in Petrischalen gießen und abkühlen lassen.

Minimal-Glukose-Platten

15g Agar in 930ml Aqua demin. Homogenisieren und 20min. bei 120°C autoklavieren. Danach den Ansatz abkühlen lassen und 20ml sterile *Vogel-Bonner-Lsg.* und 50ml sterile 40%ige Glukose-Lsg. hinzusetzen und mischen. Den Agar anschließend in sterile Petrischalen (25-30ml) gießen. Die Haltbarkeit des Agars beträgt im Kühlschrank etwa eine Woche.

Vogel-Bonner Medium

5g Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), 50g Zitronensäure-Monohydrat, 250g Di-Kaliumhydrogenphosphat $\times 3\text{H}_2\text{O}$, 87,5g Natriumammoniumhydrogenphosphat $\times 4\text{H}_2\text{O}$ zunächst in 200ml erwärmtes Aqua demin. suspendieren, auf 500ml auffüllen und 20min. lang bei 120°C autoklavieren.

40%ige Glukose-Lsg.

Zunächst 200g D(+)-Glukose-Monohydrat in etwa 250ml warmen Aqua demin. auflösen, dann auf 500ml auffüllen und bei 120°C 20min. lang autoklavieren.

Top-Agar

1,08g Agar, 1,08g NaCl in 180ml Aqua demin. lösen und bei 120°C 20min. lang autoklaviert. Nach Abkühlen und unmittelbar vor Versuchsbeginn werden 180ml Top-Agar kurz erwärmt und 20ml sterile 0,5 mM *Histidin-Biotin-Lsg.* zugesetzt.

Histidin-Biotin-Lsg (0,05mM)

30,9mg d-Biotin und 24,0mg L-Histidin*HCL in 250 ml erwärmten Aqua dem. zugeben und bei 120 °C autoklavieren.

Nutrient Broth (Nährbouillon)

25g Nutrient Broth No. 2 in 1000ml Aqua dem. Lösen und 20min. bei 120 °C autoklavieren

1,55M KCl/ 0,4M MgCl₂ - Lsg.

6,15g KCl, 4,07g MgCl₂x6H₂O zu 50ml Aqua dem. geben, danach sterilfiltern

Posphatpuffer (pH 7,4)

19ml NaH₂PO₄xH₂O (2,76g/ 100ml Aqua bidest.) und 81ml NaHPO₄x2H₂O (7,795g/ 500ml Aqua bidest.) vermischen, pH-Wert nach Bedarf mit einer der beiden Lsg. auf 7,4 einstellen und Puffer sterilfiltern.

3.4 Postlabeling

Chemikalien

TE-Puffer	50mM TrisHCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid, Serva), 10mM EDTA, pH 7,5
SDS	10%, Natriumdodecylsulfat in H ₂ O
Phenol	Fluka, Buchs (Schweiz)
Sevag	Chloroformisoamylalkohol 24/ 1
NaCl-Lsg.	5M
Ethanol	
SSC	0,15mM NaCl und 0,015M Natriumcitrat in 10mM EDTA
Na-Succinat	
CaCl ₂	
Methanol	Merck, Darmstadt
Tris	0,5M Tris(hydroxymethyl)aminomethan, pH 9; Merck, Darmstadt
Na-Succinat Lsg.	
RNAse T1	5U/ µl; Böhrringer, Mannheim
RNAse A	10µg/ µl NaAc, 10 min. bei 80 °C suspendieren; Böhrringer, Mannheim
Proteinkinase K	10mg/ ml; Merck, Darmstadt
MN	Micrococcal Nuclease (Staph. Aureus), Sigma N3755
SPD	Phosphodiesterase (calf spleen), Calbiochem #524711

Materialien

SPE Säulen OASIS, 30mg HLB

Polygram CEL 300 PEI for TLC, Macherey Nagel, Art.Nr.: 801 052

Geräte

Vakuum-Manifold

Speed Vac

Spektrometer DU64, Beckmann

Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6000 IC, Beckmann

Laufpuffer:

D1 (2 l)

1M Na-Phosphat, pH 6,0

312,02g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ oder 272g NaH_2PO_4 mit NaOH auf pH 6,0

2,5M Ammoniumformiate, pH 3,5 (1 l)

96ml 98% HCOOH mit konz. NH_3 auf pH 3,5

D2 (2 l)

3,5M Li-Formiate 8,5M Harnstoff, pH3,5

270ml 98% HCOOH

1020g Harnstoff mit LiOH pH auf 3,5

D3 (2 l)

0,8M LiCl 0,5M TrisHCl 8,5M Harnstoff, pH 8,0

67,82g LiCl

121,1g Tris HCl

1020g Harnstoff mit konz. HCl auf pH8,0

D4 (2 l)

1,7M Na-Phosphat, pH 6,0

312,02g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ oder 272g NaH_2PO_4 mit NaOH auf pH 6,0

4 Ergebnisse

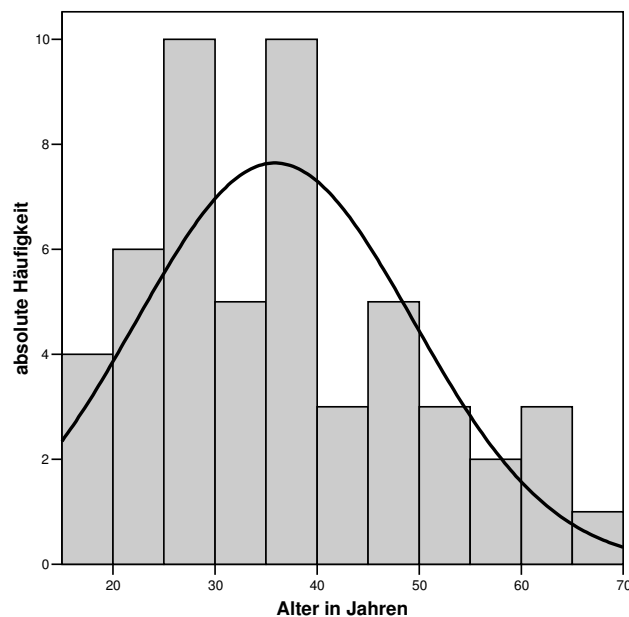
4.1 Patientengut, Altersverteilung

Insgesamt konnten 52 Patientinnen in die Studie aufgenommen werden, von denen Gewebeproben und Fragebögen vorlagen. Patientinnen, die die Teilnahme abgelehnt haben und/ oder deren Fragebögen nicht vorlagen wurden nicht berücksichtigt. Alle Gewebeproben wurden mittels Ames-Test auf Mutagenität und 43 der Proben wurden mit der Postlabeling-Methode auf DNA-Addukte hin untersucht.

Bei den Resektionen wurde den Frauen zwischen 81 und 2227g Mammagewebe pro Seite entnommen.

Eine Übersicht über die Altersverteilung des Patientengutes gibt die Abbildung 4 wieder. Der Mittelwert der Stichprobe beträgt 35,9.

Abbildung 4 Altersverteilung des untersuchten Patientengutes.

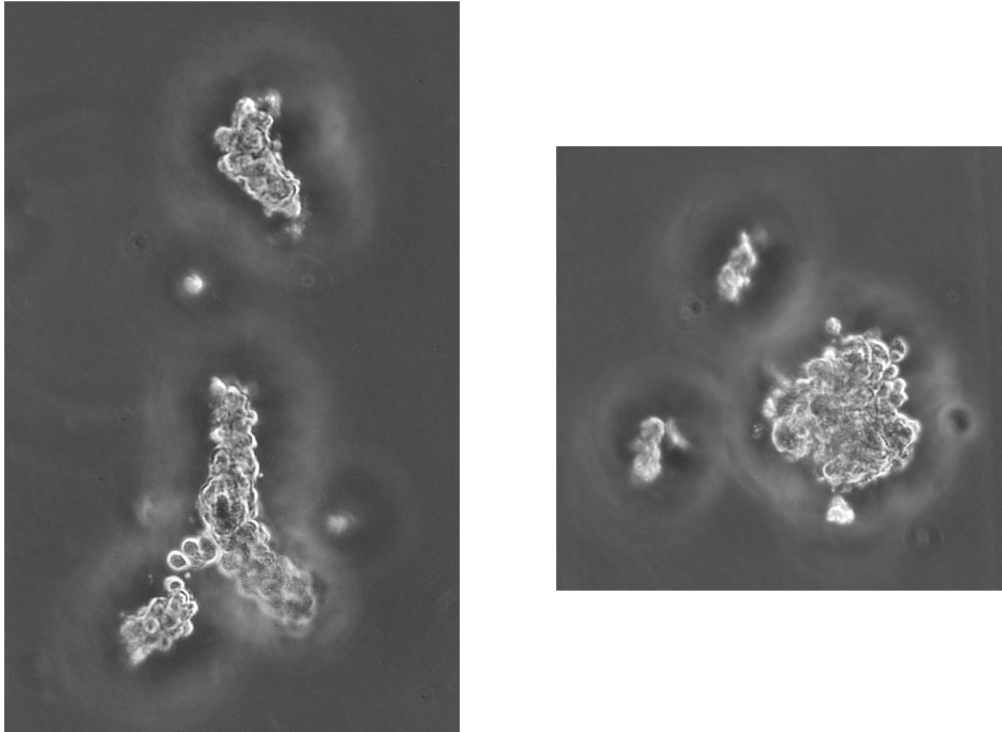


4.2 Kollagenase-Digestion und DNA-Extraktion

Nach Aufarbeitung der Proben mittels Kollagenase-Digestion lagen zwischen 20 und 190 ml Mamma-Lipid für die analytischen Untersuchungen vor. Für alle Proben konnten

Zellpellets aus dem Brustgewebe extrahiert werden. Eine mikroskopische Abbildung der duktalen und lobulo-alveolären Zellorganoide zeigt die Abbildung 5.

Abbildung 5 Lichtmikroskopische Aufnahmen der mittels Kollagenase-Digestion gewonnenen Zellorganoide (100x).



4.3 Ames-Test

Etwa die Hälfte der Proben wurden zunächst mit der Festphasen-Extraktion extrahiert. Als Positivkontrollen wurden einige Fettproben mit A α C (500ng/ μ l) dotiert und extrahiert. Als weitere positive Kontrolle wurden Aminoanthracen und PhIP im Ames-Test verwendet. Der Ames-Test wurde mit zwei verschiedenen Konzentrationen der extrahierten Proben durchgeführt (Tabelle 11 - Tabelle 12).

Es konnte weder für die Proben noch die dotierten Extrakte mutagene Aktivität nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der Methode wurden Versuche mit Butter sowie positiv und negativ Kontrollen durchgeführt. In den mit einem mutagenen Agens versetzten Proben konnte die Mutagenität nachgewiesen werden (Tabelle 9). Versuche zur Ermittlung eines Vorteils einer basischen oder sauren Hydrolyse erbrachten im Ames-Test keinen Unterschied (Tabelle 10). In einem weiteren Schritt wurde versucht durch einen Wechsel des Nährbodens (Difco-Agar), die Nachweisbarkeit zu optimieren, was allerdings zu keinem nennenswerten Effekt führte.

Im weiteren wurde die Extraktionsmethode gewechselt. Hierzu wurde die Flüssigextraktion

mit Dichlormethan (DCM) gewählt. Durch entsprechende Vorversuche konnte diese Methode validiert werden. Doch auch mittels dieser Methode konnte keine mutagene Aktivität in den einzelnen Proben nachgewiesen werden (s. Tabelle 13 und Tabelle 14). Für einige der untersuchten Proben (s. Tabelle 14: u. a. Proben-Nummer 36 und 47), die signifikant erhöht Revertantenzahlen aufwiesen, konnte ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Auch die mutagene Aktivität der Positivkontrollen konnte nur zum Teil wieder entdeckt werden.

Die farbliche Unterlegung der Ergebnisse kennzeichnet die zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Versuchsdurchläufe.

Tabelle 9 AmesTest: Vorversuche mit Butter, dotierter Fettprobe und Fettextrakt.

Ames-Test				
Bakterien Stamm: S. typhimurium YG1019 +S9				
SCX2-C18-Extraktion Vorversuche				
Probenname	Revertanten/ Platte	Mean	SD	
Aqua dest.	17,10,8	12	5	0,3
DMSO	56,45,27	43	15	1,0
Fettprobe 7 500mg/20µl	44,73,,58	58	15	1,4
Fettprobe 7	75,70,50	65	13	1,5
Butter 500mg/µl	81,*,46	64	25	1,5
Butter+MelQx 0.5µM/10µl	124,215,170	170	46	4,0
MelQx 0,71pmol/20µl	259,195,154	203	53	4,8
AAC 10ng/20µl	319,286,271	292	25	6,8

Tabelle 10 AmesTest: Vorversuche mit Olivenöl mittels NaOH- und HCl-Hydrolyse.

Ames-Test				
Bakterien Stamm: S. typhimurium YG1019 +S9				
SCX2-C18-Extraktion Vorversuche				
Probenname	Revertanten/ Platte	Mean	SD	
Aqua dest.	45, 35, 48	49	4	0,9
DMSO	55, 57, 49	54	4	1,0
NaOH	64, 59, 46	56	9	1,0
20 µl Extrakt aus 3,5g Olivenöl	55, 53, 48	52	4	1,0
20 µl Extrakt aus 3,52g				
Lipidprobe + 18ml 6N NaOH	52, 50, 54	52	2	1,0
20µl Extrakt aus 3,55				
Lipidprobe + 18ml 6N HCL	55, 59, 56	57	2	1,1
AAC 10ng/ 20µl	366, 355, 372	364	9	6,8

Tabelle 11 Ergebnisse des Ames-Test unter Verwendung der Festphasen-Extraktion und von 10µl des Fettextrakts.

Ames-Test				
Bakterien Stamm: <i>S. typhimurium</i> YG1019 +S9				
SCX2-C18-Extraktion, 10µl Fettextrakt/ Test (25.04.03)				
Probenname	Revertanten/ Platte	Mean	SD	
Aqua dest.	30, 31	31	1	0,9
DMSO	35, 33	34	1	1,0
3a	37, 39	38	1	1,1
3b	25, 20	23	4	0,7
4a	43, 21	32	16	0,9
4b	26, 41	34	11	1,0
5a	26, 30	28	3	0,8
5b	33, 39	36	4	1,1
6a	30, 33	32	2	0,9
6b	40, 23	32	12	0,9
7a	30, 31	31	1	0,9
7b	46, 31	39	11	1,1
8a	25, 38	32	9	0,9
8b	34, 32	33	1	1,0
9a	36, 28	32	6	0,9
9b	32, 28	30	3	0,9
10a	31, 34	33	2	1,0
10b	31, 42	37	8	1,1
11a	23, 32	23	0	0,7
11b	29, 33	31	3	0,9
12a	33, 34	34	1	1,0
12b	40, 31	36	6	1,0
Kontrolle1a	47, 37	42	7	1,2
Kontrolle2a	35, 29	32	4	0,9
13a	32, 28	30	3	0,9
13b	23, 34	29	8	0,8
14a	33, 36	35	2	1,0
14b	41, 32	37	6	1,1
15a	31, 27	29	3	0,9
15b	32, 39	36	5	1,0
16a	29, 28	29	1	0,8
16b	27, 36	32	6	0,9
17a	23, 38	31	11	0,9
17b	36, 35	36	1	1,0
18a	23, 27	25	3	0,7
18b	27, 33	30	4	0,9
19a	16, 33	25	12	0,7
19b	30, 36	33	4	1,0
21a	47, 40	44	5	1,3
21b	15, 17	16	1	0,5
AAC	38, 35	37	2	1,1
PhiP	1118, 1124	1121	4	33,0

Tabelle 12 Ergebnisse des Ames-Test unter Verwendung der Festphasen-Extraktion und von 20µl des Fettextrakts.

Ames-Test				
Bakterien Stamm: S. typhimurium YG1019 +S9				
SCX2-C18-Extraktion, 20µl Fettextrakt/ Test				
Difco				
Probenname	Revertanten/ Platte	Mean	SD	
Aqua dest.	35, 32	34	2	0,8
DMSO	43, 44	44	1	1,0
3a	64, 55	60	6	1,4
3b	22, 44	33	16	0,8
4a	38, 50	44	8	1,0
4b	35, 34	35	1	0,8
5a	59, 48	54	8	1,2
5b	39, 47	43	6	1,0
6a	55, 55	55	0	1,3
6b	56, 59	58	2	1,3
7a	55, 51	53	3	1,2
7b	55, 54	55	1	1,3
8a	42, 58	50	11	1,1
8b	50, 40	45	7	1,0
9a	54, 45	50	6	1,1
9b	63, 43	53	14	1,2
10a	57, 42	50	11	1,1
10b	42, 47	45	4	1,0
11a	47, 58	53	8	1,2
11b	46, 71	59	18	1,3
12a	56, 59	58	2	1,3
12b	46, 55	51	6	1,2
AAC (10ng/ 20µl	444, 519	482	53	11,1
PhiP (1µg/ 10µl)	710, 916	813	146	18,7

Tabelle 13 Ergebnisse des Ames-Test unter Verwendung der HCl-DMSO-Extraktion und von 20µl des Fettextrakts.

Ames-Test					
Bakterien Stamm: S. typhimurium YG1019 +S9					
HCl-DMSO-Extraktion, 20µl Fettextrakt/ Test					
Probenname	Revertanten/ Platte	Mean	SD		
Aqua dest.	48, 55	52	5		1,0
DMSO	58, 47	53	8		1,0
Aqua dest.	51, 41	46	7		1,0
DMSO	46, 48	47	1		1,0
4	23, 27	25	3		0,5
5	39, 27	33	8		0,7
6	30, 43	37	9		0,8
7	23, 23	23	0		0,5
9	23, 19	21	3		0,4
10	9, 10	10	1		0,2
11	25, 24	25	1		0,5
12	20, 38	29	13		0,6
13	34, 28	31	4		0,7
14	34, 33	34	1		0,0
15	24, 15	20	6		0,7
16	24, 31	28	5		0,6
17	15, 45	30	21		0,6
18	29, 9	19	14		0,4
18+	47, 38	43	6		0,9
20	24, 13	19	8		0,4
22	60, 50	55	7		1,2
23	32, 30	31	1		0,7
24	49, 53	51	3		1,1
26	35, 44	40	6		0,8
27	23, 31	27	6		0,6
28	58, 49	54	6		1,1
29	39, 36	38	2		0,8
30	46, 37	42	6		0,9
31	19, 50	35	22		0,7
32	29, 24	27	4		0,5
33	35, 25	30	7		0,6
34	35, 23	29	8		0,6
35	26, 15	21	8		0,4
36	23, 28	26	4		0,5
37	33, 25	29	6		0,6
37+	616, 605	611	8		11,6
38	22, 36	29	10		0,6
39	24, 35	30	8		0,6
40	50, 31	41	13		0,8
41	41, 42	42	1		0,8
42	26, 28	27	1		0,5
43	35, 23	29	8		0,6
44	36, 30	33	4		0,6

Tabelle 13 Ergebnisse des Ames-Test unter Verwendung der HCl-DMSO-Extraktion und von 20µl des Fettextrakts. Fortsetzung.

Ames-Test				
Bakterien Stamm: S. typhimurium YG1019 +S9				
HCl-DMSO-Extraktion, 20µl Fettextrakt/ Test				
Probenname	Revertanten/ Platte	Mean	SD	
45	44, 50	47	4	0,9
45+	526, 0	263	372	5,0
46	49, 62	56	9	1,1
47	50, 52	51	1	1,0
48	47, 41	44	4	0,8
49	30, 55	43	18	0,8
51	25, 54	40	21	0,8
53	36, 28	32	6	0,7
55	45, 42	44	2	0,9
56	62, 56	59	4	1,3
57	61, 3	32	41	0,7
59	23, 26	25	2	0,5
60	25, 31	28	4	0,6
61	35, 41	38	4	0,8
61+	20, 30	25	7	0,5
AAC	239, 254	247	11	5,2
AAC	448, 463	456	11	8,7

Tabelle 14 Ergebnisse des Ames-Test unter Verwendung der HCl-DMSO-Extraktion und von 20µl des Fettextrakts. Zweiter Durchgang mit Mamma-Fettextrakten der unteren Phase mit darin befindlichen Zellresten.

Ames-Test				
Bakterien Stamm: S. typhimurium YG1019 +S9				
HCl-DMSO-Extraktion, 20µl Fettextrakt/ Test				
Probenname	Revertanten/ Platte	Mean	SD	
Aqua dest.	35,36	36	1	0,9
DMSO	44,36	40	6	1,0
Aqua dest.	48,55	52	5	1,0
DMSO	58,47	53	8	1,0
4	33,30	32	2	0,8
5	32,32	32	0	0,8
6	39,38	39	1	1,0
7	57,56	57	1	1,4
8	3,4	4	1	0,1
9	39,40	40	1	1,0
10	58,69	64	8	1,6
11	42,45	44	2	1,1
12	54,42	48	8	1,2
13	50,48	49	1	1,2
14	55,42	49	9	1,2
15	33,32	33	1	0,8
18	33,46	40	9	1,0
20	38,39	39	1	1,0
24	52,50	51	1	1,3
26	24,30	27	4	0,7
27	23,27	25	3	0,6
28	27,30	29	2	0,7
30	20,29	25	6	0,6
32	27,28	28	1	0,7
34	49,38	44	8	0,8
36	74,77	76	2	1,4
38	40,37	39	2	0,7
39	49,59	54	7	1,0
40	30,26	28	3	0,5
41	51,*	51	*	1,3
42	33,28	31	4	0,8
43	22,20	21	1	0,5
44	21,26	24	4	0,6
45	27,27	27	0	0,7
46	50,30	40	14	0,8
47	587,277	432	219	8,2
48	42,37	40	4	0,8
49	40,48	44	6	0,8
51	45,34	40	8	1,0
52	41,27	34	10	0,9
55	24,18	21	4	0,5
56	30,27	29	2	0,7
59	35,36	36	1	0,9
AAC	354,390	372	25	9,3
AAC	448,463	456	11	8,7

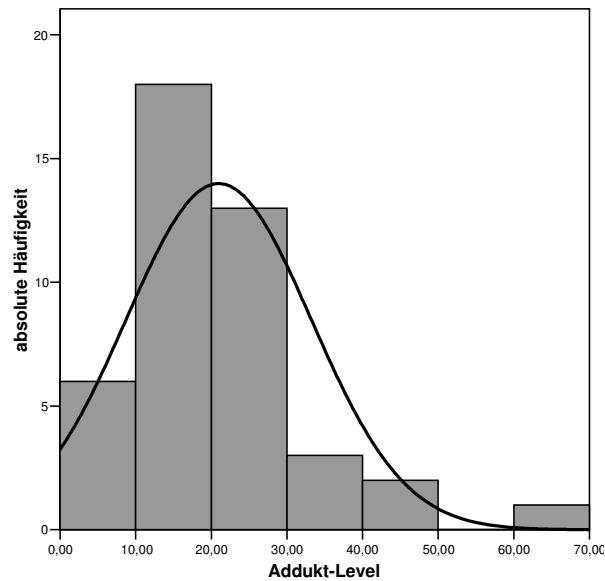
4.4 DNA-Addukte

Als Kontroll- und Referenzsubstanz wurde jeweils eine Probe modifizierter DNA mitgeführt. Für die Proben konnten Addukt-Flecken bzw. radioaktive Zonen auf den TLC-Platten zwischen 0,04 und 66,40 Addukte/ 10^9 Nukleotide ermittelt werden. Der Mittelwert der Stichprobe betrug 20,97, Standardfehler 1,87 und die Standardabweichung 12,26.

Tabelle 15 Mittels ^{32}P -Postlabeling Methode ermittelte Addukt-Level der einzelnen untersuchten Lipidproben

Proben-Nr.	mean adducts/ 10^9	Proben-Nr.	mean adducts/ 10^9
4	27,0	30	7,3
5	24,7	31	24,1
6	14,6	32	37,4
7	18,3	33	12,0
9	28,5	34	28,5
10	43,0	35	27,0
11	12,8	36	43,0
12	23,7	37	12,8
13	0,0	38	39,9
14	66,4	39	23,2
15	14,8	40	23,4
16	17,8	41	13,7
17	18,6	42	14,2
18	6,3	43	15,1
20	12,8	44	23,5
22	12,8	45	18,7
23	37,1	46	23,2
24	8,0	47	19,8
26	9,5	48	12,6
27	7,2	49	24,0
28	16,9	51	26,6
29	10,8		

Abbildung 6 Grafische Darstellung der ermittelten Addukt-Level



Im Folgenden sind exemplarisch die nach autoradiographischer Exposition entwickelten Röntgenfilme fünf verschiedener Proben dargestellt. Es zeigen sich dichte Adduktmuster, als Ausdruck einer Exposition gegenüber komplexeren genotoxischen Substanzgemischen. Des Weiteren zeigt sich nach Analyse der Proben, dass sich zwei unterschiedliche Adduktmuster identifizieren lassen (Abb. B, C und Abb. D – F). Zusätzlich ist zu erkennen, dass die Adduktmuster unterschiedliche autoradiographische Intensitäten aufweisen, die von Abb. B nach C und von Abb. D nach F zunehmen.

Abbildung 7 Darstellung der DNA-Spots nach Autoradiographie von fünf verschiedenen Gewebeproben. A= Positivkontrolle; B - F= ‚Spot-Wolken‘ der Gewebeproben (B: Probe21, C: 38, D: 24, E: 22, F: 23)

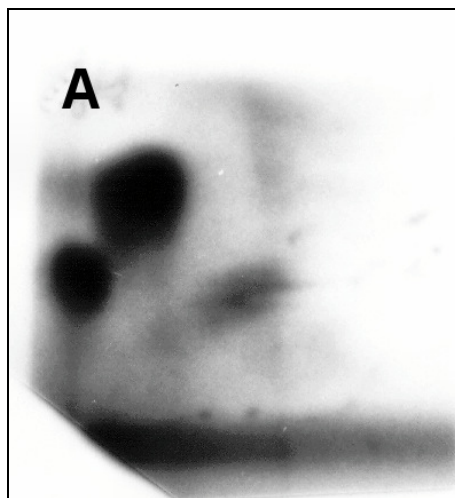
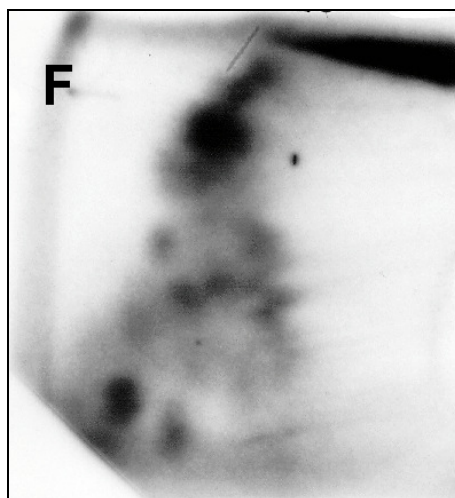
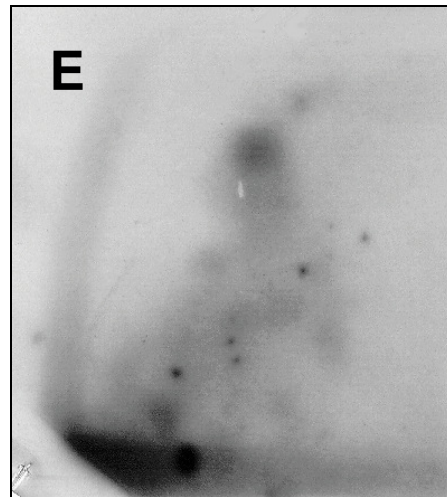
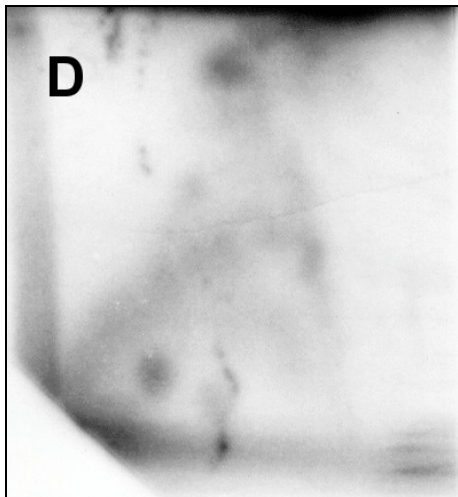
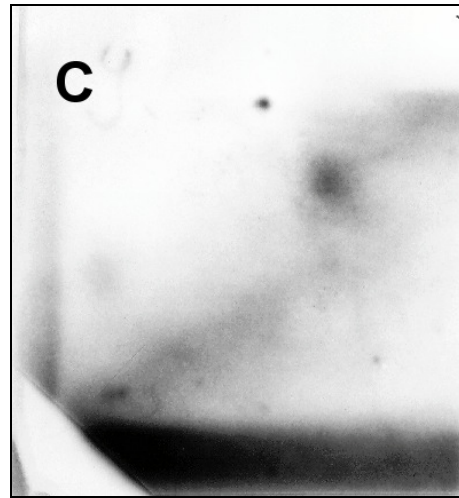
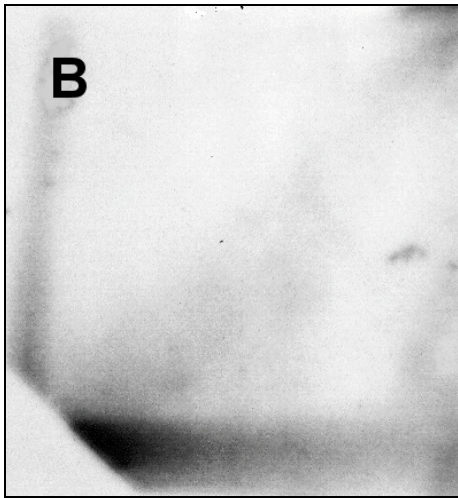


Abbildung 7 Fortsetzung



4.4.1 Tabakrauchen

Da in zahlreichen Studien ein Einfluss von Tabakrauch auf die Bildung von DNA-Addukten im Brustgewebe und anderen Gewebearten ermittelt werden konnte, wurden die Rauchgewohnheiten für die einzelnen Patientinnen ermittelt und in ‚Pack Years‘ angegeben. Dazu wurden die Rauchdauer in Jahren mit den gerauchten Zigaretten in Schachteln/ Tag multipliziert.

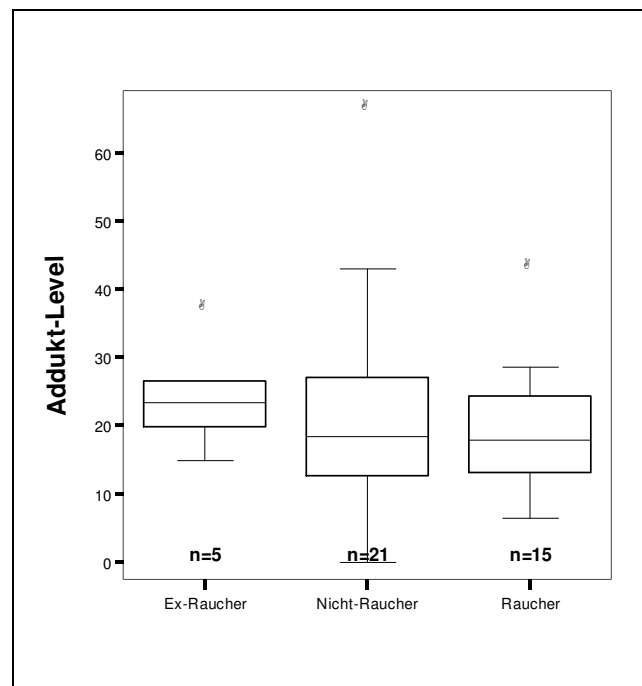
Von allen untersuchten Frauen konnten für 43 die DNA-Addukte bestimmt werden. Von diesen gaben 21 Frauen an zum Zeitpunkt der Datenerhebung zu rauchen. Für sechs der rauchenden Frauen lag jedoch keine genauere Raucheranamnese vor, so dass für 15 Patientinnen die genaue Raucheranamnese und gleichzeitig die zugehörigen Addukt-Level vorlagen.

Sechs aller untersuchten Frauen gaben an, in der Vergangenheit geraucht und zum Zeitpunkt der Datenerhebung aufgehört zu haben. Für eine der Ex-Raucherinnen lag keine Addukt-Bestimmung vor. Von allen nicht rauchenden Frauen lagen für 21 Personen die Addukt-Level vor.

Eine Übersicht über die Verteilungen der Addukt-Level für die Gruppe der Raucher (Mittelwert= 19,73; SE= 2,43; SD= 9,41), der Ex-Raucher (Mittelwert= 24,34; SE= 3,75; SD= 8,37) und der Nicht-Raucher (Mittelwert= 21,22; SE= 3,33; SD= 15,26) gibt die Abbildung 8 wieder.

Trotz des geringen Umfanges der Stichprobe wurde diese statistisch analysiert. Da die Parameter ‚Pack Years‘ und die entsprechenden ‚Addukt-Level‘ normalverteilt sind, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Für Raucher und Ex-Raucher konnte kein Zusammenhang zwischen den Addukt-Levels und den Packyears ermittelt werden ($P=0,74$).

Abbildung 8 Box-Plot-Darstellung der verschiedenen Addukt-Level für die Gruppe der Raucher, Ex-Raucher und Nicht-Raucher.



4.4.2 Alter und Klimakterium

Sieben der Frauen gaben an, ihre letzte Menstruation vor mehr als einem Jahr bekommen zu haben. Sechs der Frauen machte keine Angabe zu ihrem Zyklus, davon waren drei älter als 45 Jahre. Vier Frauen waren zwischen 45 und 50 Jahren alt und gaben an ihre Menstruation im Jahr der Erhebung bekommen zu haben.

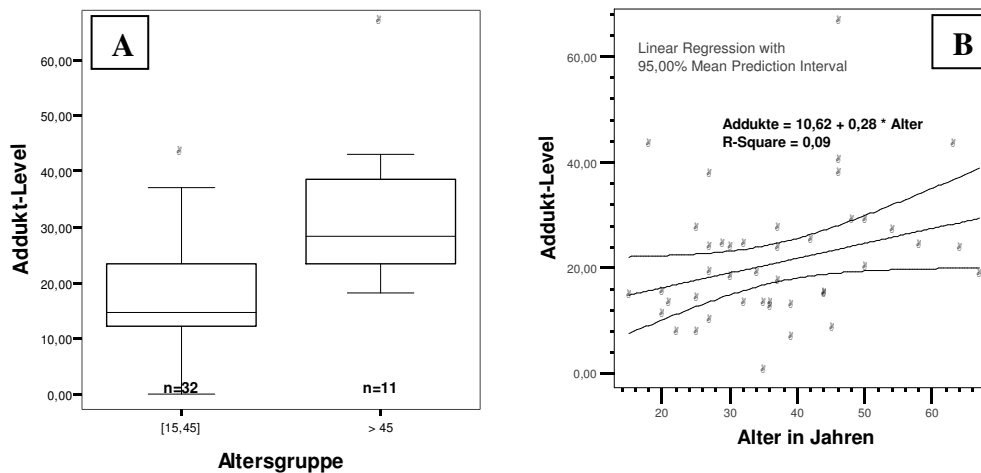
Das Klimakterium stellt die durch das Erlöschen der zyklischen Ovarialfunktion bedingte Übergangsphase von der vollen Geschlechtsreife - etwa bis zum 45. Lebensjahr - bis zu Senium (ca. ab dem 70. Lebensjahr) dar. Das zentrale Ereignis ist die Menopause (durchschnittlich im 50.-52. Lebensjahr.), welche den letzten Zeitpunkt der letzten spontanen Menstruation markiert, und der retrospektiv ein Jahr lang keine weitere ovariell gesteuerte uterine Blutung folgt.

Unter der Annahme, dass die Schäden der DNA mit dem Alter kumulieren und zunehmen, wurden die Addukt-Level auf eine mögliche Altersabhängigkeit untersucht. Aufgrund der unvollständigen Angaben wurden dazu die Patientinnen in die beiden Altersgruppen der 15-45 und der über 45 jährigen eingeteilt.

Die Abbildung 9 zeigt, dass der Median der Addukt-Level für die über 45 jährigen im Vergleich zur Altersgruppe der 15-45 jährigen etwa das Doppelte beträgt. Eine direkte Korrelation beider Datensätze mittels Pearson Korrelation bei signifikantem Kolmogorov-

Smirnov Test konnte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen beiden Parametern aufzeigen ($P= 0,56$), verfehlt aber knapp das Signifikanz-Niveau von 0,5.

Abbildung 9 A: Box-Whisker-Plot zu den Addukt-Leveln in Abhängigkeit von der Altersgruppe der 15-45 und der über 45 jährigen. B: Darstellung der zugehörigen Regressionsanalysen.



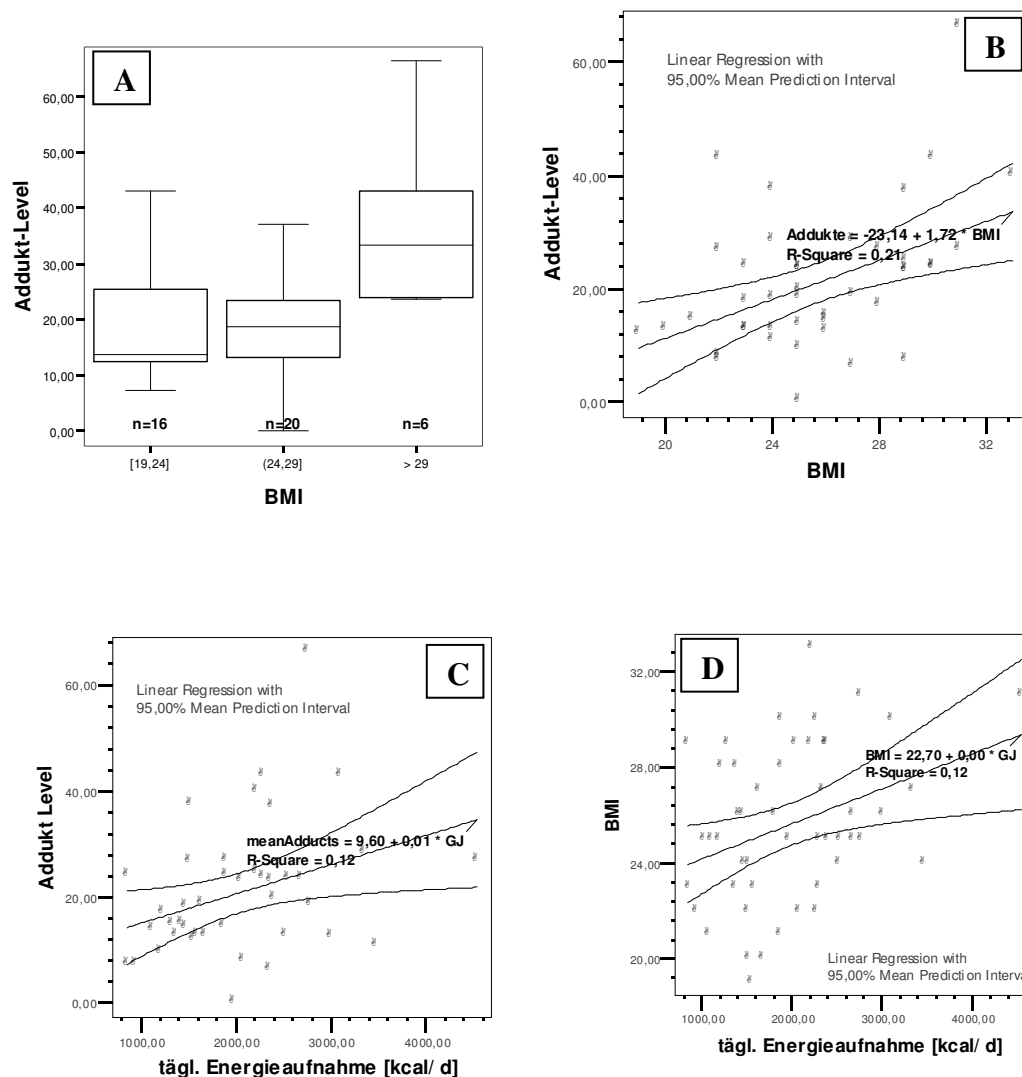
4.4.3 BMI

Aufgrund des in zahlreichen Studien untersuchten Zusammenhanges von Body-Mass-Index und Brustkrebsrisiko, wurden aus den von uns erhobenen Daten die BM-Indices errechnet und mit den entsprechenden Addukt-Levels korreliert.

Der BMI ist der Quotient aus Körpergewicht [Kg] und dem Quadrat der Körpergröße [m]. Für Frauen gelten Werte zwischen 19 und 24 als normal. Personen mit einem BMI-Wert zwischen 25 und 29 gelten als übergewichtig und Werte über 30 stehen für ein starkes Übergewicht bzw. für Fettsucht. Für 42 der Frauen, für die die Addukt-Level vorlagen, konnte der BMI ermittelt werden. Eine Patientin machte keine Angaben zu ihrer Körpergröße und Körpergewicht. Von diesen sind 16 (38 %) normalgewichtig und weisen einen BMI von 19-24 auf. Leichtes Übergewicht zeigte sich bei 20 der untersuchten Frauen (48 %). Für 6 der Frauen (14 %) konnte ein BMI von 30 und größer ermittelt werden. Der Mittelwert des BMI für die Stichprobe beträgt 25,63, $SE= 0,46$ und $SD= 3,21$. Einen Überblick über die entsprechenden Mediane der Addukt-Level für die drei Gruppen zeigt Abbildung 10. Dabei ist der Median der Addukt-Level bei Frauen mit einem BMI über 30 etwa doppelt so groß wie der in den Gruppen der Frauen mit einem BMI zwischen 19-24 und 25-29. Allerdings weisen nur sechs der untersuchten Frauen einen BMI größer als 30 auf. Dennoch zeigt sich für die Korrelation beider Parameter ein signifikanter Zusammenhang ($P_{\text{Pearson}} < 0,01$). In diesem Zusammenhang wurde auch die tägliche Energieaufnahme (kcal) mit den Addukten betrachtet. Die Daten zur Energieaufnahme

wiesen nach Ausschluss zweier Extremwerte Normalverteilung auf und es ergaben sich für den Mittelwert= 1979,91, SE= 106,66 und für SD= 754,21. Für die beiden Parameter tägliche Energieaufnahme und Addukt-Level ergab sich eine signifikante Pearson-Korrelation ($P < 0,05$). Zusätzlich erwies sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen BMI und Energieaufnahme ($P < 0,05$).

Abbildung 10 A: Verteilung der Addukt-Level in Abhängigkeit vom Body-Mass-Index. B - D: Darstellung der Regressionsanalysen zu Addukt-Level und BMI, Addukt-Level und tägliche Energieaufnahme sowie BMI und Energieaufnahme.



4.5 EPIC-Fragebogen

Sämtliche Berechnungen wurden mit freundlicher und tatkräftiger Unterstützung von S. Rohrmann et al (DKFZ) durchgeführt. Auf eine detaillierte Beschreibung zur Berechnung der HAA-Aufnahme wird an anderer Stelle näher eingegangen¹¹⁵.

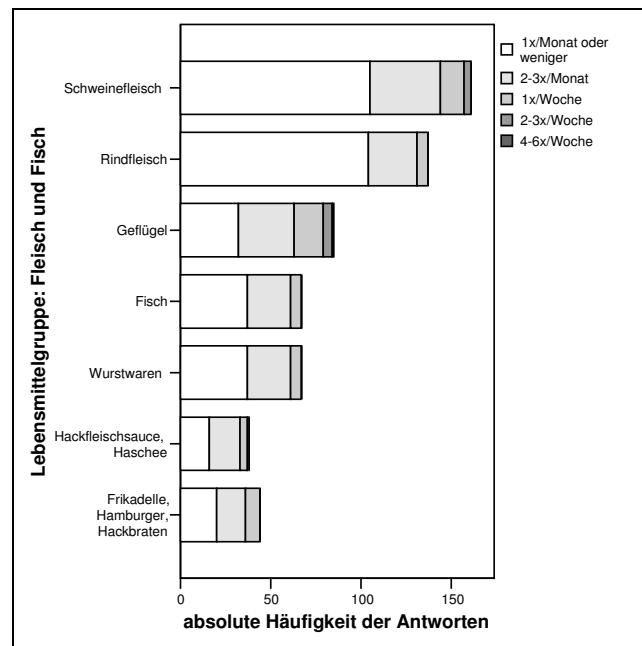
4.5.1 Fleisch- und Fischkonsum – Verzehrshäufigkeiten

Einen Eindruck über die in der vorliegenden Arbeit von den Patientinnen abgegebenen Antworten zu den einzelnen Verzehrshäufigkeiten einzelner Fleischlebensmittel gibt die Abbildung 11 wieder. Die unterschiedlichen absoluten Gesamtzahlen der Antworten zu den einzelnen Fleischsorten ergeben sich aus der unterschiedlichen Zahl abgefragter Untergruppen zu den einzelnen Fleischarten. Dieses wird aus Tabelle 38 im Anhang nochmals verdeutlicht. So werden in der Lebensmittelgruppe Rindfleisch lediglich vier verschiedene Rindfleischlebensmittel und in der Gruppe Schweinefleisch sechs Lebensmittelprodukte erfragt.

Deutlich wird, dass die einzelnen Fleischarten am häufigsten '1mal pro Monat oder seltener' und '2-3mal pro Monat' verzehrt werden. Bei den Lebensmitteln 'Kalb-, Lammfleisch, Kaninchen' und 'Leber' handelt es sich um Produkte, die von dem überwiegenden Teil der untersuchten Patientinnen nicht verzehrt werden. Der hohe Anteil an Nicht-Konsumenten für Schweinefleisch ergibt sich aus den beiden Lebensmittel-Untergruppen 'Schweinebauch' und 'Kochfleisch vom Schwein, Eisbein, Haxe', die von den meisten Frauen nicht verzehrt werden (siehe auch Tabelle 38 im Anhang).

Die Lebensmittel 'Leber' und 'Kalb-, Lammfleisch, Kaninchen' sind in der genannten Darstellung nicht dargestellt, da deren Verzehrshäufigkeit sich zu gering zeigt. Antworten zu den Verzehrshäufigkeiten '1 mal pro Tag' bis '5 mal pro Tag oder häufiger' wurde von keiner der Frauen gemacht.

Abbildung 11 Grafische Darstellung der absoluten Zahlen der von den Patientinnen abgegebenen Antworten zur Frage der Verzehrhäufigkeiten für das Lebensmittel ‚Fleisch und Fisch‘.



4.5.2 Fleisch- und Fischkonsum – Tägliche Aufnahmemengen

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die ermittelten durchschnittlichen Verzehrsmengen der einzelnen Fleischprodukte wieder. Hierbei ergab sich für das Lebensmittel ‚Fleisch‘ eine tägliche Gesamtaufnahme von 128g/d und für Fisch eine durchschnittliche Gesamtmenge von 16g/d. Dabei werden durch den Verzehr weiterverarbeiteter Fleischprodukte mit 89g/d die größten Mengen an Fleisch aufgenommen. Die Aufnahmemengen für Schweine- und Rindfleisch belaufen sich nur auf 12 und 9g/d. In der Lebensmittelgruppe Geflügel wird die größte Menge über nicht genauer klassifiziertes Geflügelfleisch aufgenommen.

Tabelle 16: Übersicht über die täglichen Aufnahmemengen (g/d) und der zugehörigen Verteilungsmaße verschiedener Fleischprodukte.

	N	Mean	Std. Error	Std. Deviation
Fleisch und Fleischprodukte, gesamt	52	127,97	38,63	278,58
Nicht klassifiziert	52	0,57	0,09	0,67
Rindfleisch	52	8,65	1,29	9,34
Kalbfleisch	52	0,55	0,24	1,73
Schweinefleisch	52	11,66	1,73	12,50
Hammel- und Lammfleisch	52	0,57	0,21	1,52
Nicht klassifiziertes und anderes Geflügel	52	11,41	1,84	13,26
Hühnchen	52	5,31	0,86	6,18
Hase (domestiziert)	52	0,04	0,02	0,14
Weiterverarbeitetes Fleisch	52	88,76	38,18	275,30
Fleischabfall, Innereien	52	0,45	0,12	0,87
Fisch und Schalentiere, gesamt	52	16,40	2,83	20,37
Fisch	52	13,03	2,15	15,51
Fischprodukte	52	3,37	0,70	5,03

Die mit Hilfe des FFQ ermittelten Verzehrdaten wurden dem Biomarker DNA-Addukt-Level aus dem Brustgewebe gegenübergestellt. Während die Gesamtmenge an Fleisch- und Fleischprodukten knapp die Signifikanz verfehlte, waren sowohl der Rindfleischverzehr und der Verzehr von weiterverarbeiteten Fleischprodukten positiv mit den Addukt-Levels korreliert. Die zugehörigen Korrelationsberechnungen gibt die unten aufgeführte Tabelle wieder.

Tabelle 17 Darstellung der Spearman Korrelationsberechnungen für die Addukt-Level und die Verzehrsmengen der Fleischprodukte.

		Addukt-Level
Fleisch und Fleischprodukte, gesamt	Correlation Coefficient	,297
	Sig. (2-tailed)	,054
Nicht klassifiziert	Correlation Coefficient	,258
	Sig. (2-tailed)	,095
Rindfleisch	Correlation Coefficient	,329(*)
	Sig. (2-tailed)	,031
Kalbfleisch	Correlation Coefficient	-,057
	Sig. (2-tailed)	,718
Schweinefleisch	Correlation Coefficient	,185
	Sig. (2-tailed)	,234
Hammel- und Lammfleisch	Correlation Coefficient	,028
	Sig. (2-tailed)	,857
Nicht klassifiziertes und anderes Geflügel	Correlation Coefficient	-,069
	Sig. (2-tailed)	,662
Hühnchen	Correlation Coefficient	,030
	Sig. (2-tailed)	,850
Hase (domestiziert)	Correlation Coefficient	-,057
	Sig. (2-tailed)	,718
Weiterverarbeitetes Fleisch	Correlation Coefficient	,325(*)
	Sig. (2-tailed)	,034
Fleischabfall, Innereien	Correlation Coefficient	,027
	Sig. (2-tailed)	,863
Fisch und Schalentiere, gesamt	Correlation Coefficient	-,079
	Sig. (2-tailed)	,616
Fisch	Correlation Coefficient	-,069
	Sig. (2-tailed)	,659
Fischprodukte	Correlation Coefficient	-,098
	Sig. (2-tailed)	,531
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)		

4.5.3 Fleisch- und Fischkonsum – Zubereitungsformen

Zur Ermittlung der alimentären HAA-Aufnahme wurden für die einzelnen Fleisch- und Fischlebensmittel die üblicherweise verwendeten Zubereitungsformen erfragt. Zur Auswahl standen die Zubereitungsformen 'Kochen oder Erhitzen', 'Kurzbraten' (Garen für kurze Zeit ohne Flüssigkeitszugabe in der offenen Pfanne), 'Panieren und Braten' (kurzes Anbraten im Topf, anschließend Durchgaren mit wenig oder ohne Flüssigkeitszugabe), 'Braten oder Schmoren' (kurzes Anbraten im Topf, anschließend mit reichlich Flüssigkeit aufgießen und im geschlossenen Topf durchgaren) und 'Grillen'. Für die einzelnen Lebensmittel konnten mehrere Angaben zur Zubereitungsart gemacht werden.

Eine Übersicht über die Antworten zu den einzelnen Lebensmitteln und den verwendeten Zubereitungsformen gibt die Abbildung 12 wieder. 'Fleischkäse' und 'Frikadellen,

Hackbraten' werden separat aufgeführt und zählen zur Fleischkategorie 'weiterverarbeitetes Fleisch'. Hierbei zeigt sich, das 'Fleischkäse' von den meisten Frauen aus Hamburg und Umland nicht konsumiert wird. Für einen übersichtlicheren Eindruck der Ergebnisse wird in Abbildung 13 die relative Verteilung der insgesamt 727 abgegebenen Antworten unabhängig von der Lebensmittelart dargestellt, wobei auf die Darstellung der verneinten und fehlenden Antworten zu den einzelnen Lebensmitteln verzichtet wurde. Eine tabellarische Auflistung der abgegebenen Antworten findet sich im Anhang in der Tabelle 39.

Abbildung 12 Darstellung der absoluten Häufigkeiten der abgegebenen Antworten zur Zubereitungsform für das Lebensmittel Fleisch.

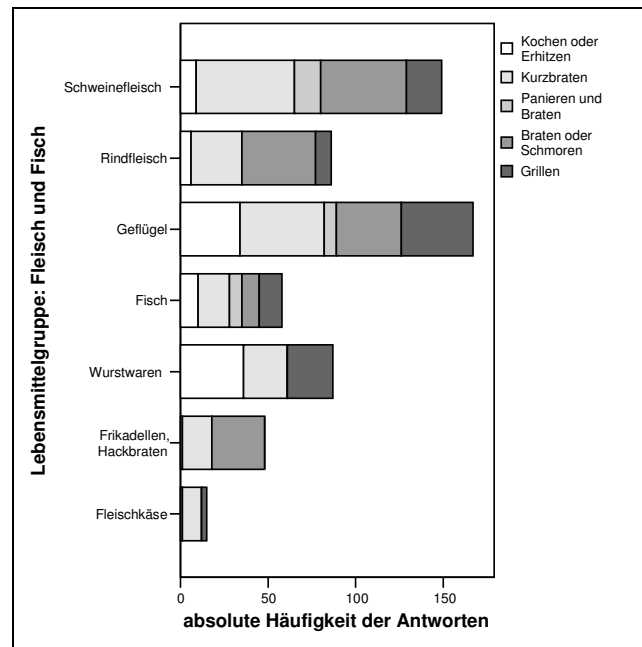
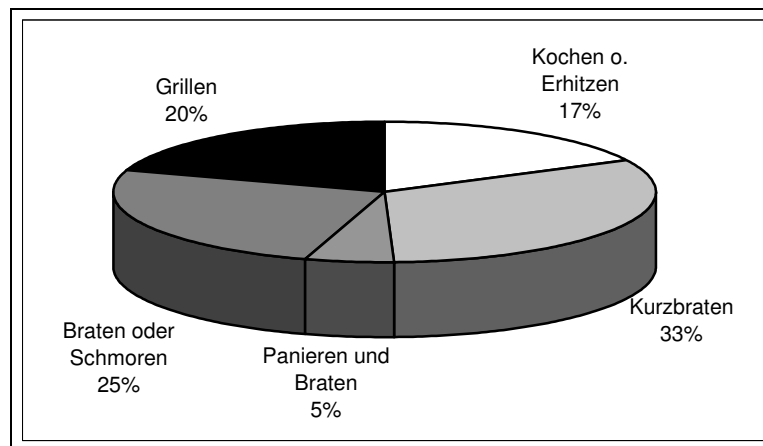


Abbildung 13 Relative Häufigkeiten der von den befragten Patienten verwendeten Zubereitungsformen unabhängig von den verschiedenen Fleischprodukten.



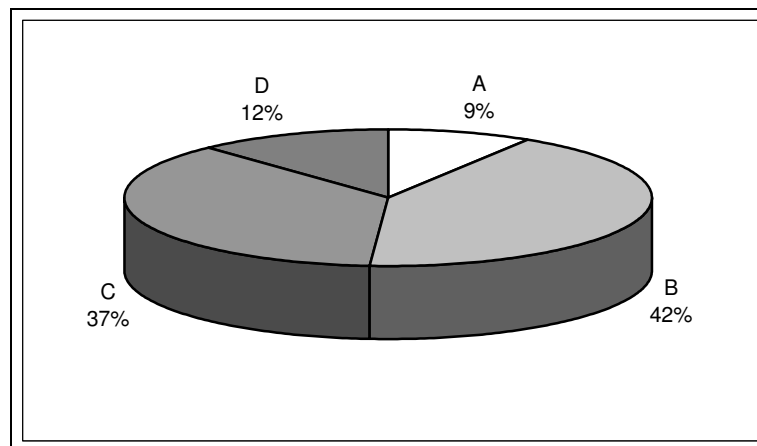
Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass 'Kurzbraten' - gefolgt von 'Braten/ Schmoren' und 'Grillen' - die am häufigsten verwendete Zubereitungsform für die Lebensmittelgruppe Fleisch darstellt. 'Panieren und Braten' wird von dem untersuchten Patientengut am seltensten bei der Zubereitung von Fleisch verwendet.

4.5.4 Fleisch- und Fischkonsum – Bräunungsgrad

Anhand von vier vorgegebenen Abbildungen sollten die Patientinnen den üblicherweise verwendeten Bräunungsgrad für Fleisch und Fisch beurteilen. Diese wurden mit den Buchstaben A-D gekennzeichnet, wobei Bild A dem stärksten und Bild D dem leichtesten Bräunungsgrad entspricht. Für die Bilder, die von der Arbeitsgruppe von Steineck und Augustsson vom Karolinska Institut in Stockholm, Schweden, der EPIC-Studie in Deutschland zur Verfügung gestellt wurden, stehen die jeweiligen Analysedaten mit den HAA-Gehalten zur Verfügung.

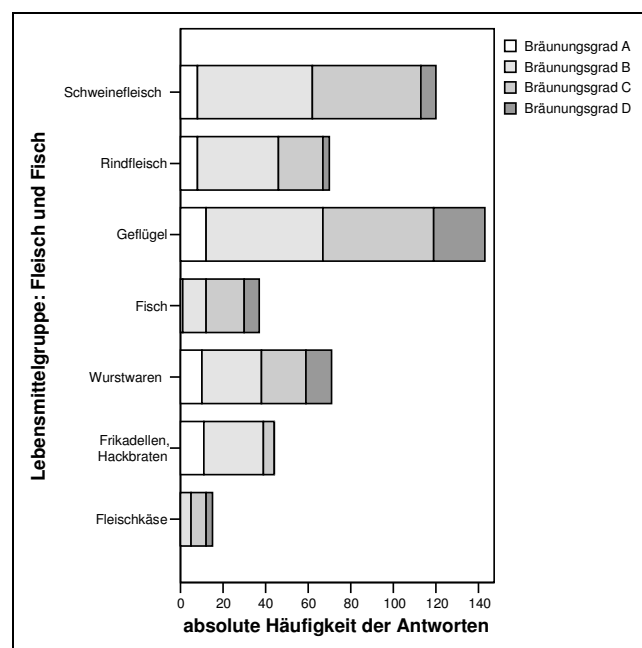
Unabhängig von den einzelnen Fleischarten zeigt Abbildung 14 die Verteilung und Häufigkeiten der verwendeten Bräunungsgrade des untersuchten Kollektivs. Es zeigt sich dabei, dass die mittleren Bräunungsgrade B und C am häufigsten verwendet werden.

Abbildung 14 Relative Häufigkeitsverteilung für die von den Patientinnen verwendeten Bräunungsgrad A-D unabhängig von der Fleischart.



Unter Berücksichtigung der einzelnen Fleischarten ergibt sich folgendes Bild für die Verteilung des Bräunungsgrades. Die zur Gruppe 'weiterverarbeitetes Fleisch' zählenden Fleischlebensmittel Wurstwaren, Fleischkäse und Frikadellen/ Hackbraten sind wieder separat aufgeführt. Die unterschiedliche Gesamtzahl der abgegebenen Antworten zu den einzelnen Fleisch-Hauptgruppen ergibt sich wieder aus der unterschiedlichen Anzahl der abgefragten Fleischuntergruppen (siehe auch Tabelle 40).

Abbildung 15 Übersicht über die absoluten Häufigkeiten der abgegebenen Antworten zum Bräunungsgrad in Abhängigkeit von der Fleischart.



4.5.5 Alimentäre HAA-Aufnahme

Zur Berechnung der alimentären HAA-Aufnahme aus den verschiedenen Fleischlebensmitteln werden neben den Verzehrsmengen die Verzehrshäufigkeiten eines Lebensmittels in einer bestimmten Zubereitungsart sowie der HAA-Gehalt für das Lebensmittel in dieser Zubereitungsart berücksichtigt, welcher sich aus dem Bräunungsgrad und dem Zubereitungsart ergibt. Zum HAA-Gehalt der einzelnen Fleischsorten in Abhängigkeit von Bräunungs- und Zubereitungsart wurden im Rahmen EPIC-Studie keine eigenen Analysen durchgeführt, sondern auf Daten in der Literatur zurückgegriffen. Eine genauere Beschreibung zur Berechnung der alimentären HAA-Aufnahme findet sich an anderer Stelle¹¹⁵. Zu den Ergebnissen im Rahmen in dieser Studie siehe Kapitel 5.3 und 5.3.

Es konnten durchschnittliche Aufnahmemengen für die HAA MeIQx (29ng/d), DiMeIQx (3ng/d) und PhiP (160ng/d) berechnet werden. Die ermittelte Gesamt-Aufnahme der HAA liegt zwischen 0 und 1016 ng/d. Die durchschnittliche alimentäre Aufnahme des von uns untersuchten Patientengutes liegt bei 193ng/d, wobei die größte Aufnahmemengen durch die PhiP-Aufnahme erfolgt (s. Tabelle 18).

Tabelle 18 Übersicht der berechneten durchschnittlichen Gesamtaufnahme, Aufnahme einzelner HAA und den zugehörigen Verteilungsmaßen.

	Mean	Std. Error	Std. Deviation
MeIQx	29,11	4,15	31,05
DiMeIQx	3,36	0,68	5,12
PhiP	159,63	31,56	236,15
HAA	193,09	33,83	253,17

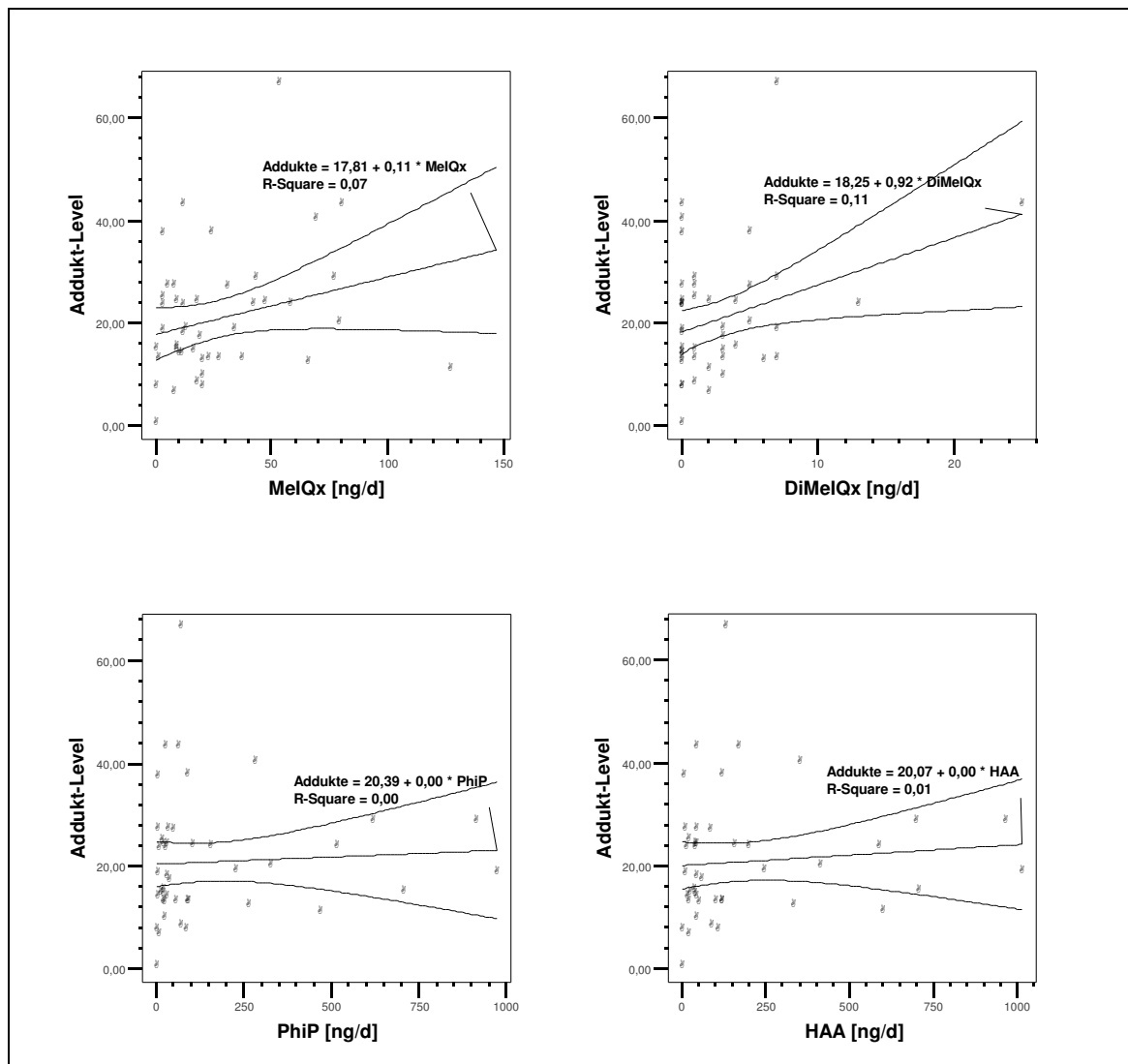
Im Folgenden wurden die HAA-Gesamtaufnahme und die Aufnahme der einzelnen HAA mit den ermittelten DNA-Addukten aus dem Brustgewebe korreliert. Dabei wiesen die HAA-Werte keine Normalverteilung auf, so dass der Spearman-Korrelationskoeffizient verwendet wurde.

Tabelle 19 Spearman-Korrelationsberechnungen zu Addukten, HAA-Gesamtaufnahme und den HAA MeIQx, DiMeIQx und PhiP.

Addukte		
MeIQx	Correlation Coefficient	0,22
	Sig. (2-tailed)	0,14
DiMeIQx	Correlation Coefficient	0,16
	Sig. (2-tailed)	0,28
PhiP	Correlation Coefficient	0,19
	Sig. (2-tailed)	0,22
HAA	Correlation Coefficient	0,20
	Sig. (2-tailed)	0,20

Weder für die tägliche alimentäre HAA-Gesamtaufnahme noch für die einzelnen berechneten HAA konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit den ermittelten Addukten berechnet werden. Im Weiteren sind die einzelnen Regressionsanalysen grafisch dargestellt.

Abbildung 16 Regressionsanalysen zu den Addukt-Leveln und den einzelnen ermittelten HAA sowie der HAA-Gesamtaufnahme.



Es zeigt sich, dass weder mit den Korrelations- noch mit den Regressionsberechnungen ein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt werden konnte. Zur Weiteren Betrachtung werden im nächsten Kapitel die Zusammenhänge nochmals in Abhängigkeit von den einzelnen Fleischsorten untersucht.

4.5.6 Alimentäre HAA-Aufnahme und einzelne Fleischsorten

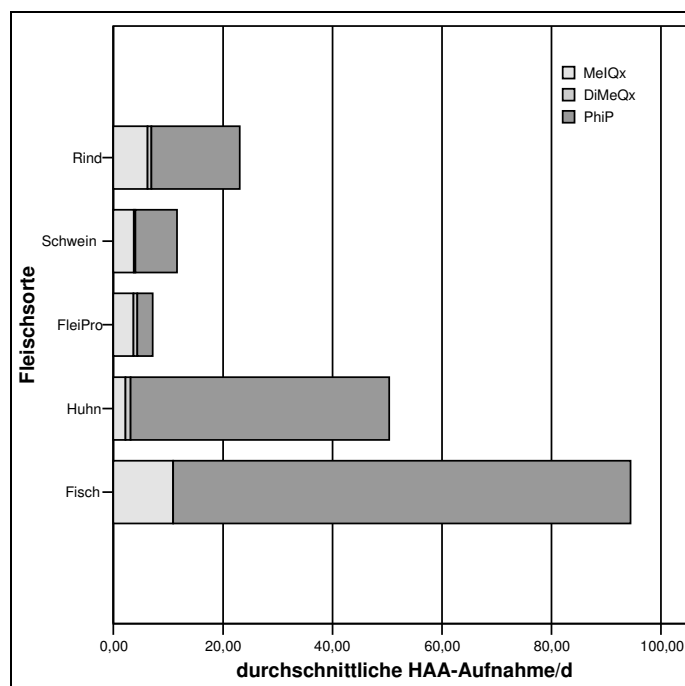
Eine tabellarische Übersicht für die drei ermittelten HAA in Abhängigkeit der verschiedenen Fleischsorten gibt die folgende Ansicht wieder.

Tabelle 20 Übersicht der durchschnittlichen Aufnahmemengen der HAA und den zugehörigen Verteilungsmaßen in Abhängigkeit von den einzelnen Fleischprodukten.

	Mean	Std. Error	Std. Deviation	Percentiles		
				25	50	75
Rindfleisch						
MelQxRind	6,23	1,61	12,07	0	1	5
DiMelQxRind	0,68	0,33	2,47	0	0	0
PhiPRind	16,14	2,95	22,08	0	7,5	21,75
HAARind	23,05	4,61	34,49	0	9,5	26,5
Schweinefleisch						
MelQxSchwein	3,71	0,64	4,79	0	2	6
DiMelQxSchwein	0,30	0,20	1,51	0	0	0
PhiPSchwein	7,59	3,23	24,16	0	0	1
HAASchwein	11,61	3,73	27,91	0	2	7,75
Fleischprodukte						
MelQx FleiPro	3,68	0,84	6,26	0	1	4,75
DiMelQx FleiPro	0,66	0,23	1,75	0	0	0
PhiP FleiPro	2,84	0,57	4,25	0	1	4
HAA FleiPro	7,18	1,51	11,31	0	2	9
Huhn						
MelQx Huhn	2,18	0,74	5,54	0	0	2
DiMelQx Huhn	0,98	0,33	2,45	0	0	1
PhiP Huhn	47,20	17,05	127,58	0	2	16,25
HAA Huhn	50,36	17,28	129,29	0	3	24,25
Fisch						
MelQx Fisch	10,89	3,71	27,74	0	0	7
DiMelQx Fisch	0,00	0,00	0,00	0	0	0
PhiP Fisch	83,57	26,44	197,89	0	0	29
HAA Fisch	94,46	28,70	214,78	0	0	36

Eine grafische Darstellung der alimentären Aufnahme einzelner HAA in Abhängigkeit von den verschiedenen Fleischsorten zeigt die Abbildung 17. Es wird deutlich, dass PhiP mit Ausnahme einer Fleischkategorie den größten Anteil der jeweiligen Fleischlebensmittel beiträgt. Dabei werden die größten Mengen über das Lebensmittel Fisch aufgenommen und die geringsten über weiterverarbeitete Fleischprodukte. Für das Lebensmittel weiterverarbeitete Fleischprodukte trägt MelQx und nicht PhiP den größten Anteil an der Gesamtaufnahme bei.

Abbildung 17 Darstellung der durchschnittlichen Aufnahmemengen [g/d] in Abhängigkeit der einzelnen Fleischprodukte.



Die Korrelation der berechneten HAA und den von uns ermittelten Addukten aufgeschlüsselt nach den unterschiedlichen Fleischarten ergab für die Lebensmittelgruppe Schweinefleisch signifikante Korrelationen mit den HAA MeIQx und PhiP. Für Fleischprodukte bzw. weiterverarbeitetes Fleisch konnten für die berechnete Gesamtaufnahme der HAA sowie für MeIQx und PhiP signifikante Korrelationen auf dem Signifikanzniveau von 0,01 berechnet werden.

Tabelle 21 Korrelationsberechnungen für die Addukte und den im einzelnen ermittelten HAA-Aufnahmemengen der verschiedenen Fleischprodukte.

		Addukte				
		Rind	Schwein	Fleisch- produkte	Huhn	Fisch
MeIQx	Correlation Coefficient	0,30	0,31(*)	0,39(**)	-0,03	-0,11
	Sig. (2-tailed)	0,05	0,04	0,01	0,82	0,46
DiMeIQx	Correlation Coefficient	0,22	-0,04	0,29	-0,01	.
	Sig. (2-tailed)	0,16	0,77	0,06	0,96	.
PhiP	Correlation Coefficient	0,27	0,35(*)	0,42(**)	0,08	-0,05
	Sig. (2-tailed)	0,08	0,02	0,00	0,62	0,73
HAA gesamt	Correlation Coefficient	0,28	0,31(*)	0,41(**)	0,07	-0,06
	Sig. (2-tailed)	0,07	0,04	0,01	0,65	0,71

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).
 **Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Abbildung 18 Regressionsanalysen zu Addukten und den berechneten HAA der Lebensmittelgruppe Rindfleisch. (Line Regression with 95,00% Mean Prediction Interval).

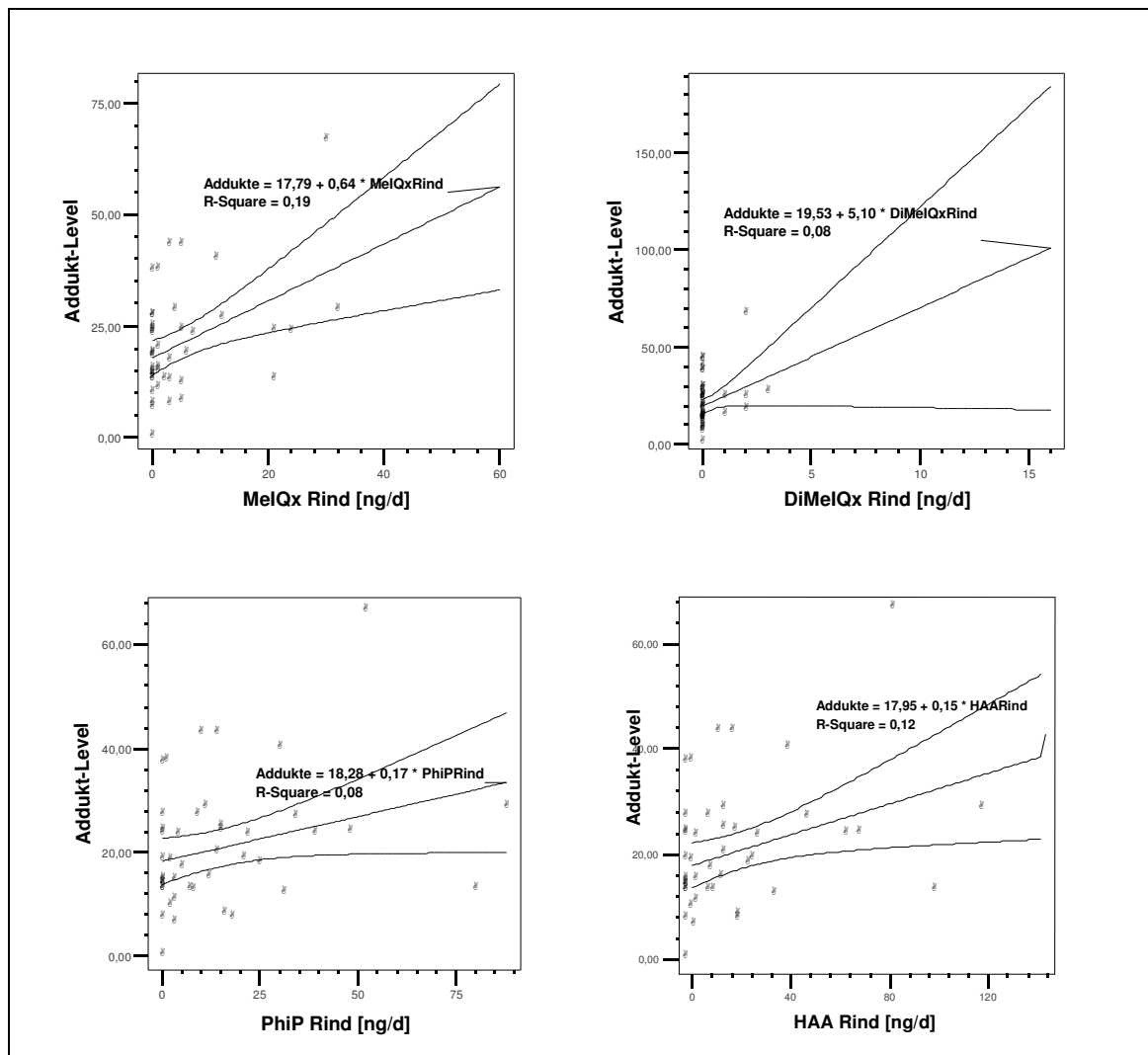


Abbildung 19 Regressionsanalysen zu Addukten und den berechneten HAA der Lebensmittelgruppe Schweinefleisch. (Line Regression with 95,00% Mean Prediction Interval).

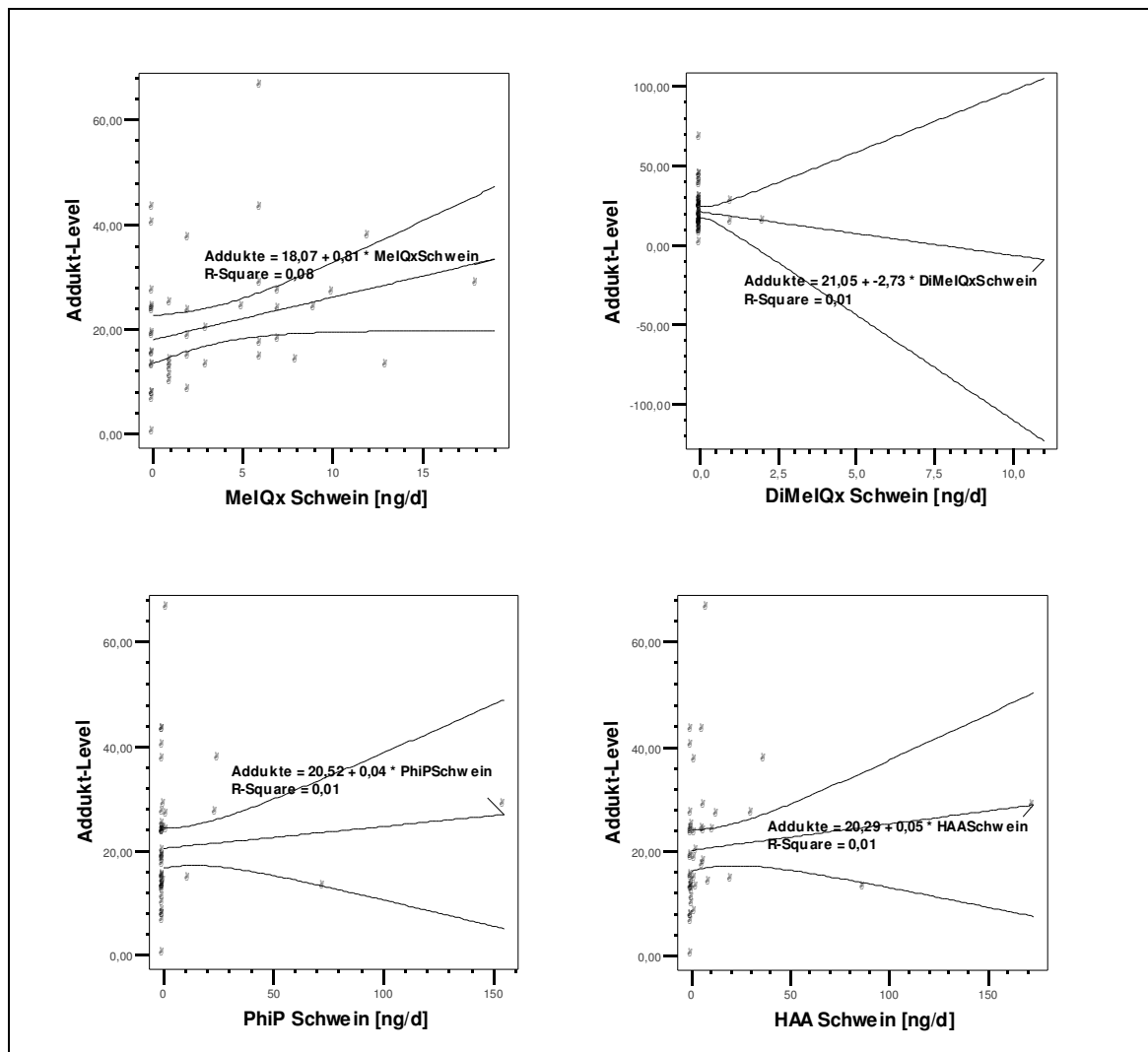


Abbildung 20 Regressionsanalysen zu Addukten und den berechneten HAA der Lebensmittelgruppe weiterverarbeitete Fleischprodukte. (Line Regression with 95,00% Mean Prediction Interval).

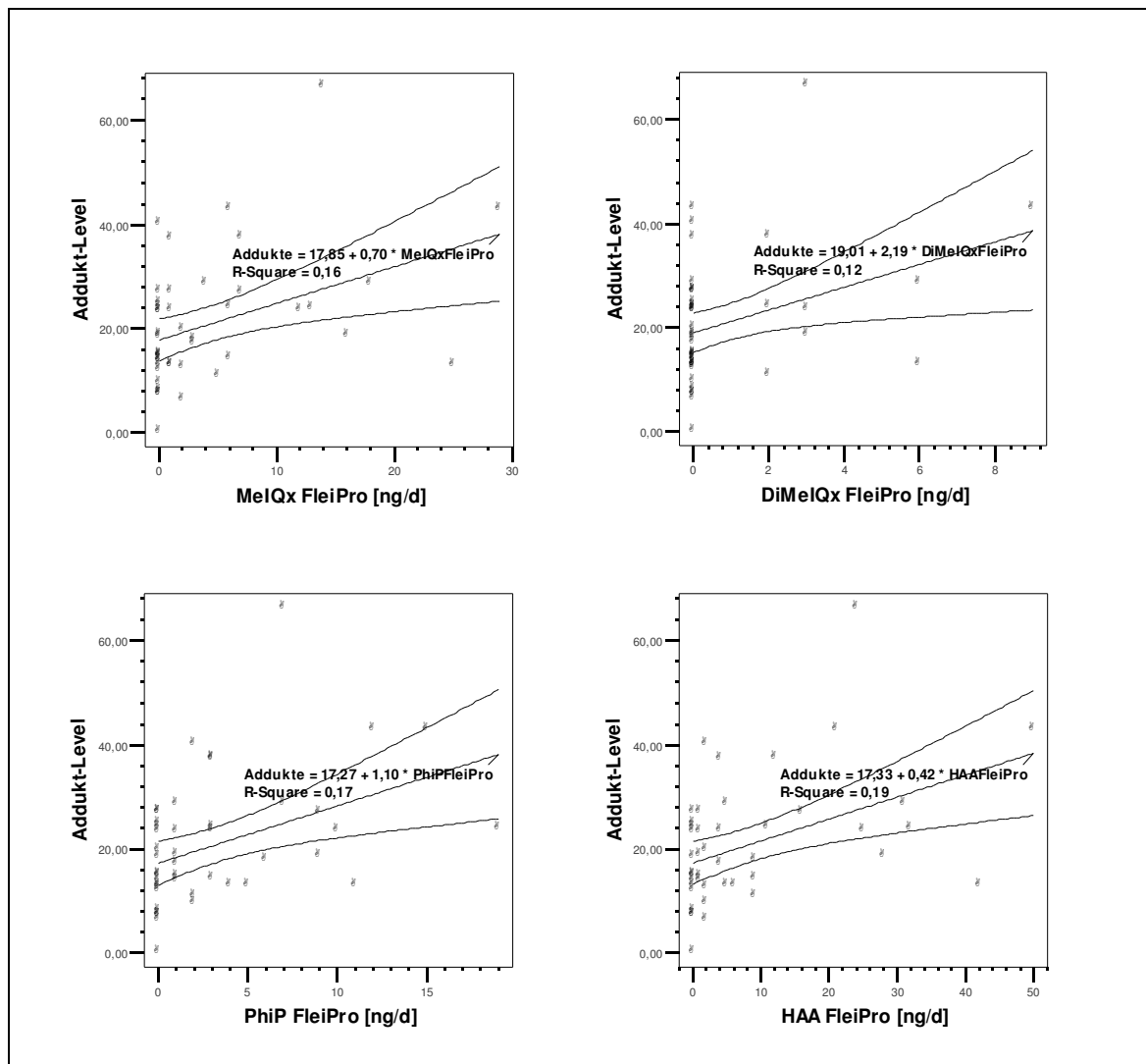


Abbildung 21 Regressionsanalysen zu Addukten und den berechneten HAA der Lebensmittelgruppe Hühnerfleisch. (Line Regression with 95,00% Mean Prediction Interval).

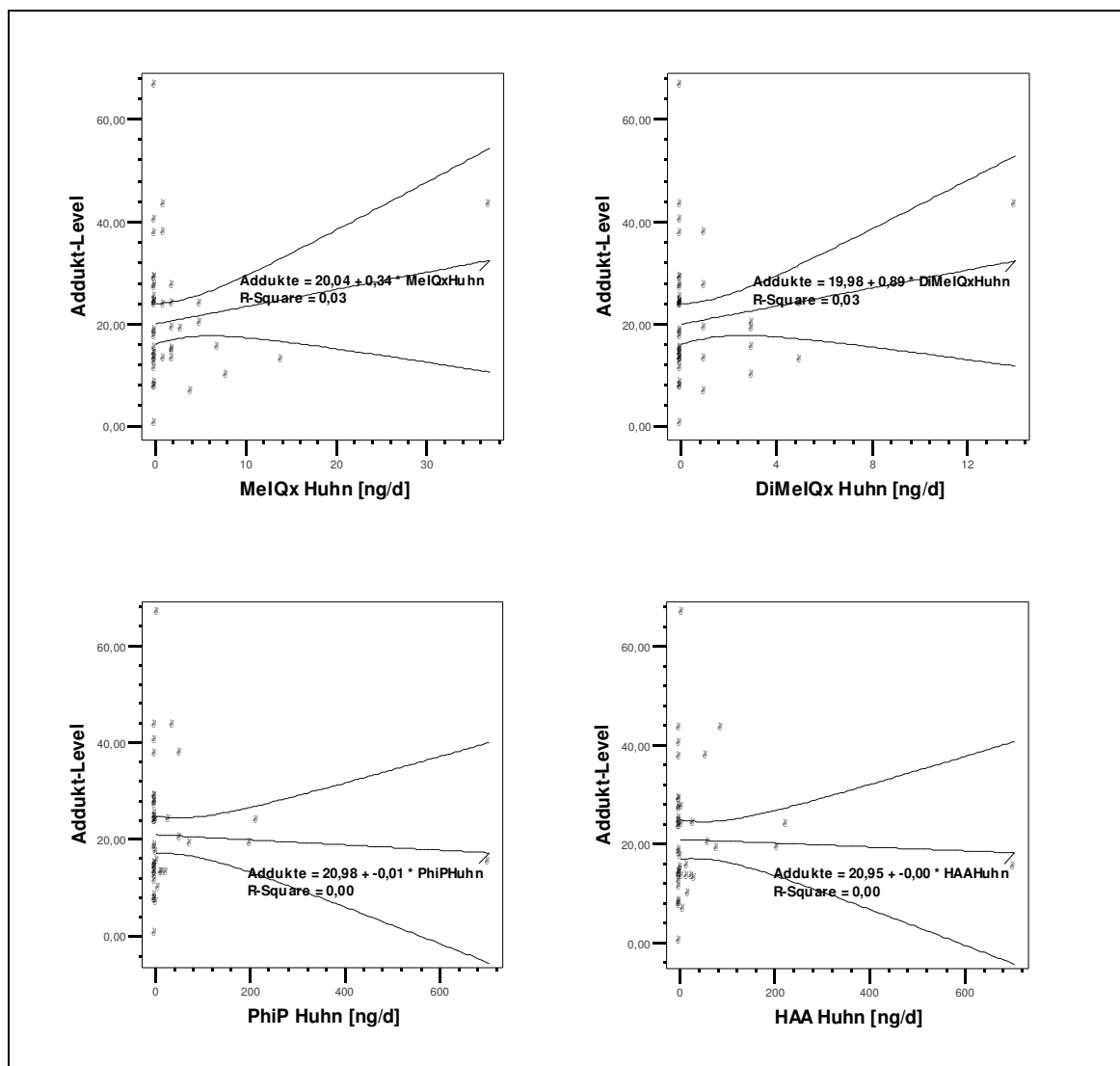
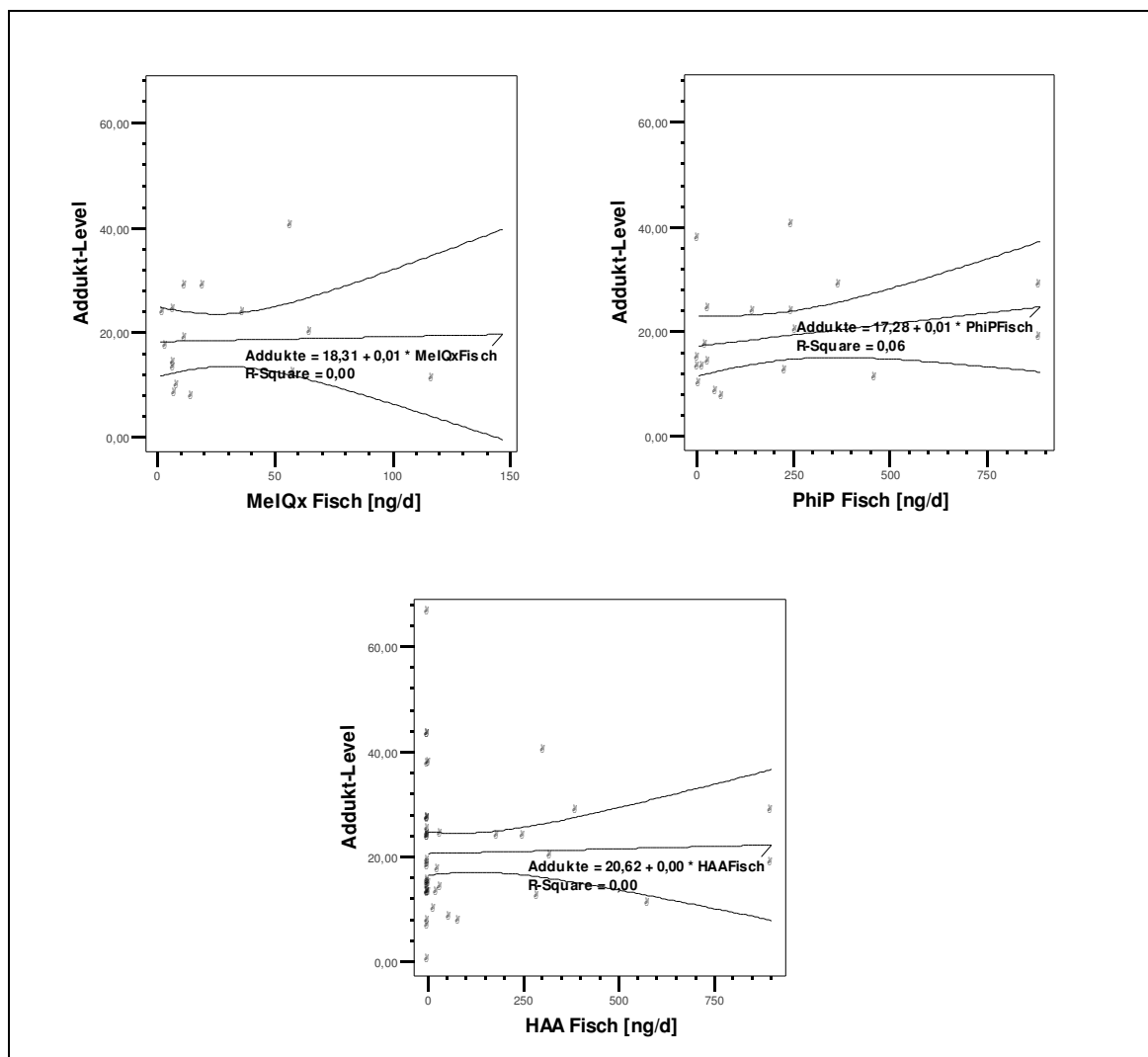


Abbildung 22 Regressionsanalysen zu Addukten und den berechneten HAA der Lebensmittelgruppe Fisch. (Line Regression with 95,00% Mean Prediction Interval).



4.5.7 Antimutagene – Gemüse und Obst

Nach Auswertung der Ernährungsfragebögen ergab sich für die durchschnittliche tägliche Gesamtaufnahme von Gemüse ein Wert von 181g/d und für Früchte ein Wert von 255g/d. Diese liegen damit über der durchschnittlichen täglichen Verzehrsmenge von Fleisch (128g/d). Einen genaueren Eindruck über die Verteilung der einzelnen Gemüse- und Obstsorten sowie deren statistischen Verteilungsmaße vermittelt Tabelle 22.

Tabelle 22 Tabellarische Übersicht über die durchschnittlichen Verzehrsmengen [g/d] und der Verteilungsmaße für die Lebensmittelgruppen ‚Gemüse und Obst‘.

	Mean	Std. Error	Std. Deviation
Gemüse.gesamt	181,17	22,62	163,11
Blattgemüse	13,25	2,62	18,91
Fruchtgemüse	81,77	11,85	85,42
Wurzelgemüse	25,75	4,73	34,10
Kohlgemüse	17,86	3,26	23,52
Pilze	2,93	0,41	2,94
Getreide und Hülsenfrüchte	7,22	1,04	7,51
Zwiebel und Knoblauch	4,67	1,18	8,52
Stielgemüse	11,42	2,18	15,72
Salat und Gemüse, gemischt	16,30	2,01	14,49
Hülsengemüse	2,78	0,64	4,59
Früchte, gesamt	260,54	70,43	507,88
Früchte	254,73	70,42	507,83
Nüsse und Samen	3,14	0,60	4,29
Früchte gemischt	2,68	0,51	3,69
Tee	306,84	71,15	466,58

Um den Einfluss einer gemüse- und obstreichen Ernährung auf die Bildung von Addukten genauer zu untersuchen, wurden die entsprechenden Parameter mit den Addukt-Leveln korreliert. Hierzu fand, da die Daten zur Gemüse- und Obstaufnahme nicht normalverteilt waren, der Spearman Korrelationskoeffizient Anwendung. Aus der Tabelle 23 ist ersichtlich, dass sich für keines der Lebensmittel aus dieser Kategorie ein signifikanter Zusammenhang mit den Addukten ergab. Allerdings konnte für etwa die Hälfte aus dieser Lebensmittelgruppe ein negativer Korrelationskoeffizient errechnet werden und könnte Hinweis auf einen protektiven Effekt sein.

Tabelle 23 Ergebnisse der Spearman Korrelationsberechnungen für Addukt-Level und die Lebensmittelgruppe ‚Gemüse und Obst‘.

		Addukt-Level
Gemüse, gesamt	Correlation Coefficient	-,025
	Sig. (2-tailed)	,874
Blattgemüse	Correlation Coefficient	-,191
	Sig. (2-tailed)	,219
Fruchtgemüse	Correlation Coefficient	,019
	Sig. (2-tailed)	,902
Wurzelgemüse	Correlation Coefficient	-,044
	Sig. (2-tailed)	,779
Kohlgemüse	Correlation Coefficient	-,146
	Sig. (2-tailed)	,349
Pilze	Correlation Coefficient	-,164
	Sig. (2-tailed)	,294
Getreide und Hülsenfrüchte	Correlation Coefficient	,266
	Sig. (2-tailed)	,085
Zwiebel und Knoblauch	Correlation Coefficient	,224
	Sig. (2-tailed)	,148
Stielgemüse	Correlation Coefficient	,137
	Sig. (2-tailed)	,380
Salat und Gemüse, gemischt	Correlation Coefficient	-,018
	Sig. (2-tailed)	,909
Hülsengemüse	Correlation Coefficient	,101
	Sig. (2-tailed)	,517
Früchte, gesamt	Correlation Coefficient	,086
	Sig. (2-tailed)	,581
Früchte	Correlation Coefficient	,116
	Sig. (2-tailed)	,460
Nüsse und Samen	Correlation Coefficient	-,136
	Sig. (2-tailed)	,384
Früchte gemischt	Correlation Coefficient	,141
	Sig. (2-tailed)	,367
Joghurt	Correlation Coefficient	-,104
	Sig. (2-tailed)	,506
Tee	Correlation Coefficient	-0,02
	Sig. (2-tailed)	0,89

4.5.8 Antimutagene – Vitamine und Ballaststoffe

Im Weiteren sind die Aufnahmemengen einzelner Nährstoffe aus Gemüse und Obst, denen eine antimutagene Eigenschaft zugesprochen wird, aufgeführt. Hierbei lässt sich erkennen, dass für das von uns untersuchte Patientengut die größten durchschnittlichen Aufnahmemengen für Vitamin C gefolgt von Vitamin E und Provitamin A berechnet werden konnten.

Für Ballaststoffe konnte eine durchschnittliche Aufnahme von etwa 26 g/ d ermittelt werden und liegt damit knapp unter der empfohlenen täglichen Aufnahme von etwa 30 g/ d.

Tabelle 24 Ermittelte durchschnittliche Aufnahmemengen (pro 1000kcal) und Verteilungsmaße der Vitamine und Ballaststoffe.

	Mean	Std. Error of Mean	Std. Deviation
Ballaststoffe, gr	25,99	3,47	25,06
Vit. C, mg	174,87	24,28	175,09
β-Carotin (Provitamin A), µg	4006,93	465,90	3359,66
Vit. E, mg	12,36	0,98	7,07
Vit. A, µg	752,50	63,61	458,69
Biotin, mg	0,05	0,00	0,03
Folsäure, µg	123,19	11,28	81,32
Vit. B2, mg	1,80	0,16	1,13
Vit. B1, mg	1,44	0,23	1,67
Vit. B12, µg	5,93	0,61	4,38
Vit. B6, mg	1,97	0,33	2,37
Vit. D, µg	3,36	0,40	2,87

Die Korrelationsberechnungen der Addukte und den einzelnen Nährstoffen ergaben neben einer positive Korrelation für Vitamin B1 keine Zusammenhänge. Die im vorherigen Kapitel aufgezeigte Tendenz nicht signifikanter negativer Korrelationskoeffizienten spiegelt sich nach Aufschlüsselung in die einzelnen Nährstoffe mit einer möglicherweise antimutagenen Eigenschaft nicht wieder.

Tabelle 25 Spearman Korrelationen für Vitamine, Ballaststoffe und DNA-Addukte.

		Addukt-Level
Ballaststoffe, gr.	Correlation Coefficient	,185
	Sig. (2-tailed)	,234
Vit. C, mg	Correlation Coefficient	,160
	Sig. (2-tailed)	,304
β-Carotin (Provitamin A), µg	Correlation Coefficient	,093
	Sig. (2-tailed)	,552
Vit. E, mg	Correlation Coefficient	,166
	Sig. (2-tailed)	,287
Vit. A, µg	Correlation Coefficient	,194
	Sig. (2-tailed)	,212
Biotin, mg	Correlation Coefficient	,221
	Sig. (2-tailed)	,154
Folsäure, µg	Correlation Coefficient	,151
	Sig. (2-tailed)	,334
Vit. B2, mg	Correlation Coefficient	,226
	Sig. (2-tailed)	,145
Vit. B1, mg	Correlation Coefficient	,315(*)
	Sig. (2-tailed)	,040
Vit. B12, µg	Correlation Coefficient	,263
	Sig. (2-tailed)	,089
Vit. B6, mg	Correlation Coefficient	,272
	Sig. (2-tailed)	,078
Vit. D, µg	Correlation Coefficient	,003
	Sig. (2-tailed)	,986
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)		

4.5.9 Fettaufnahme

Im der folgenden Tabelle sind die durchschnittlichen Aufnahmemengen der am häufigsten verzehrten Lebensmittel aus der Gruppe der Fette aufgeführt. Zusätzlich bestand die Möglichkeit mit Hilfe des EPIC-Fragebogens, die durchschnittliche Aufnahme einzelner Fette und Lipide abzuschätzen. Dabei wurde für die Fettaufnahme über die entsprechenden Lebensmittel ein durchschnittlicher Gesamtwert von 24g/d ermittelt, wobei der größte Teil über den Verzehr von Margarine aufgenommen wurde. Nach Aufschlüsselung der einzelnen Fettlebensmittel in die einzelnen Fettsäuren und Lipide konnte die größte Verzehrsmenge für die Lipide und die geringste für Cholesterin ermittelt werden.

Im weiteren erfolgte die statistische Betrachtung dieser Lebensmittel und der Lipide mit den Addukten in Tabelle 27. Auf die hierbei vermuteten Zusammenhänge zwischen Fetten, Fettsäuren und Addukten wird im Kapitel 5.4 näher eingegangen.

Es zeigt sich jedoch, dass sich kein signifikanter Zusammenhang für diese Nahrungsmittel bzw. Lipide und kovalenten Schäden der DNA ermitteln ließen.

Tabelle 26 Tägliche durchschnittliche Aufnahmemengen der Lebensmittel aus der Gruppe der Fette.

	Mean	Std. Error of Mean	Std. Deviation
Fett, gesamt (inkl. pflanzl. Öle und Margarine), gr.	24,20	2,77	19,97
Pflanzliche Öle	5,91	0,78	5,63
Butter, gr.	3,95	1,02	7,33
Margarine	12,95	2,22	15,99
Frittierfett, gr.	0,68	0,18	1,32
Lipide, gr.	85,25	9,30	67,06
Cholesterin, mg	300,61	31,08	224,09
gesättigte Fettsäuren, gr.	35,22	3,58	25,85
einfach gesättigte FS, gr.	30,53	3,90	28,09
mehrfach ungesättigte FS, gr.	13,82	1,44	10,39

Tabelle 27 Übersicht über die Korrelationsberechnungen (Spearman) der Fette und Addukte.

		Addukt- Level
Fett, gesamt (inkl. pflanzl. Öle und Margarine), gr.	Correlation Coefficient	-,025
	Sig. (2-tailed)	,872
Pflanzliche Öle	Correlation Coefficient	,041
	Sig. (2-tailed)	,792
Butter, gr.	Correlation Coefficient	-,028
	Sig. (2-tailed)	,860
Margarine	Correlation Coefficient	,073
	Sig. (2-tailed)	,640
Frittierfett, gr.	Correlation Coefficient	-,019
	Sig. (2-tailed)	,904
Lipide, gr.	Correlation Coefficient	,259
	Sig. (2-tailed)	,093
Cholesterin, mg	Correlation Coefficient	,257
	Sig. (2-tailed)	,097
gesättigte Fettsäuren, gr.	Correlation Coefficient	,227
	Sig. (2-tailed)	,144
einfach gesättigte FS, gr.	Correlation Coefficient	,249
	Sig. (2-tailed)	,108
mehrfach ungesättigte FS, gr.	Correlation Coefficient	,217
	Sig. (2-tailed)	,163

4.5.10 Alkohol

Im Folgenden ist der tägliche Alkoholkonsum für die am häufigsten verzehrten alkoholischen Getränke sowie die sich daraus ergebende Ethanol-Gesamtaufnahme aufgeführt. Bier und Wein tragen den größten Anteil zur Gesamtaufnahme alkoholischer Getränke von 91g/d bei und werden demnach am häufigsten von dem hier untersuchten Patientengut konsumiert. Die durchschnittliche tägliche Aufnahmemenge reinen Alkohols beläuft sich dabei auf 6g/d.

Tabelle 28 Durchschnittlicher Konsum (g/d) von verschiedenen alkoholischen Getränken und Aufnahmemengen reinen Alkohols.

	Mean	Std. Error of Mean	Std. Deviation
Alkoholische Getränke, gesamt [g/d]	91,14	21,72	156,65
Wein [g/d]	42,76	10,10	72,82
Angereicherte Weine (Cherry, Port, etc.) [g/d]	0,55	0,22	1,56
Bier (Cider) [g/d]	47,13	14,31	103,17
Spirituosen, Brandwein [g/d]	0,27	0,09	0,64
Likör [g/d]	0,44	0,17	1,23
reiner Alkohol [gr/1000 kcal]	6,11	1,31	9,42

Die Korrelationsberechnungen für diese Lebensmittelgruppe und den Addukten ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und DNA-Schäden.

Tabelle 29 Spearman Korrelationsberechnungen zu Alkohol und Addukten.

		Addukt- Level
Alkoholische Getränke, gesamt	Correlation Coefficient	,147
	Sig. (2-tailed)	,346
Wein	Correlation Coefficient	,097
	Sig. (2-tailed)	,537
Angereicherte Weine (Cherry, Port, etc.)	Correlation Coefficient	-,096
	Sig. (2-tailed)	,541
Bier (Cider)	Correlation Coefficient	-,078
	Sig. (2-tailed)	,620
Spirituosen, Brandwein	Correlation Coefficient	-,040
	Sig. (2-tailed)	,798
Likör	Correlation Coefficient	-,096
	Sig. (2-tailed)	,541
reiner Alkohol	Correlation Coefficient	,218
	Sig. (2-tailed)	,160

5 Diskussion

5.1 Interne Dosis: Addukt-Level

DNA Addukte als Marker der ‚internen Dosis‘ sind ein Maß für die kumulative Dosis, die das Zielmolekül, die DNA, erreichen und dort Erbsubstanz-schädigend wirken. Für das Modell der chemischen Kanzerogenese mit kovalenter Modifizierung der zellulären DNA als einer der wichtigsten Schritte in der Transformation einer gesunden Zelle zu einer Zelle mit malignem Wachstum spricht eine Reihe von experimentellen Erkenntnissen.

- Für eine Vielzahl von chemischen Substanzen laufen DNA-Adduktbildung und kanzerogenes Potential parallel¹³⁷
- Für eine große Zahl human kanzerogen eingestufte genotoxischer Stoffe konnte die parallele DNA-Adduktbildung nachgewiesen werden¹³⁸
- DNA-Addukte induzieren Mutationen¹³⁹

Die Bildung von DNA-Addukten scheint neben anderen Formen der DNA-Schädigung (Kap.1.2) ein wesentlicher Faktor im Entstehungsprozess von Tumoren zu sein. Damit stellt die Induzierung von DNA-Addukten durch eine chemische Substanz in einem biologischen Testsystem einen wichtigen Hinweis auf eine genotoxische Wirkung der untersuchten Substanz dar. Hier hat sich die ³²P-Postlabeling Methode seit ihrer Entwicklung als geeigneter Nachweis zur qualitativen und quantitativen von Addukten erwiesen und zeichnet sich durch eine vielseitige Anwendbarkeit und eine hohe Empfindlichkeit aus.

Dennoch ist auch dieser Methode Grenzen gesetzt und meist fehlt es an vergleichbaren Standards. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sie bei der Analyse unbekannter und komplexerer Gemische genotoxischer Substanzen kaum Informationen zur Struktur der von diesen Substanzen induzierten Addukte liefert. Tatsächlich ist in humanen Gewebeproben bislang nur für einige wenige DNA-Addukte eine strukturelle Aufklärung möglich gewesen.

Bei der Exposition gegenüber exogenen Substanzen ist der Mensch meist komplexen Gemischen genotoxischer Substanzen ausgesetzt. Als Paradebeispiel ist Tabakrauch, bestehend aus einem hoch komplexen Gemisch verschiedenster kanzerogener Stoffklassen, zu nennen. Aber auch Autoabgase, Emissionen aus Industrieanlagen wie Kokereien oder Hochöfen, Kohlefeuer (Gemische polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe) oder Dieselabgase (polycyclische aromatische Amine und

Nitroverbindungen) oder gebratene und gegrillte Lebensmittel (heterocyclische aromatische Amine) stellen komplexe Expositionsquellen für den Menschen dar.

Neben den DNA-Modifikationen durch exogene Substanzen ist die Rolle der Addukt-Bildung durch endogene körpereigene Stoffe ungeklärt. So konnte gezeigt werden, dass Östrogene und Produkte der Lipidperoxidation die DNA kovalent modifizieren¹⁴⁰. Umstritten ist, inwieweit diese endogenen Addukte durch Induktion von Mutationen zur Transformation der Zelle beitragen, oder ob diese natürlichen Schäden von den zellulären Schutzmechanismen besser erkannt werden und effizienter entfernt werden können.

Zahlreiche Studien konnten DNA-Addukte in humanem Gewebe nachweisen. So wiesen die Arbeitsgruppen Agundez et al.¹⁴¹, Perera et al.¹⁴² und Li et al.⁴ bereits zwischen 1995 und 1996 diese in humanen Brustgewebe nach. Dabei verwendeten die Gruppen die Nuklease P1 Methode an. Die Arbeitsgruppe von Li et al (1996) vermutete, dass es sich bei den nachgewiesenen DNA-Addukten möglicherweise um Benzo[a]pyren-artige Addukte handeln könnte. Allerdings stützt sich diese Hypothese nur auf dünnsschichtchromatographische Analysen.

Auch in einer aktuelleren Studie²¹³, bei der abgeschilferte duktale Epithelzellen der Brustdrüse untersucht wurden, konnten mittels ³²P-Postlabeling und Dünnschichtchromatographie nicht-polare DNA-Addukte nachgewiesen werden. Dabei wurden Gewebeproben von 50 Frauen untersucht und die Addukte mit der Festphasen-Methode mittels hydrophobischen Oasis Kartuschen angereichert. Von 46 Zellpellets konnten für 45 Proben DNA-Addukte durchschnittlich zwischen 1-10 Addukte/ 10⁸ Nukleotide nachgewiesen werden. Den höchsten Level wies eine Probe mit 100 Addukte/ 10⁸ Nukleotide auf. Durch das Mitführen von verschiedenen DNA-Addukt-Standards (Biphenyl, Benzo[a]pyren, PhIP, IQ, MeIQx AαC) konnten die angereicherten Addukte durch ein ähnliches chromatisches Verhalten am ehesten dem 4-Aminobiphenyl (dG-C8-4-Aminobiphenyl) zugeordnet werden. Eine genauere Analyse dieser Addukte z. B. mittels HPLC-Methode wurde jedoch nicht durchgeführt.

Bislang gelang nur einigen Studien eine unzureichende Identifizierung von HAA-induzierten DNA-Addukten in humanem Gewebe. So berichtet eine Untersuchung¹⁴³ von dem Nachweis von PhIP-Addukten mittels ³²P-Postlabeling-Methode und Gas-Chromatographie in der humanen Kolon Mukosa von nur zwei operativen Proben. Im Rahmen derselben Studie konnten keine Addukte in Gewebeproben des Pankreas und der Gallenblase nachgewiesen werden. In einer anderen Untersuchung¹⁴⁴, bei der auch die ³²P-Postlabeling-Methode zum Nachweis von HAA induzierten DNA-Addukten verwendet wurde, konnten nur in drei von 38 Gewebeproben Addukte identifiziert werden.

Eine neuere Untersuchung¹⁴⁵ konnte erstmals PhIP-Addukte erfolgreich im humanen Brustgewebe identifizieren und damit neue Hinweise auf die Induktion von HAA-DNA-Addukten durch eine alimentäre HAA-Aufnahme liefern. In dieser Studie wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen PhIP-Addukte eine alternative immunhistochemische Methode zur Detektion und Identifizierung von DNA-Addukten in humanen Geweben mit unbekannter Exposition gegenüber HAA etabliert.

Die Methode wurde zunächst in mit verschiedenen Dosen N-hydroxy-PhIP behandelten MCF-7-Zellen validiert. Neben einer signifikanten Dosis-Wirkungs-Beziehung, konnte für die mittels Immunhistochemie und ³²P-postlabeling identifizierten PhIP-Addukte in MCF-Zellen ein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden.

In einem weiteren Schritt wurden in dieser Studie Brustgewebeproben von 106 Patientinnen mit diagnostiziertem Brustkrebs, die sich einer Mastektomie unterzogen, und 49 Proben von gesunden Frauen, die sich einer Reduktionsmammaplastie unterzogen, untersucht. Nach Inkubation der Gewebeproben mit den spezifischen Antikörpern und anschließender immunhistochemischer Anfärbung konnten in 87 der 106 (82%) Proben der Brustkrebs Patientinnen und in 35 von den 49 (71%) Kontrollproben positiv angefärbt werden. Über die Anfärbintensität der Gewebeschnitte konnte für die Kontroll-Gruppe ein durchschnittlicher Addukt-Level von 2,6 Addukten/ 10⁷ Nukleotide berechnet werden. Dennoch gelang auch hier eine strukturelle Identifizierung bzw. Analyse der Addukte mittels ³²P-Postlabeling oder chromatographischer Methoden nicht.

Damit liefert diese Identifizierung und Charakterisierung von PhIP- und anderen HAA-DNA-Addukten - neben den epidemiologischen Indizien - Hinweise auf die Induktion von DNA-Schäden durch HAA in humanem Brustgewebe. Und weisen daraufhin, dass die bei der humanen Ernährungsgewohnheit entstehenden HAA DNA-Addukte in der humanen Brust induzieren können.

In einer zuvor durchgeführten Untersuchungen in unserer Abteilung¹⁴⁶, bei der 31 Mammagewebeproben von gesunden Patientinnen im Alter zwischen 29 und 75 Jahren (Mittelwert 31 J.) untersucht wurden, konnten zwar Addukte im Brustgewebe der Frauen nachgewiesen werden, aber eine genauere Charakterisierung dieser mittels HPLC gelang nicht. Zwar konnten für die HPLC typische chromatographische Peaks nachgewiesen werden, aber ein Vergleich dieser chromatographischen Eigenschaften mit aromatischen Standards, wie z. B. PAH- aromatischen Amin- oder HAA-DNA-Addukten, konnte keine Übereinstimmungen der Retentionszeiten mit denen aus dem Mammagewebe erbringen. Auch ein Vergleich der mitgeführten positiv Kontrollen, PhIP-modifizierte DNA, erbrachten in den dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen keine Übereinstimmung.

Einen weiteren wesentlichen Faktor der ³²P-postlabeling-Analysemethode stellt die Wahl der Anreicherungs-methode der Addukte nach DNA-Extraktion aus den entsprechenden Zellen dar. In der bereits o. g. Untersuchung von Pfau et al wurden zur Anreicherung die Butanol-

und die Nuklease P1-Hydrolyse verwendet. In der hier durchgeführten Studie wurde auf die Festphasenextraktion der mit Phosphat markierten Addukte zurückgegriffen (Kapitel 2.5).

Im Weiteren bestand die Bestrebung die nachgewiesenen Addukte qualitativ nicht nur durch den Vergleich mit verschiedenen Standards genauer zu bestimmen, sondern durch die Erhebung der individuellen alimentären HAA-Exposition Zusammenhänge mit den an der DNA zu messenden Schäden zu identifizieren, und damit die epidemiologischen und die chemisch-toxikologischen Ergebnisse zu bestätigen.

5.2 Externe Dosis: alimentäre HAA-Aufnahme

Zahlreiche Untersuchungen zeigen die Bedeutung der alimentären HAA-Aufnahme und ihrer Erfassung im Zusammenhang mit dem Risiko von Krebserkrankungen auf. So konnte z. B. im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien aus den USA ein signifikanter Zusammenhang zwischen MeIQx und kolorektalen Adenomen^{147 148}, MeIQx und Lungenkrebs¹⁴⁹ sowie zwischen PhIP und Brustkrebs¹⁵⁰ ermittelt werden. In einer weiteren US-amerikanischen Studie wiederum konnte ein positiver Zusammenhang zwischen einer alimentäre HAA-Aufnahme und dem Erkrankungsrisiko für Brustkrebs nicht bestätigt werden¹⁵¹.

Analoge Studien für Europa sind dagegen weniger zahlreich vorhanden. Im Rahmen der Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Augustsson et al. aus Schweden¹⁵², die zwar keine signifikanten Zusammenhänge finden konnten, konnten jedoch die höchsten HAA-Aufnahmemengen in Gewebeproben von Krebspatienten nachgewiesen werden.

Weitere Hinweise auf die alimentäre Bedeutung der HAA liefert eine Untersuchung¹⁵³, bei der geringe Dosen von radioaktiven ¹⁴C-PhIP und ¹⁴C-B[a]P oral appliziert wurden und in den Epithelzellen der humanen Brust nachgewiesen werden konnten.

Im Rahmen erster Follow-up-Untersuchungen der EPIC-Heidelberg-Studie konnte die alimentäre HAA-Aufnahme für 344 Teilnehmer (186 Frauen, 158 Männer) im Alter von 35 und 65 Jahren (Median 49 J.) ermittelt werden¹³⁴. Bis dato gab es keine Angaben bzw. Abschätzungen zur HAA-Aufnahme über die Ernährung für Deutschland.

Der Median der HAA-Gesamtaufnahme betrug 103 ng/ d. Dabei ergab sich für Frauen im Vergleich zu den Männern eine nicht signifikant geringere Gesamtaufnahmemenge (Frauen: 96 ng/ d, Männer: 113 ng/ d). In der zugehörigen Veröffentlichung¹³⁴ lagen lediglich die alimentäre HAA-Gesamtaufnahme für Frauen und Männer vor, so dass eine genauere Aufschlüsselung der HAA-Aufnahme und ein Vergleich dieser Daten mit denen der von uns untersuchten Gruppe von Frauen nicht möglich war. Eine Übersicht der EPIC-Ergebnisse gibt Tabelle 30 wieder.

Tabelle 30 Ergebnisse zur alimentären HAA-Aufnahme [ng/d] der EPIC-Studie (Heidelberg).

	Median	Perzentile		Maximum
		25	75	
HAA-Gesamt	103	29	303	4194
PhiP	63	6	225	4060
MelQx	34	12	118	880
DiMelQx	2	0	4	123
IQ	0	0	1	8

Im direkten Vergleich ist die in der vorliegenden Studie ermittelte alimentäre Gesamtaufnahme und die Aufnahme einzelner HAA in der folgenden Tabelle aufgeführt. Mit Hilfe des Fragebogens konnte eine durchschnittliche Aufnahme (Median) von 87ng/ d berechnet werden und entspricht in etwa den Ergebnissen aus Heidelberg.

Tabelle 31 Ergebnisse zur alimentären HAA-Aufnahme [ng/d] der vorliegenden Untersuchung.

	Median	Perzentile		Maximum
		25	75	
HAA-Gesamt	86,5	27,75	234,25	1016
PhiP	58,5	19	214,25	974
MelQx	18	9	42	147
DiMelQx	1	0	5	25
IQ	0	0	0	0

Entsprechende Untersuchungen, in denen ebenfalls mittels eines speziellen Ernährungsfragebogens die tägliche HAA-Gesamtaufnahme ermittelt wurde, finden sich auch in anderen Ländern.

In einer Studie aus Schweden¹⁵² konnte eine tägliche HAA-Aufnahme von 77ng berechnet werden. Dabei wurden zum großen Teil nicht eigene Analysen für gegrilltes Fleisch verwendet, sondern auf Daten für kurzgebratenes Fleisch zurückgegriffen.

Die Berechnungen zur alimentären HAA-Aufnahme aus dem US-amerikanischen Raum zeigen sich dahingegen mit teilweise sehr unterschiedlichen Werten. In einer Studie, bei der aus drei großen prospektiven Kohorten jeweils Proben von 250 Teilnehmern untersucht wurden, wurde eine tägliche HAA-Gesamtaufnahme von sogar 522ng/d¹⁵⁴ bestimmt. Hierbei wurde allerdings vermehrt gegrilltes Fleisch von den Studienteilnehmern verzehrt, für das relativ hohe HAA-Werte im Rahmen von studieneigenen Analysen ermittelt wurden. In den Kontrollgruppen zweier Fall-Kontroll-Studien aus Maryland konnten HAA-Gesamtaufnahmemengen von 99ng/ d¹⁴⁸ und 214ng/ d¹⁴⁹ ermittelt werden. Im Rahmen einer aktuellen Validierungsstudie¹⁵⁵ zu einem entwickelten Lebensmittelhäufigkeitsfragebogen aus den USA mittels einer Referenzmethode, bei der innerhalb von drei Monaten dreimal die Ernährungsgewohnheiten der Studienteilnehmer an

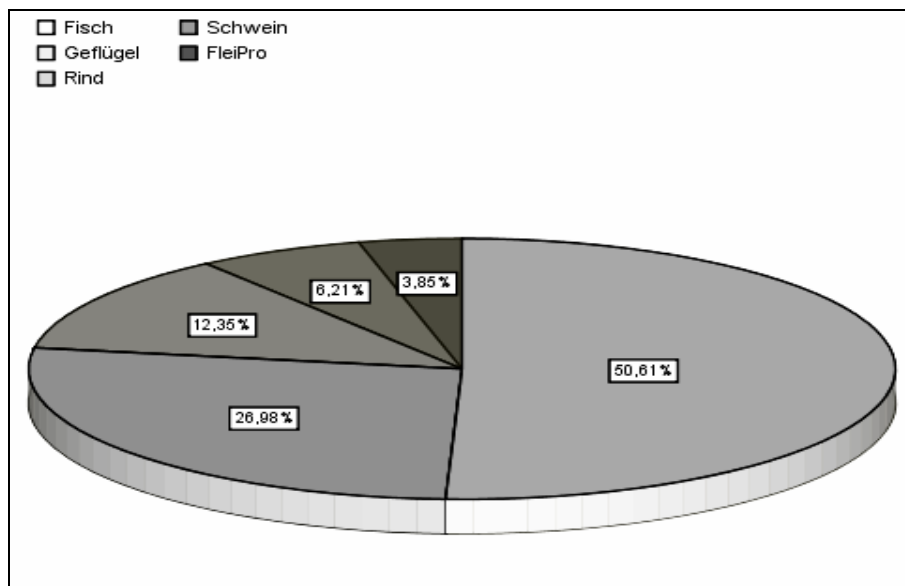
vier verschiedenen Tagen pro Woche erhoben wurden, wurden allein für die beiden HAAs PhIP und MeIQx eine Gesamtaufnahmemenge von 299ng/ d ermittelt.

Auch auf einen Lebensmittelhäufigkeitsfragebogen basierend berechnete das Japan Public Health Center (JPHC) im Rahmen einer prospektiven Studie die individuelle Aufnahme von sechs HAA für 39035 Studienteilnehmern (20745 Frauen, 18290 Männer) aus vier japanischen Regionen. Trotz anderer Ernährungsgewohnheiten und verwendeter Zubereitungsformen der japanischen Ernährungsweise wurden den in Europa ermittelten Werten ähnliche Ergebnisse bestimmt. Für die Frauen-Population konnte dabei eine durchschnittliche alimentäre HAA-Aufnahme von 1,10ng/ Kg/ d (Männer: 1,06ng/ Kg/ d) für die drei Regionen der japanischen Hauptinsel (Iwate, Akita, Nagano) berechnet werden. Der Aufnahme-Level für die Insel-Region Okinawa lag bei den weiblichen Studienteilnehmern bei 0,92ng/ Kg/ d (Männer: 0,83ng/ Kg/ d). Für eine Frau mit einem Körpergewicht von 60kg ergeben sich daraus Werte von 66ng/d für die drei Regionen der japanischen Hauptinsel und 55ng/ d für Okinawa. Die größte Aufnahmemenge wurde dabei mit etwa 60% der Gesamtaufnahme für PhIP ermittelt. Auf der Hauptinsel wurden mehr als 50% der HAA durch den Verzehr von Fisch und auf Okinawa durch Schweinefleisch aufgenommen.

Bei dem direkten Vergleich solcher Studien stellen sich mehrere Probleme. Zum einen zeigen sich die Berechnungen der HAA für verschiedene Fleischsorten in den einzelnen Studien durch die verwendeten Analysedaten und der damit verbundenen Vorgehensweisen bei der Zubereitung zwischen den Studien aber auch innerhalb derselben Studie beträchtlichen Schwankungen unterworfen. Eine weitere Schwierigkeit zeigt sich in der Definition der einzelnen unterschiedenen Zubereitungsformen selbst, da diese z. T. in den einzelnen Ländern sehr unterschiedlich definiert und interpretiert werden. So kann z. B. Grillen im Backofen, auf dem Elektrogrill oder über dem offenen Feuer bedeuten¹⁵⁶ und mit unterschiedlicher HAA-Entwicklung einhergehen. Auch die Gargrade eines Fleischstückes werden in verschiedenen Ländern teilweise sehr unterschiedlich interpretiert. Auch die Beschaffenheit - Dicke und Wassergehalt - des Fleisches, das Verwenden von Gewürzen und Marinaden und das Gargeschirr (Töpfe und Pfannen aus verschiedenen Materialien, die die Wärme unterschiedlich weiterleiten) beeinflussen den HAA-Gehalt in einem Lebensmittel¹⁵⁷. Dies macht die Vergleichbarkeit von Daten unterschiedlicher Studien, aus verschiedenen Ländern und verschiedenen Laboren schwierig. Und auch aufgrund von Unterschieden im Studiendesign, der verwendeten Referenzmethoden und der unterschiedlichen untersuchten Studienpopulationen gestaltet sich der direkte Vergleich solcher Studien nicht ganz einfach und ist kritisch zu bewerten.

In Abhängigkeit von den einzelnen erfragten Fleischprodukten konnten in unserer Untersuchung die größten Aufnahmemengen für Fisch, gefolgt von Geflügel-, Rind- und Schweinefleisch, berechnet werden. Die geringsten HAA-Mengen wurden für die Lebensmittelgruppe der weiterverarbeiteten Fleischprodukte ermittelt. Im Vergleich hierzu wurden in der o. g. Heidelberger Untersuchung für die Fleischgruppe Geflügel (44%) die größte alimentäre HAA-Verzehrmenge berechnet, gefolgt von Fisch (35%) und Rindfleisch (9%).

Abbildung 23 Alimentäre HAA-Aufnahme in Prozent aufgeführt nach den einzelnen Fleischlebensmitteln.



5.3 Addukte und HAA

In Bezug auf einen Gesundheitseffekt konnte für einen vermehrten Fleischkonsum sowohl Gesundheitsvorteile als auch ein erhöhtes Erkrankungsrisiko identifiziert werden¹⁵⁸.

Fleisch enthält hochwertige Proteine, Häm-Eisen und Zink sowie Nährstoffe wie z. B. der Vitamin B-Gruppe (v. a. Vitamin B12)¹⁵⁸. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass sowohl Grundbestandteile des Fleisches (gesättigte Fettsäuren, Cholesterin und Eisen) als auch zugesetzte Stoffe oder Substanzen, die bei der Konservierung oder Zubereitung von Fleisch entstehen (z. B. Salz, Nitrate/ Nitrite, Rauch, HAA), die Gesundheit des Menschen schädigen können¹⁵⁹. Für die beiden häufigsten chronischen Erkrankungen der westlichen Welt – chronische Herzerkrankungen und Krebserkrankungen verschiedener Herkunft – ist die Bedeutung einer fleischreichen Ernährung und ihre Auswirkung auf die genannten Erkrankungen seit langer Zeit Kernfrage zahlreicher Untersuchungen. Hierbei scheint v. a. die hohe Kalorienzufuhr einer fettreichen Ernährung und die gesättigten Fettsäuren aus dem Fleisch die Plasma-

Cholesterinkonzentration zu beeinflussen, genau wie andere Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankungen (Übergewicht, Bluthochdruck)¹⁶⁰. Hypothesen zur Rolle eines erhöhten Fleischkonsums auf das Risiko für Krebserkrankungen gehen hauptsächlich von der Bildung karzinogener Stoffe während der Zubereitung und Kochen wie HAA, PAH und N-Nitroso-Verbindungen aus^{159 161}. Dabei scheinen vor allem Tumoren des Kolon, Rektum, Prostata, Pankreas, der Brust, und Niere mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einherzugehen^{162 163}. Zumindest scheint für kolorektale Tumoren und wahrscheinlich auch für Brustkrebs die Assoziation mit myoglobinreichem und weiterverarbeitetem Fleisch (hauptsächlich Wurstwaren, Schinken, Speck) konsistenter als die mit der Gesamtaufnahme von Fleisch zu sein^{161 164 165 166}.

Das britische ‚Chief Medical Officer’s Committee on Medical Aspects of food‘¹⁶⁷ und der ‚World Cancer Research Fund‘¹⁶⁸ fassten die damalige epidemiologische Datenlage zu Fleisch und kolorektaler Tumorerkrankung zusammen. Sie folgerten, dass ein erhöhtes kolorektales Krebsrisiko von einer fleischreichen Ernährung ausgeht und sich die Datenlage moderat konsistent zeigt. Auch die WHO¹⁶⁹ kam etwas später zur selben Schlussfolgerung, jedoch räumte sie ein, dass sich die epidemiologischen Studien in dieser Frage nicht einheitlich zeigen. Im Gegensatz hierzu folgerten andere Untersuchungen, dass weiterhin ein nicht sicherer Zusammenhang besteht¹⁷⁰ und konstatierten sogar einen negativen Zusammenhang¹⁷¹. Im weiteren wurde auch vermutet, dass die Zusammenhänge zwischen einer vermehrten Fleischaufnahme und kolorektalen Krebserkrankungen auf einen gleichzeitigen Mangel an alimentären protektiven Faktoren, wie zum Beispiel Gemüse und Früchten, zurückzuführen ist¹⁷². Dennoch haben neuere Studien wiederholt einen positiven Zusammenhang zwischen einem erhöhten Fleischverzehr und kolorektalem Krebsrisiko aufgezeigt¹⁷³. Auch im Rahmen der EPIC-Studie wurden diese Zusammenhänge untersucht und aktuelle Ergebnisse konnten einen positiven Effekt einer hohen Aufnahme weiterverarbeitetem Fleisch auf das kolorektale Krebsrisiko bestätigen¹⁷⁴.

In der vorliegenden Untersuchung konnten statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen einer fleischreichen Ernährung und einer Addukt-Bildung im humanen Brustgewebe nachgewiesen werden. Diese wurden für eine Ernährung mit Rindfleisch ($P=0,03$) und weiterverarbeiteten Fleischprodukten ($P=0,03$) ermittelt. Diese Ergebnisse gehen damit mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Studien konform. Weiterhin zeigt sich, dass die Aufnahme von MeIQx ($P=0,01$) und PhiP ($P<0,01$) aus weiterverarbeiteten Fleischprodukten mit einer erhöhten DNA-Schädigung in Form von kovalenten Veränderungen einhergeht. Daraus lässt sich folgern, dass die HAA-Aufnahme aus weiterverarbeiteten Fleischprodukten mit einem erhöhten mutagenen und damit wahrscheinlich auch mit einem erhöhten karzinogenen Risiko einhergeht.

Die zur der Lebensmittelgruppe der weiterverarbeiteten Fleischprodukte zählenden geräucherten, gesalzenen und gepökelten Produkte sind aber vor allem mit der Bildung von Nitrosaminen und weniger mit einer erhöhten PAK- oder HAA-Bildung assoziiert.

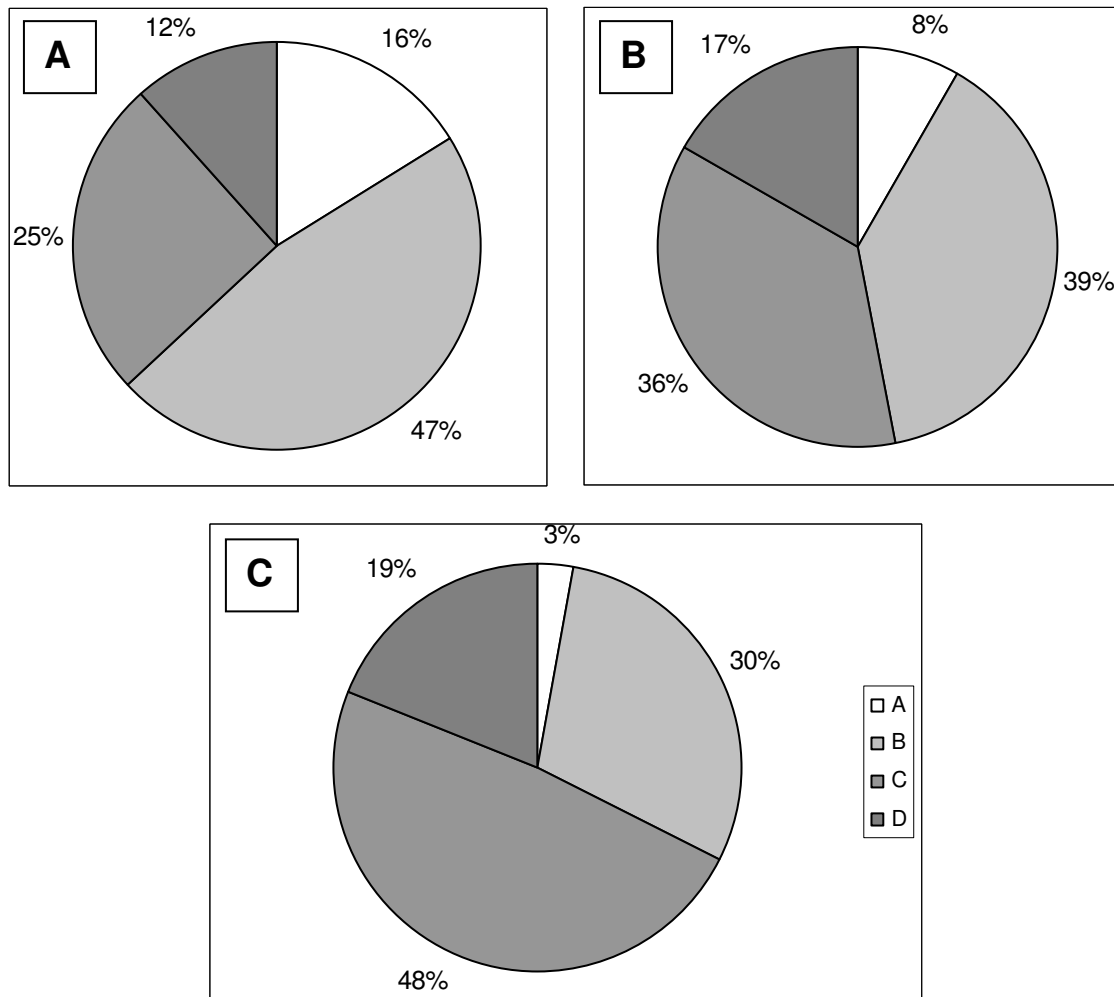
In Studien, die sich mit dieser Thematik beschäftigen, ist die Bezeichnung 'Fleisch' häufig nicht ausreichend und gleich definiert¹⁶³. Während einige Studien Geflügel und Fisch in ihre Definition von Fleisch einbeziehen, unterscheiden andere zwischen rotem, myoglobinreichem und weißem, myoglobinararmen sowie weiterverarbeitetem Fleisch und Fisch. Im allgemeinen wird Rind, Lamm und Schwein zu rotem Fleisch gezählt. Weiterverarbeitetes Fleisch beinhaltet die Lebensmittel Wurst, Hack, geräuchertem, gepökeltem, gesalzenem und Konserven-Fleisch¹⁶³. Die Kategorisierung von Kalbsfleisch ist abhängig vom Schlachtag und dem verfüttertem Futter.

Auffallend ist, dass die HAA-Gesamtaufnahme über weiterverarbeitete Fleischprodukte (7,18ng/d) die geringste der hier untersuchten Fleischlebensmittel darstellt und statistisch positiv mit den DNA-Addukten assoziiert ist, während die HAA-Aufnahmemengen von Fisch (94,46ng/d) und Huhn (50,36ng/d), die den größten Betrag zur HAA-Gesamtaufnahme beitragen, nicht mit signifikanten Korrelationen einhergehen. Gleichzeitig zeigt sich die tägliche Verzehrsmenge für weiterverarbeitete Fleischprodukte (88,76 g/d) am größten und für Huhn (5,31g/d) sowie Fisch (16,4g/d) am geringsten.

Hier spiegelt sich unter anderem die hier zugrundeliegende Berechnung zum HAA-Gehalt der einzelnen Fleischsorten wieder, bei der, neben dem Einfluss der Verzehrsmenge, die bei der Zubereitung von Fleisch bevorzugten Bräunungsgrade und verwendeten Zubereitungsarten berücksichtigt werden. Aus Abbildung 24 wird die Verteilung des Bräunungsgrades für die drei genannten Fleischsorten über die relativen Häufigkeiten der zu diesem Fragekomplex abgegebenen Antworten veranschaulicht. Es zeigt sich für die verwendeten Bräunungsgrade der Gruppe der verarbeiteten Fleischprodukte, dass B (~47%) den häufigsten verwendeten Grad darstellt. Die Grade A (~16%) und C (~25%) im mittleren Feld liegen und der hohe Bräunungsgrad D nur zu ~11,5 % bei der Zubereitung von weiterverarbeitetem Fleisch verwendet wird. Im Vergleich hierzu zeigt sich für das Lebensmittel Fisch, dass die hohen Gargrade D mit ~19% und C mit ~49%, und die niedrigen Bräunungsgrade A nur noch mit ~2,7% und B mit ~30% Verwendung finden. Für das Lebensmittel Huhn stellen die Grade B (~38%) und C (~36%) die häufigsten Gargrade dar. A mit ~8% und D mit ~17% sind in etwa wie bei den weiterverarbeiteten Fleischprodukten verteilt.

Warum aber nur die alimentäre HAA-Aufnahme über weiterverarbeitete Fleischprodukte mit einer positiven Signifikanz einhergeht, bleibt ungeklärt.

Abbildung 24 Häufigkeitsverteilung der verwendeten Bräunungsgrade der Lebensmittel A: weiterverarbeitete Fleischprodukte, B: Geflügel, C: Fisch



Für die HAA-Aufnahme aus Rindfleischprodukten konnte der zuvor beschriebene Zusammenhang zwischen Rindfleischverzehrsmenge und den mittels Postlabeling-Methode ermittelten HAA-Addukten nicht bestätigt werden, verfehlte aber nur knapp die Signifikanz. Gleichzeitig konnte für die alimentäre HAA-Aufnahme aus Schweinefleisch ein signifikanter Zusammenhang mit den gemessenen Addukt-Levels aufgezeigt werden. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss initiiender Prozesse in der Genese von Krebserkrankungen durch eine vermehrte alimentäre Fleischaufnahme. Offen bleibt, warum v. a. die HAA-Aufnahme über verarbeitete Fleischprodukte mit einer erhöhten Addukt-Bildung einhergehen, während sich die Ergebnisse zu Rind- und Schweinefleisch sowie Addukt-Bildung inkonsistent zeigen.

Fisch ist reichhaltig an zahlreichen verschiedenen Nährstoffen, wie Proteinen, Retinol, Vitamin D und Vitamin E sowie Jod, Selen und essentiellen langkettigen Omega-3-Fettsäure, wie α -Linolensäure, Eikosapentaensäure und andere.

Fisch stellt die Hauptquelle der genannten Fettsäuren dar, obwohl diese auch durch metabolische Konversion der α -Linolsäure aus Speiseölen wie Raps, Soya, Leinsamen und Walnuss bezogen werden können¹⁷⁵.

Mittels ökologischer Fall-Kontroll- und prospektiven Studien konnten Hinweise für die protektive Wirkung von Fischverzehr auf Prostata-, Brust- und Kolon-Tumoren sowie anderen Teilen des Magen-Darm-Traktes^{176 177 178 179 180} aufgezeigt werden. Auch die Beweislage eines protektiven Effekts auf kardiovaskuläre Erkrankungen bei erhöhtem Fischkonsum zeigt sich konsistent^{181 182 183 184 185 186 187}, obwohl dieser Zusammenhang sich auf Hochrisiko-Populationen beschränkt.

In der vorliegenden Studie konnten jedoch keine signifikanten Effekte einer alimentären Fischeaufnahme selbst und für die einzelnen Nährstoffe im Fisch, auf die in den folgenden Kapiteln eingegangen wird, beschrieben werden.

Sämtliche Ergebnisse zur alimentären HAA-Aufnahme, der verschiedenen Fleischsorten und Addukte sind in der folgenden Übersicht nochmals zusammengefasst.

Tabelle 32 Ergebnisse der statistischen Berechnungen zu Fleischart, alimentäre HAA-Aufnahme und HAA-Aufnahme der verschiedenen Fleischsorten in Abhängigkeit der ermittelten HAA-Addukt-Level.

			Addukte	
			Correlation Coefficient	Sig. (2-tailed)
HAA-Aufnahme nach einzelnen Fleischsorten aufgeschlüsselt	Rind	MelQx	0,3	0,05
		DiMelQx	0,22	0,16
		PhiP	0,27	0,08
		HAA gesamt	0,28	0,07
	Schwein	MelQx	0,31(*)	0,04
		DiMelQx	-0,04	0,77
		PhiP	0,35(*)	0,02
		HAA gesamt	0,31(*)	0,04
	Fleischprodukte	MelQx	0,39(**)	0,01
		DiMelQx	0,29	0,06
		PhiP	0,42(**)	0,00
		HAA gesamt	0,41(**)	0,01
	Huhn	MelQx	-0,03	0,82
		DiMelQx	-0,01	0,96
		PhiP	0,08	0,62
		HAA gesamt	0,07	0,65
	Fisch	MelQx	-0,11	0,46
		PhiP	-0,05	0,73
		HAA gesamt	-0,06	0,71
HAA	MelQx		0,22	0,14
	DiMelQx		0,16	0,28
	PhiP		0,19	0,22
	HAA gesamt		0,2	0,2
Fleischsorte	Rind		0,329(*)	0,031
	Schwein		0,185	0,234
	Fleischprodukte		0,325(*)	0,034
	Huhn		0,03	0,85
	Fisch		-0,069	0,659
	Fleisch und Fleischprodukte, gesamt		0,297	0,054
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).				
**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).				

In Bezug auf Brustkreberkrankungen konnten aktuelle epidemiologische Studien einen positiven Zusammenhang mit einer fleischreichen Ernährung nicht bestätigen^{188 189}. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Untersuchung besteht jedoch in dieser Frage weiterhin Klärungsbedarf und kann nicht mit letzter Sicherheit beantwortet werden. Der Einfluß einer fleischreichen Lebensweise und einer Ernährung reich an weiterverarbeiteten Fleischprodukten und deren Bedeutung auf Krebserkrankungen des Kolorektums und anderen Organen des Verdauungstraktes sowie Brustkrebs zeigt sich weiterhin ungeklärt.

5.4 Fett, Fettsäuren und Addukte

Der Frage nach der Bedeutung einer Ernährung mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren (Kap. 1.5.4) sowie einem möglicherweise bestehenden protektiven Effekt, der für Omega-3-Fettsäuren vermutet wird, sind zahlreiche ökologische und epidemiologische Studien nachgegangen. Unter anderem wird davon ausgegangen, dass Abbauprodukte die DNA kovalent modifizieren können. Doch die genaueren zugrunde liegenden Mechanismen bleiben letztendlich unklar.

Bereits während des oxidativen Abbaus von Lipiden in Lebensmitteln entstehen Produkte, die einerseits unerwünschte Aromen hervorrufen und andererseits ein toxisches Potential besitzen. So nimmt die Haltbarkeit solcher Lebensmittel mit der Zunahme an ungesättigten FS ab und wird gegenüber oxidativen Abbauprozessen instabiler¹⁹⁰. Dieses steht jedoch in gewissem Widerspruch mit den epidemiologischen Ergebnissen, die für eine fettsäurenreiche Ernährung mit einem Verhältnis zugunsten von ungesättigten Fettsäuren gesundheitsfördernde Effekte ermitteln konnten. Auch die protektiven Ergebnisse einer Ernährung mit Omega-3-Fettsäuren (drei Doppelbindungen) gegenüber Omega-6-Fettsäuren (eine bis zwei Doppelbindungen) zeigen sich hierzu nicht konsistent. Die für Omega-3-Fettsäuren beschriebenen Effekte werden dabei mit einer inhibierenden Wirkung auf Promotion und Progression in Zusammenhang gebracht.

Mehrfach ungesättigte Lipide unterliegen in Gegenwart von Luftsauerstoff einer Oxidation, die zu Bildung von Hydroperoxiden und deren Abbauprodukten führt und gelten als Verursacher vieler chronischer Erkrankungen¹⁹¹. Im Organismus initiieren Hydroperoxide radikalische Mechanismen, die im weiteren Oxidationsprodukte hervorrufen. Bei oraler Aufnahme werden Hydroperoxide im Magen zu Hydroxyverbindungen, Aldehyden und Epoxyverbindungen abgebaut. Aus den Hydroxyverbindungen werden wiederum Aldehyde freigesetzt, die im Intestinum resorbiert werden. Aldehyde, die bereits im Magen vorliegen, können auch dort aufgenommen werden¹⁹². Unter den Aldehyden zeigen α,β -ungesättigte Aldehyde und α,β -ungesättigte Hydroxyaldehyde hohe Reaktivitäten gegenüber biologischen Komponenten. Aldehyde können aber bereits während der Lipidperoxidation (LPO) in Lebensmitteln als sekundäre Produkte entstehen. Bei oraler Aufnahme können Aldehyde in das Magengewebe eindringen und mit Aminosäuren und DNA Addukte bilden. Neben der Resorption im intestinalen Bereich bei Freisetzung aus Hydroxyverbindungen der Lipidoxidation wird von einer endogenen Bildung von Aldehyden durch Lipidoxidation im Organismus ausgegangen.

Die Lipidperoxidation von Omega-6-Fettsäuren führt zur Bildung von reaktiven α,β -ungesättigten Aldehyden wie z. B. trans-4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE) oder Malondialdehyde, welche promutagene exozyklische DNA-Addukte in humanen Zellen bilden^{193 194}. HNE, eins der Hauptprodukte der LPO, entsteht durch die Oxidation von

Linolsäure oder Arachnoidonsäure und wird durch Fettsäure-Peroxidasen zu 2,3-Epoxy-4-Hydroxynonanal oxidiert. Dieses bifunktionale alkylierende Agens kann dann mit der DNA reagieren und zu Etheno- und anderen basischen Addukten führen. Etheno-Addukte sind fehlerkodierende Läsionen in Brustgewebszellen von denen derzeit angenommen wird, dass sie karzinogene Prozesse durch spezifische Punktmutationen initiieren^{195 196}.

In einer kontrollierten Ernährungsstudie¹⁹⁷, bei der die DNA weißer Blutzellen (WBC) untersucht wurde, wurde bei alimentärer Aufnahme der Omega-6-Fettsäuren Linolsäure (zwei Doppelbindungen) aus Sonnenblumenöl und nicht bei Verzehr von Ölsäure (eine Doppelbindung) aus Rapsöl eine Erhöhung der Frequenz von Etheno-DNA-Addukten in den WBC 40 untersuchter Frauen - und nicht bei Männern - beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen allerdings auf, dass nur eine linolsäurereiche Ernährung zu einer erhöhten DNA-Addukt-Bildung führt.

In diesem Kontext wurden in dieser Studie die ermittelten täglichen Lipid- bzw. Fettaufnahmen über tierische und pflanzliche Fette sowie deren Aufschlüsselung in Cholesterin, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren im Zusammenhang mit einer erhöhten DNA-Adduktbildung betrachtet (siehe Kapitel 4.5.8). Auch eine weitere Betrachtung der mehrfach ungesättigten Omega-FS unter dem Aspekt einer möglichen Beeinflussung der in der humanen weiblichen Brust zu messenden Addukt-Level konnte weder positive noch negative Effekte aufzeigen.

Tabelle 33 Durchschnittliche alimentäre Aufnahme [gr/d] und zugehörige Verteilungsmaße der Omega-Fettsäuren.

	Mean	Std. Error of Mean	Std. Deviation
Ölsäure	28,37	4,24	27,82
Linolsäure	12,34	1,51	9,88
α -Linolensäure	1,57	0,16	1,05
Eicosapentaensäure	0,09	0,02	0,13
Docosahexansäure	0,18	0,03	0,17

Tabelle 34 Korrelationsergebnisse zu den Omega-Fettsäuren und den Addukt-Leveln.

		Addukte
Ölsäure	Correlation Coefficient	0,26
	Sig. (2-tailed)	0,10
Linolsäure	Correlation Coefficient	0,21
	Sig. (2-tailed)	0,19
α -Linolensäure	Correlation Coefficient	0,20
	Sig. (2-tailed)	0,21
Eicosapentaensäure	Correlation Coefficient	0,01
	Sig. (2-tailed)	0,95
Docosahexansäure	Correlation Coefficient	0,07
	Sig. (2-tailed)	0,67

In Zusammenschau der Einflüsse einer fett- und fleischreichen Ernährung wurden der BMI und molekulare DNA-Veränderungen betrachtet. Der BMI ist Ausdruck des Gleichgewichtes der Energieaufnahme und Energieverbrauch, kann aber per se nicht mit der Ernährung gleichgesetzt werden.

Für den BMI und die von uns ermittelten Addukte konnte ein signifikanter Zusammenhang berechnet werden. Mit den Korrelationsberechnungen zur täglichen Energieaufnahme und Addukten ($P = <0,05$) und auch für Energieaufnahme und BMI ($P < 0,05$) konnten entsprechende und in diesem Zusammenhang konsistente Ergebnisse berechnet werden, die die Energieaufnahme als einen wichtigen Einflussfaktor des BMI identifizieren und dessen Bedeutung auf die Addukt-Bildung aufzeigen.

Tabelle 35 Korrelationsberechnungen zur Fleisch- und Fettaufnahme sowie zur täglichen Energieaufnahme und BMI.

		tägliche Energie - aufnahme	BMI
gesamt Fleischaufnahme	Correlation Coefficient	0,44 **	0,03
	Sig. (2-tailed)	0,00	0,85
Rindfleisch	Correlation Coefficient	0,09	0,09
	Sig. (2-tailed)	0,54	0,54
Schweinefleisch	Correlation Coefficient	0,24	-0,20
	Sig. (2-tailed)	0,09	0,17
Hühnchen	Correlation Coefficient	0,21	-0,06
	Sig. (2-tailed)	0,13	0,68
weiterverarbeitetes Fleisch	Correlation Coefficient	0,46 **	0,06
	Sig. (2-tailed)	0,00	0,66
gesamt Fettaufnahme	Correlation Coefficient	0,52 **	0,10
	Sig. (2-tailed)	0,00	0,49
planzliche Öle	Correlation Coefficient	0,41 **	-0,09
	Sig. (2-tailed)	0,00	0,55
Butter	Correlation Coefficient	0,29 *	-0,23
	Sig. (2-tailed)	0,03	0,11
Margarine	Correlation Coefficient	0,34 *	0,07
	Sig. (2-tailed)	0,01	0,64
Frittierfett	Correlation Coefficient	0,23	0,06
	Sig. (2-tailed)	0,09	0,69
Lipid	Correlation Coefficient	0,85 **	0,23
	Sig. (2-tailed)	0,00	0,10
Cholesterol	Correlation Coefficient	0,67 **	0,13
	Sig. (2-tailed)	0,00	0,36
gesättigte Fettsäuren	Correlation Coefficient	0,77 **	0,18
	Sig. (2-tailed)	0,00	0,19
einfach gesättigte FS	Correlation Coefficient	0,85 **	0,22
	Sig. (2-tailed)	0,00	0,12
mehrfach gesättigte FS	Correlation Coefficient	0,72 **	0,14
	Sig. (2-tailed)	0,00	0,33
**	Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).		
*	Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).		

Auch die genauere Betrachtung von Energieaufnahme und BMI, welche vor allem durch eine erhöhte Fett- und Fleischaufnahme beeinflusst werden, wurde mittels Korrelationsberechnungen durchgeführt. Hierbei wird ersichtlich, dass vor allem die fettreiche Ernährung mit einer signifikant erhöhten Energieaufnahme einhergeht. Beim Lebensmittel Fleisch war lediglich die Aufnahme von weiterverarbeitetem Fleisch mit deutlichen Einflüssen auf die Energieaufnahme zu identifizieren. Auffällig zeigte sich, dass die direkten Korrelationen des BMI und den einzelnen Fleischlebensmitteln keine statistisch signifikanten Ergebnisse erbrachten.

5.5 Alkohol und Addukte

Die Inkonsistenz der Studien-Resultate, die die Zusammenhänge einer fett- und fleischreichen Ernährung und dem Krebsrisiko der Brust (s. Kapitel 1.5.4) und anderer Organe untersuchten, veranschaulichen die Schwierigkeit der Verwendung von "einfachen" Lebensmittelfragebögen zur Klärung komplexer Ernährungs-, hormonaler und metabolischer Mechanismen.

Dieses gilt allerdings nicht für alle auf einen Fragebogen basierenden epidemiologischen Studien. Tatsächlich konnte anhand der Daten solcher Erhebungsmittel die Assoziation zwischen Alkohol und Krebs ohne vorherigen Nachweis positiver Karzinogenitätsstudien in Tiermodellen identifiziert werden.

Die biologischen Mechanismen für dieses erhöhte Krebsrisiko bei übermäßigem Alkoholkonsum sind aber bislang nur zum Teil charakterisiert und verstanden. Obwohl Ethanol selbst nicht karzinogen ist, wird unter anderem vermutet, dass Alkohol eine durch Karzinogene induzierte Tumorgenese über eine Beeinflussung einzelner Schritte der Tumor-Initiation und -Promotion^{198 199}, verstärkt. Diese Mechanismen könnten über eine Modulation der Steroidhormon-Spiegel, durch eine Stimulation des oxidativen Stress' oder durch die Modifizierung des Entwicklungs- und Proliferationsindex z. B. der Brustdrüse und anderer Tumoren wirken^{200 201 202 203 204}.

Ein anderer möglicher Mechanismus könnte über eine verstärkende Wirkung des Ethanols auf die durch Karzinogene induzierten Schäden an der Zielzell-DNA wirken. In diesem Zusammenhang wurde von DNA-Schäden in humanem Brustgewebe berichtet^{4 205}, die durch karzinogene Umweltschadstoffe wie dem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren (B[a]P) induziert werden. Obwohl eine Ethanol-Exposition die metabolische Aktivierung von Prokarzinogenen wahrscheinlich erhöht^{206 207 208}, und damit auch die Wahrscheinlichkeit kovalenter DNA-Schäden in verschiedenen Geweben, konnte dieser Effekt in humanen Brustzellen bislang nicht nachgewiesen werden.

Unter der Annahme, dass ein übermäßiger Alkoholkonsum vermehrt mit DNA-Läsionen einhergeht, wurden beide Parameter miteinander korreliert. Diese Berechnungen ergaben allerdings keinen statistisch signifikanten Zusammenhang und können somit nicht mit den karzinogenen PAK in Zusammenhang gebracht werden. Weder für einzelne alkoholische Getränke noch für die reine Ethanolaufnahme konnten entsprechende Ergebnisse erbracht werden.

5.6 Antimutogene und Addukte

In den letzten 30 Jahren wurden zahlreiche Berichte, die sich mit protektiven Effekten von bestimmten Komponenten auf die Mutagenität und Kanzerogenität von HAA und anderen Karzinogenen befassten, veröffentlicht. Basierend auf diesen Daten können verschiedene Mechanismen, die möglicherweise mit einem protektiven Effekt auf die HAA-Bildung einhergehen, beschrieben werden²⁰⁹. Verschiedene Mechanismen wurden diskutiert wie die Inaktivierung von HAA und deren Metaboliten durch direkte Bindung, durch die Inhibition von in die metabolische Aktivierung von Aminen involvierter Enzyme, durch die Induktion detoxifizierender Enzyme oder durch Interaktion mit DNA Reparaturprozessen. Doch nur für einige Komponenten (Porphyrine/ Blattgrün, Ballast-/ Faserstoffe, Tee-Inhaltsstoffe und Milchsäurebakterien) liegen ausreichende Nachweise einer protektiven Wirkung im Menschen vor.

Hayatsu et al.²¹⁰ wiesen nach, dass HAA und PAK durch Tetrapyrrolverbindungen (Chlorophylle) inaktiviert werden und zu einer Reduktion der Genotoxizität dieser Substanzen führen. Auch in Tierversuchen konnte eine Reduzierung der kanzerogenen Effekte dieser Nahrungsmutagene gezeigt werden. Und für Ballaststoffe ließ sich eine direkte inaktivierende Wirkung auf die HAA-Bildung nachweisen.

Zahlreiche Studien belegen eine protektive Wirkung eines vermehrten Gemüse- und Obstverzehr auf die Gesundheit des Menschen. In einer großen Vegetarierstudie¹¹ wurde die Krebsmortalität der Gesamtbevölkerung mit der von Vegetariern verglichen und eine Reduzierung maligner Neubildungen bei vegetarischer Lebensweise um 59% nachgewiesen. Hierbei wurde vor allem ein Schutzeffekt für die Verdauungsorgane festgestellt. In weiteren epidemiologischen Studien konnte auch ein protektiver Effekt auf Brustkrebserkrankungen aufgezeigt werden¹⁰⁵.

Trotz intensiver Bemühungen besteht weiterhin ein erheblicher Forschungsbedarf, vor allem im Hinblick auf Humanstudien, zur Klärung des Ausmaßes des protektiven Effektes bestimmter Nahrungsmittel auf das Entstehungsrisiko von Krebserkrankungen.

In Deutschland werden von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung Empfehlungen für die Aufnahme von Energie und essentiellen Nährstoffen herausgegeben (Tabelle 36). Ermittelt werden diese Werte aus laborexperimentellen-biochemischen bzw. klinischen oder empirischen Daten. Sie stellen Durchschnittswerte dar, auf deren Grundlage Nährstoffempfehlungen ausgesprochen werden.

Tabelle 36 Referenzwerte für die tägliche Nährstoffzufuhr, bezogen auf eine erwachsene Frau (25-50 Jahre) mit Normalgewicht sowie einer tägliche Kalorienzufuhr von 1900 kcal (aus: Pschyrembel 260. Auflage).

Nährstoff	Aufnahmemenge für Frauen	Einheit
Vitamin C	100	mg
Vitamin E	12	mg-Äquivalent [12mg (Frau) bis 14mg (Mann) (R,R,R)- α -Tocopheroläquivalent/ Tag; 1mg (R,R,R)- α -Tocopheroläquivalent $\equiv$ 1mg (R,R,R)- α -Tocopherol 1,49I.E.]
Vitamin A	0,8	mg-Äquivalent [0,8mg (Frau) Retinoläquivalente(RE)/ die; 1mg RE $\equiv$ 1mg (od. 3300 I.E.) Retinol, 6mg all-trans- β -Carotin od. 12mg Provitamin-A-Carotinoide]
Biotin	60	μ g
Folsäure	400	μ g-Äquivalent [ca. 150 μ g freie F./Tag (Pteroylmonoglutamat) bzw. Folatäquivalente, die mit 400 μ g Nahrungsfolat erreicht werden können (Folatäquivalent = Monoglutamat + 0,2xPolyglutamat)]
Vitamin B2	1,2	mg
Vitamin B1	1,0	mg
Vitamin B12	3,0	μ g
Vitamin B6	1,2	mg
Vitamin D	5	μ g

Es zeigt sich, dass im Vergleich zu den empfohlenen Nährstoffwerten das hier untersuchte Patientinnengut bereits mit etwa 1000 kcal die empfohlenen Nährwerte aufnimmt und von einem Vitaminmangel nicht auszugehen ist.

Im Weiteren zeigt sich, dass im Rahmen dieser Studie weder ein vermehrter Verzehr von Obst und Gemüse, und damit auch nicht für Chlorophylle, noch die Aufnahme von Tee oder Joghurt (Milchsäurebakterien), für die ein protektiver Mechanismus gegenüber einer Addukt-Bildung beschrieben wurde, ein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden konnte. Auffällig ist allerdings, dass für einen Teil dieser Antimutagene negative Korrelationskoeffizienten bestimmt werden konnten und als Tendenz eines gegensinnigen Effektes interpretiert werden können. Aufgrund des geringen Stichprobenumfanges könnten die hier vermuteten Zusammenhänge bzw. protektiven Effekte auf die Addukt-Bildung nicht vollständig zum Tragen kommen und sich statistisch nicht erfassen lassen. Im Rahmen dieser Studie konnten aber für die einzelnen hier untersuchten Komponenten keine protektive Wirkung auf die Addukt-Bildung nachgewiesen werden.

Lediglich für Vitamin B1 konnten ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($P < 0,5$) nachgewiesen werden.

Vitamin B1 wird zu Thiamin-Pyrophosphat metabolisiert und ist Kofaktor einer Transketolase, welche in die Synthese von Ribose (Ribonukleinsäure) involviert ist und für die Zellproliferation benötigt wird. Ein Thiaminmangel kann gehäuft bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen beobachtet werden und daher wird oftmals eine Vitamin B1-Ernährungsergänzung zur unterstützenden Tumorthherapie verwendet. Dennoch konnten tierexperimentelle Untersuchungen²¹¹ aufzeigen, dass eine Thiamin Substitution bei fortgeschrittenen Tumoren über eine Aktivierung der Transketolase eine Beschleunigung des Wachstums bewirkt.

Inwieweit eine vermehrte alimentäre Thiamin Aufnahme eine Addukt-Bildung fördert bzw. beeinflusst, bleibt jedoch ungeklärt.

5.7 Mutagenität und Ames-Test

Die Arbeitsgruppe Martin¹¹⁶ konnte erstmals Substanzen aus humanen Brustfettgewebsextrakten, die Punktmutationen in Bakterienstämme in Anwesenheit von metabolischen Enzymsystemen induzieren, nachweisen. Dabei wurden in den Ames-Assays Bakterienstämme von *Salmonella typhimurium* TA98, TA1538 und TA100 sowie *Escherichia coli* WP2uvrA(pKM101) verwendet.

Von 40 untersuchten Lipidproben aus humanem Brustgewebe wiesen 16 (40%) mutagene Aktivität auf. 15 Proben waren positiv im *S. typhimurium* TA1538, 11 waren positiv im TA98-Stamm und 10 Proben waren in beiden Stämmen positiv. Mit den beiden anderen genannten Bakterienstämmen konnte keine Mutagenität nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurden zur Extraktion der Lipidproben aus dem Brustgewebe neben Extrelut- und C18-Kartuschen PRS-Kartuschen zur Isolierung der mutagenen Substanzen verwendet. Obwohl die dabei angewandte Extraktionsmethode zur Isolierung von HAA aus Fleischlebensmitteln entwickelt wurde²¹², blieb eine Charakterisierung der aus den Lipidextrakten extrahierten aktiven Substanzen mit z. B. der HPLC-Analyse aus.

Auch in der humanen Brustmilch von 50 Frauen 4-6 Wochen post partum konnte mittels Ames-Test und dem *Salmonella*-Bakterienstamm YG 1024 Mutagenität nachgewiesen werden. Dabei wurde die Festphasenextraktion mittels SPE- und C18-Kartuschen und die Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels DCM anhand einer Milchprobe verglichen. Da mit der DCM- aber nicht mit der SPE/ C18- Methode mutagene Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden sämtliche Brustmilchproben mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion isoliert und von 25 untersuchten Proben konnten für 22 (88%) der Nachweis von Mutagenität erbracht werden²¹³.

In einer zuvor in unserer Abteilung durchgeführten Untersuchung²¹⁴ wurden humane Brustmilchextrakte von sieben gesunden Müttern aus England untersucht. Diese Proben

wurden unter anderem mittels Ames-Test mit den *Salmonella typhimurium* – Stämmen TA1538 und YG1019 auf mutagene Aktivität kontrolliert. Vier der Proben wiesen dabei in beiden Bakterien-Stämmen eine signifikante mutagene Antwort auf. Die anderen drei Proben wiesen in beiden Stämmen keine Mutagenität auf. Die Extraktion der Milchproben erfolgte mit PRS- und C18-Kartuschen.

Im Gegensatz zu den genannten Ergebnissen ist es in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen in den Extrakten aus untersuchten Lipidproben der humanen Brust mutagene Aktivität mit dem Ames-Test nachzuweisen. Dieses konnte weder mit der Festphasen-Extraktion unter Verwendung von SPE- und C18-Kartuschen noch mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels saurer Hydrolyse und DCM als Lösungsmittel erreicht werden. Im Gegensatz zu den o. g. Studien verwendeten wir den modifizierten TA1538-Salmonella-Stamm YG1019. Zusätzlich zeigen sich die Ergebnisse der Festphasen-Extraktion auffällig, da weder in den untersuchten noch in den mitgeführten Positiv-Kontrollen - zufällig ausgewählte Lipidproben, die mit mutagenen Agenzien dotiert wurden - mutagene Aktivität nachgewiesen werden konnte. Auch die Ergebnisse der Flüssig-Flüssig-Extraktion sind nicht konsistent. Neben den negativen Mutagenitätsergebnissen der Lipidproben konnte nur für die Hälfte der mitgeführten Positivkontrollen die Mutagenität wieder nachgewiesen werden.

Schlusswort

Unter Verwendung von Anreicherungsverfahren für HAA konnten keine mutagenen Rückstände aus der Lipidfraktion der humanen Brust isoliert werden. Es gelang aber der Nachweis kovalenter Addukte in der DNA aus epithelialen Zellen, Organoiden aus dem Brustgewebe. Im qualitativen Vergleich mit Addukten von HAA zeigte sich, dass die Addukte in den humanen Brustgewebeproben nicht auf HAA zurückzuführen sind. Die Struktur dieser lipophilen Addukte bleibt zunächst ungeklärt.

Die mittels Fragebogen zu den Verzehrsgewohnheiten ermittelten Aufnahmemengen an HAA sind im internationalen Vergleich eher gering, entsprechen aber Ergebnissen früherer Untersuchungen in Deutschland. Insgesamt sprechen diese Daten eher für eine untergeordnete Bedeutung der HAA in der Entstehung des Brustkrebses in Deutschland.

Es wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen Ernährungsgewohnheiten und DNA Schädigungen in der weiblichen humanen Brustdrüse untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine Ernährung, die reich an scharf gebratenem Fleisch und Fleischprodukten ist, die Schädigung der DNA in der Brustdrüse fördert. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die These, dass das Risiko einer Brustkrebserkrankung durch derartige Ernährungsgewohnheiten erhöht werden kann.

6 Zusammenfassung

Die Ernährung hat vermutlich einen erheblichen Einfluss auf das individuelle Risiko einer Krebserkrankung. Dabei spielen unter anderem Substanzen eine Rolle, die bei der Zubereitung von Lebensmitteln entstehen. Zahlreiche Untersuchungen haben die Bedeutung der alimentären HAA-Aufnahme und ihrer Erfassung im Zusammenhang mit dem Risiko von Krebserkrankungen aufgezeigt. So konnte z. B. im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien aus den USA ein signifikanter Zusammenhang zwischen MeIQx und kolorektalen Adenomen und Lungenkrebs sowie zwischen PhIP und Brustkrebs ermittelt werden. Neben diesen Ernährungsrisikofaktoren sind mit Brustkrebs weitere zahlreiche Risikofaktoren assoziiert und dennoch ist die Ätiologie des humanen Mammakarzinoms bislang nicht genau verstanden.

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung und der Vergleich einer alimentären HAA-Aufnahme, molekulargenetischer Veränderungen im Epithelgewebe der Brustdrüse und Rückständen mit genotoxischer Aktivität im Fettgewebe der weiblichen Brust. Hierzu wurden 52 Gewebeproben von Patientinnen gesammelt, bei denen eine chirurgische Mammareduktion durchgeführt wurde. In den zellularen Bestandteilen wurden die DNA-Addukte als molekulargenetisches Korrelat einer Modifizierung der DNA, mittels der empfindlichen ^{32}P -Postlabeling-Methode detektiert und quantitativ bestimmt. Addukte können zu Mutationen und Veränderung der Gene führen und gelten als initiiierende Schritt der chemischen Kanzerogenese. Des Weiteren stellen Addukte einen wichtigen Marker für die tatsächlich an der DNA wirksame Dosis dar.

Für eine Abschätzung der alimentären HAA-Aufnahme der Patientinnen wurden mittels eines ausführlichen, bebilderten Fragebogens neben den Verzehrsmengen der einzelnen Fleischprodukte, deren Verzehrshäufigkeit sowie die dabei verwendeten Bräunungsgrade und Zubereitungsarten erfasst.

Es wurden Gewebeproben von Patientinnen im Alter von 15 bis 67 Jahren gesammelt. Mit dem Bakterienstamm *Salmonella typhimurium* YG 1019 im sogenannten Ames-Test wurde die mutagene Aktivität in Extrakten aus dem Brustfettgewebe untersucht. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen mit humanen Brustmilch-Extrakten britischer Patientinnen konnten wir hier keine mutagenen Rückstände in der Lipidfraktion der humanen Brust nachweisen.

Aus den Gewebeproben der weiblichen Brust wurden mittels selektiver Hydrolyse das Epithelgewebe (Organoide) angereichert und die DNA isoliert. Mittels ^{32}P -Postlabeling Analyse konnten Adduktlevel zwischen 0,04 und 66,40 Addukte/ 10^9 Nukleotide ermittelt werden. Im qualitativen Vergleich mit den DNA-Addukten der HAA zeigte sich, dass die

Addukte in den humane Brustgewebeproben nicht auf HAA zurückzuführen sind. Die Struktur dieser lipophilen Addukte bleibt zunächst ungeklärt.

Die im Patientinnenkollektiv ermittelten Verzehrsmengen für Fleisch und den daraus berechneten Aufnahmemengen an HAA waren ähnlich den Ergebnissen vorheriger Untersuchungen mit deutschen Probanden, sind im internationalen Vergleich aber eher gering. Die durchschnittliche tägliche Gesamtaufnahme wurde mit 193 ng HAA pro Person berechnet wobei der Anteil des PhIP bei 82,4% und MeIQx bei 15,0% lag. Je nach Ernährungsgewohnheiten sind diese Aufnahmemengen individuell höchst unterschiedlich.

In der vorliegenden Untersuchung konnten Zusammenhänge zwischen einer fleischreichen Ernährung und der DNA Adduktbildung im humanen Brustgewebe nachgewiesen werden. Diese waren allerdings nur für einen hohen Anteil von Rindfleisch ($P=0,03$) und weiterverarbeiteten Fleischprodukten ($P=0,03$) statistisch signifikant.

Weiterhin ergaben die Berechnungen, dass lediglich die Aufnahme von MeIQx ($P=0,01$) und PhIP ($P<0,01$) aus weiterverarbeiteten Fleischprodukten und Schweinefleisch mit einer erhöhten DNA-Schädigung in Form von kovalenten Addukten einhergeht. Dabei mögen die hier ermittelten Addukte ein Surrogat für unbekannte Substanzen sein, die bei der Erhitzung von Fleisch entstehen.

Insgesamt sprechen diese Daten eher für eine untergeordnete Bedeutung der HAA in der Entstehung des Brustkrebses. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen jedoch die These, dass eine Ernährung, die reich an scharf gebratenem Fleisch und vor allem an weiterverarbeiteten Fleischprodukten ist, die Schädigung der DNA in der Brustdrüse fördert und somit möglicherweise das Risiko einer Brustkrebserkrankung erhöht.

7 Abkürzungsverzeichnis

A α C	2-Amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indol
AAC	Aminoanthracen
BaP	Benzo(a)pyren
BMI	Body-Mass-Index
DCM	Dichlormethan
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum in Heidelberg
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (auch DNS)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPIC	European Prospective Investigation in Cancer and Nutrition
FBS	Fetal-bovine-Serum/ Fötales Kälberserum
FFQ	Food Frequency Questionnaire
HAA	heterozyklische aromatische Amine
IARC	International Agency for Cancer Research
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]chinolin
LPO	Lipidperoxidation
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>] chinolin
MeIQx	2-Amino-3-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>] chinolin
MeOH	Methanol
MN	Micrococcal Nuclease
NaCl	Natriumchlorid
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5- <i>b</i>]pyridin
RNA	Ribonukleinsäure (auch RNS)
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standard Error, Standardfehler
SPD	Phosphodiesterase
SSC	NaCl und Natriumcitrat in EDTA
TE-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid/ EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WHO	World Health Organisation

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geschichtliche Übersicht über die Aufdeckung von Krebsursachen	6
Tabelle 2: Übersicht über die Enzyme der Biotransformation	8
Tabelle 3: Übersicht über die Arten der DNA-Schädigung und die zugehörigen molekulargenetischen Veränderungen	9
Tabelle 4: Übersicht über die verschiedenen Formen der Mutation	9
Tabelle 5: Darstellung ausgewählter pflanzlicher Kanzerogene und der durch diese induzierten Tumoren.....	12
Tabelle 6 Übersicht, Klassifikation und Abkürzungen der heterozyklischen aromatischen Amine	19
Tabelle 7: Acrylamidgehalt ausgewählter Lebensmittel [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Lebensmittel]	22
Tabelle 8 Übersicht zur Herstellung von 10ml S9-Mix	38
Tabelle 9 AmesTest: Vorversuche mit Butter, dotierter Fettprobe und Fettextrakt.....	54
Tabelle 10 AmesTest: Vorversuche mit Olivenöl mittels NaOH- und HCl-Hydrolyse. 54	
Tabelle 11 Ergebnisse des Ames-Test unter Verwendung der Festphasen-Extraktion und von 10 μl des Fettextrakts.....	55
Tabelle 12 Ergebnisse des Ames-Test unter Verwendung der Festphasen-Extraktion und von 20 μl des Fettextrakts.....	56
Tabelle 13 Ergebnisse des Ames-Test unter Verwendung der HCl-DMSO-Extraktion und von 20 μl des Fettextrakts.....	57
Tabelle 14 Ergebnisse des Ames-Test unter Verwendung der HCl-DMSO-Extraktion und von 20 μl des Fettextrakts. Zweiter Durchgang mit Mamma-Fettextrakten der unteren Phase mit darin befindlichen Zellresten.	59
Tabelle 15 Mittels ^{32}P -Postlabeling Methode ermittelte Addukt-Level der einzelnen untersuchten Lipidproben	60
Tabelle 16: Übersicht über die täglichen Aufnahmemengen (g/d) und der zugehörigen Verteilungsmaße verschiedener Fleischprodukte.....	69
Tabelle 17 Darstellung der Spearman Korrelationsberechnungen für die Addukt-Level und die Verzehrsmengen der Fleischprodukte.	70
Tabelle 18 Übersicht der berechneten durchschnittlichen Gesamtaufnahme, Aufnahme einzelner HAA und den zugehörigen Verteilungsmaßen.	74
Tabelle 19 Spearman-Korrelationsberechnungen zu Addukten, HAA-Gesamtaufnahme und den HAA MeIQx, DiMeIQx und PhiP.	74
Tabelle 20 Übersicht der durchschnittlichen Aufnahmemengen der HAA und den zugehörigen Verteilungsmaßen in Abhängigkeit von den einzelnen Fleischprodukten.	76
Tabelle 21 Korrelationsberechnungen für die Addukte und den im einzelnen ermittelten HAA-Aufnahmemengen der verschiedenen Fleischprodukte.....	77
Tabelle 22 Tabellarische Übersicht über die durchschnittlichen Verzehrsmengen [g/d] und der Verteilungsmaße für die Lebensmittelgruppen ‚Gemüse und Obst‘.....	83
Tabelle 23 Ergebnisse der Spearman Korrelationsberechnungen für Addukt-Level und die Lebensmittelgruppe ‚Gemüse und Obst‘.....	84
Tabelle 24 Ermittelte durchschnittliche Aufnahmemengen (pro 1000kcal) und Verteilungsmaße der Vitamine und Ballaststoffe.....	85
Tabelle 25 Spearman Korrelationen für Vitamine, Ballaststoffe und DNA-Addukte. ..	85
Tabelle 26 Tägliche durchschnittliche Aufnahmemengen der Lebensmittel aus der Gruppe der Fette.	86

Tabelle 27 Übersicht über die Korrelationsberechnungen (Spearman) der Fette und Addukte.	87
Tabelle 28 Durchschnittlicher Konsum (g/d) von verschiedenen alkoholischen Getränken und Aufnahmemengen reinen Alkohols.	87
Tabelle 29 Spearman Korrelationsberechnungen zu Alkohol und Addukten.	88
Tabelle 30 Ergebnisse zur alimentären HAA-Aufnahme [ng/d] der EPIC-Studie (Heidelberg).	93
Tabelle 31 Ergebnisse zur alimentären HAA-Aufnahme [ng/d] der vorliegenden Untersuchung.	93
Tabelle 32 Ergebnisse der statistischen Berechnungen zu Fleischart, alimentäre HAA-Aufnahme und HAA-Aufnahme der verschiedenen Fleischsorten in Abhängigkeit der ermittelten HAA-Addukt-Level.	100
Tabelle 33 Durchschnittliche akimentäre Aufnahme [gr/d] und zugehörige Verteilungsmaße der Omega-Fettsäuren.	102
Tabelle 34 Korrelationsergebnisse zu den Omega-Fettsäuren und den Addukt-Levels.	102
Tabelle 35 Korrelationsberechnungen zur Fleisch- und Fettaufnahme sowie zur täglichen Energieaufnahme und BMI.	103
Tabelle 36 Referenzwerte für die tägliche Nährstoffzufuhr, bezogen auf eine erwachsene Frau (25-50 Jahre) mit Normalgewicht sowie einer tägliche Kalorienzufuhr von 1900 kcal (aus: Pschyrembel 260. Auflage).	106
Tabelle 37 Überblick über die mit dem Ernährungsfragebogen ermittelten Lebensmittelprodukte und zugehörige EPIC-Schlüsselnummern.	127
Tabelle 38 Absolute Zahlen der im einzelnen abgegebenen Antworten zur Verzehrshäufigkeit der Lebensmittelkategorie Fleisch.	115
Tabelle 39 Absolute Zahlen der im einzelnen abgegebenen Antworten zur Zubereitungsart der Fleischkategorie.	116
Tabelle 40 Absolute Zahlen der im einzelnen abgegebenen Antworten zum Bräunungsgrad der Lebensmittelkategorie Fleisch.	116

Tabelle 37 Überblick über die mit dem Ernährungsfragebogen ermittelten Lebensmittelprodukte und zugehörige EPIC-Schlüsselnummern.

01	Kartoffeln und andere Knollengewächse	09	Eier und Eiprodukte
01 01	Kartoffeln	09 01	Eier
02	Gemüse, gesamt	10	Fett, gesamt
02 01	Blattgemüse (außer Kohl) (Kopfsalat, Spinat, u. a.)	10 01	Pflanzliche Öle
02 02	Fruchtgemüse (Erbse, Bohne, Gurke, Tomate, u. a.)	10 02	Butter
02 03	Wurzelgemüse (Möhre, Sellerie, Radieschen, u. a.)	10 03	Margarine
02 04	Kohl Gemüse (Blumenkohl, Kopfkohl, Rosenkohl, u. a.)	10 04	Frittierfett (deep frying fat)
02 05	Pilze	10 06	Andere tierische Fette
02 06	Getreide und Hülsenfrüchte (reife Samen von Erbse, Bohnen, Linse, Sojabohnen)	11	Zucker und Süßigkeiten
02 07	Zwiebel und Knoblauch	11 01	Zucker, Honig, Marmelade
02 08	Stielgemüse (Spargel, Rhabarber) und Sprössling	11 02	Schokolade und andere Süßigkeiten aus Schokolade
02 09	Salat und Gemüse, gemischt	11 03	Süßigkeiten nicht aus Schokolade
03	Hülsengemüse	11 05	Eis-Creme und Wasser-Eis
04	Früchte, gesamt	11 05 01	Eis-Creme
04 01	Früchte	12	Kuchen
04 02	Nüsse und Samen	12 01	Kuchen, Torte, Konditorwaren
04 03	Früchte gemischt	12 02	Trockene Kuchen, Kekse
05	Milchprodukte	13	Nicht-alkoholische Getränke
05 01	Milch	13 00	Nicht klassifiziert
05 02	Milch-Getränke	13 01	Frucht- und Gemüsesäfte
05 03	Joghurt	13 02	Kohlensäurehaltige, Soft-, isotonische Getränke
05 04	Promage Blanc, Petits Suisses	13 03 01	Kaffee
05 05	Käse, Frischkäse	13 03 02	Tee
05 06	Sahnige Nachspeise, Pudding (auf Milchbasis)	13 03 03	Kräutertee
05 07	Sahnige Süßspeisen, milchig und nicht-milchig	13 03 04	Zichorie, Ersatzstoffe
05 08	Kaffeemilch, /-sahne	13 04	Wasser
06	Getreide und Getreideprodukte	14	Alkoholische Getränke, gesamt
06 01	Mehl, Flakes, stärkeiche Nahrungsmittel, Grieß	14 01	Wein
06 02	Nudeln, Reis	14 02	Angereicherte Weine (Cherry, Port, etc.)
06 03 01	Brot	14 03	Bier (Cider)
06 03 02	Knäckebrot,Zwieback	14 04	Spirituosen, Brandwein
07	Fleisch und Fleischprodukte, gesamt	14 06	Likör
07 01 00	Nicht klassifiziert	15	Gewürze und Soßen
07 01 01	Rindfleisch	15 01 00	Nicht klassifiziert und andere Soßen
07 01 02	Kalbfleisch	15 01 01	Tomatensoße
07 01 03	Schweinefleisch	15 01 02	Dressing-Soße
07 01 04	Hammel- und Lammfleisch	15 01 03	Mayonnaise und ähnliche
07 02 00	Nicht klassifiziertes und anderes Geflügel	15 03	Gewürz, Kräuter, Geschmacksstoffe
07 02 01	Hühnchen	15 04	Gewürze
07 02 05	Hase (domestiziert)	16	Suppen, Bouillon
07 04	Weiterverarbeitetes Fleisch: Wurst, Aufschnitt, etc.	16 01	Suppen
07 05	Fleischabfall, Innereien	16 02	Bouillon
08	Fisch und Schalentiere, gesamt	17 00	Verschiedenes, nicht klassifiziert
08 01	Fisch	17 02 01	Künstliche Süßstoffe
08 03	Fischprodukte		

Tabelle 38 Absolute Zahlen der im einzelnen abgegebenen Antworten zur Verzehrhäufigkeit der Lebensmittelkategorie Fleisch.

Lebensmittel: Fleisch / Fisch	Esse ich nicht	Verzehrhäufigkeiten								ohne Angabe	gesamt
		1x/Mo. oder weniger	2-3x/Mo.	1x/Wo.	2-3x/Wo.	4-6x/Wo.	1x/Tag	2x/Tag	3-4/Tag	5x/Tag oder häufiger	
Rindersteak, Filet, Lende	20	20	9	3							52
Rinderbraten, Kochfleisch	26	18	6	2							52
Rinderrouladen	12	38	2	0							52
Rindergulasch, Geschnetzeltes	12	28	10	1						1	52
Rindfleisch	70	104	27	6						1	
Schweineschnitzel, Kotelett, Steak, Filet, Lende	11	20	11	8	1					1	52
Schweinebraten	21	21	6	3	1						52
Schweinegulasch, Geschnetzeltes	18	20	12	1	1						52
Kassler, Schweinerippchen	17	26	7	1	1						52
Kochfleisch vom Schwein, Eisbein, Haxe	44	7	1								52
Schweinebauch	39	11	2								52
Schweinefleisch	150	105	39	13	4					1	
Frikadelle, Hamburger, Hackbraten	6	20	16	8						2	52
Hackfleischsauce, Haschee	13	16	17	4	1					1	52
Leber	38	13								1	52
Kalb-, Lammfleisch, Kaninchen	37	11	2	1						1	52
Brathähnchen	13	20	14	4						1	52
Putengeschnetzeltes, -schnitzel, Hühnerfrikasse, Ente, Gans, oder anderes Geflügel	3	12	17	12	5	1				2	52
Geflügel	16	32	31	16	5	1				3	
Bratwurst	16	19	14	3							52
Wienerle, Frankfurter, Bock-, Knackwurst, Fleischkäse	21	18	10	3							52
Wurstwaren	37	37	24	6						0	
Fisch(z.B.Filet natur oder paniert, Fischstäbchen,.....)	11	10	19	10	1					1	52

Tabelle 39 Absolute Zahlen der im einzelnen abgegebenen Antworten zur Zubereitungsart der Fleischkategorie.

Lebensmittel	Esse ich nicht	Kochen o. Erhitzen	Kurzbraten	Panieren und Braten	Braten oder Schmoren	Grillen	ohne Angabe
Rindersteak,-filet,-lende	19	0	25	0	9	9	1
Rindergulasch,-geschnetzeltes	12	6	4	0	33	0	0
Rindfleisch	31	6	29	0	42	9	1
Schweinesteak,-filet,-lende	18	0	25	0	9	8	2
Schweinschnitzel,-kotelett	9	0	20	15	13	9	0
Schweinegulasch,-geschnetzeltes	18	5	7	0	23	0	1
Schweinebauch, Speck	40	4	4	0	4	3	0
Schweinefleisch	85	9	56	15	49	20	3
Frikadellen, Hackbraten	6	1	17	0	30	0	2
Fleischkäse	36	1	11	0	0	3	2
Bratwurst	14	1	24	0	0	19	1
Würstchen (z.B. Wiener, Bockwurst,...)	13	35	1	0	0	7	0
Wurstwaren	27	36	25	0	0	26	1
Brathähnchen	6	0	2	0	20	33	0
Putenschnitzel, -brust	4	0	29	7	17	8	1
Putengeschnetzeltes, Hühnerfrikassee	4	34	17	0	0	0	2
Geflügel	14	34	48	7	37	41	3
Fisch	13	10	18	7	10	13	2
Zubereitungsarten, gesamt	170	95	176	29	138	109	10

Tabelle 40 Absolute Zahlen der im einzelnen abgegebenen Antworten zum Bräunungsgrad der Lebensmittelkategorie Fleisch.

Lebensmittel	Esse ich nicht	Bräunungsgrad				ohne Angabe	gesamt
		A	B	C	D		
Rindersteak,-filet,-lende	20	1	18	10	2	1	52
Rindergulasch,-geschnetzeltes	11	7	20	11	1	2	52
Rindfleisch	31	8	38	21	3	3	
Schweinesteak,-filet,-lende	18	1	13	15	3	2	52
Schweinschnitzel,-kotelett	10	2	18	20	1	1	52
Schweinegulasch,-geschnetzeltes	15	3	17	13	2	2	52
Schweinebauch, Speck	39	2	6	3	1	1	52
Schweinefleisch	82	8	54	51	7	6	
Frikadellen, Hackbraten	6	11	28	5		2	52
Fleischkäse	36		5	7	3	1	52
Bratwurst	13	6	20	12		1	52
Würstchen (z.B. Wiener, Bockwurst,...)	13	4	8	9	12	6	52
Wurstwaren	26	10	28	21	12	7	
Brathähnchen	5	8	25	14			52
Putenschnitzel, -brust	3	2	17	23	6	1	52
Putengeschnetzeltes, Hühnerfrikassee	3	2	13	15	18	1	52
Geflügel	11	12	55	52	24	2	
Fisch	13	1	11	18	7	2	52
Gesamt	163	39	186	163	53	20	

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung der Einteilung und Strukturformeln der heterozyklischen aromatischen Amine I.....	20
Abbildung 2 Darstellung der Einteilung und Strukturformeln der heterozyklischen aromatischen Amine II	21
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Ablaufes der multidirektionalen Anionenaustauscher-Dünnschichtchromatographie	43
Abbildung 4 Altersverteilung des untersuchten Patientengutes.	52
Abbildung 5 Lichtmikroskopische Aufnahmen der mittels Kollagenase-Digestion gewonnenen Zellorganoide (100x).....	53
Abbildung 6 Grafische Darstellung der ermittelten Addukt-Level	61
Abbildung 7 Darstellung der DNA-Spots nach Autoradiographie von fünf verschiedenen Gewebeproben. A= Positivkontrolle; B - F= ‚Spot-Wolken‘ der Gewebeproben (B: Probe21, C: 38, D: 24, E: 22, F: 23).....	61
Abbildung 8 Box-Plot-Darstellung der verschiedenen Addukt-Level für die Gruppe der Raucher, Ex-Raucher und Nicht-Raucher.	64
Abbildung 9 A: Box-Whisker-Plot zu den Addukt-Levels in Abhängigkeit von der Altersgruppe der 15-45 und der über 45 jährigen. B: Darstellung der zugehörigen Regressionsanalysen.	65
Abbildung 10 A: Verteilung der Addukt-Level in Abhängigkeit vom Body-Mass-Index. B - D: Darstellung der Regressionsanalysen zu Addukt-Level und BMI, Addukt-Level und tägliche Energieaufnahme sowie BMI und Energieaufnahme.	66
Abbildung 11 Grafische Darstellung der absoluten Zahlen der von den Patientinnen abgegebenen Antworten zur Frage der Verzehrshäufigkeiten für das Lebensmittel ‚Fleisch und Fisch‘.	68
Abbildung 12 Darstellung der absoluten Häufigkeiten der abgegebenen Antworten zur Zubereitungsform für das Lebensmittel Fleisch.	71
Abbildung 13 Relative Häufigkeiten der von den befragten Patienten verwendeten Zubereitungsformen unabhängig von den verschiedenen Fleischprodukten.	72
Abbildung 14 Relative Häufigkeitsverteilung für die von den Patientinnen verwendeten Bräunungsgrad A-D unabhängig von der Fleischart.	73
Abbildung 15 Übersicht über die absoluten Häufigkeiten der abgegebenen Antworten zum Bräunungsgrad in Abhängigkeit von der Fleischart.	73
Abbildung 16 Regressionsanalysen zu den Addukt-Levels und den einzelnen ermittelten HAA sowie der HAA-Gesamtaufnahme.....	75
Abbildung 17 Darstellung der durchschnittlichen Aufnahmemengen [g/d] in Abhängigkeit der einzelnen Fleischprodukte.	77
Abbildung 18 Regressionsanalysen zu Addukten und den berechneten HAA der Lebensmittelgruppe Rindfleisch. (Line Regression with 95,00% Mean Prediction Interval).	78
Abbildung 19 Regressionsanalysen zu Addukten und den berechneten HAA der Lebensmittelgruppe Schweinefleisch. (Line Regression with 95,00% Mean Prediction Interval).	79
Abbildung 20 Regressionsanalysen zu Addukten und den berechneten HAA der Lebensmittelgruppe weiterverarbeitete Fleischprodukte. (Line Regression with 95,00% Mean Prediction Interval).....	80
Abbildung 21 Regressionsanalysen zu Addukten und den berechneten HAA der Lebensmittelgruppe Hühnerfleisch. (Line Regression with 95,00% Mean Prediction Interval).	81

Abbildung 22 Regressionsanalysen zu Addukten und den berechneten HAA der Lebensmittelgruppe Fisch. (Line Regression with 95,00% Mean Prediction Interval).	82
Abbildung 23 Alimentäre HAA-Aufnahme in Prozent aufgeführt nach den einzelnen Fleischlebensmitteln.	95
Abbildung 24 Häufigkeitsverteilung der verwendeten Bräunungsgrade der Lebensmittel A: weiterverarbeitete Fleischprodukte, B: Geflügel, C: Fisch	98

9 Literaturverzeichnis

- ¹ Becker, N und Wahrendorf, J. (1998). Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990, 3.Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- ² Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst 1981; 66: 1191-308.
- ³ Sugimura T. Mutagens, carcinogens and tumor promoters in our daily food. Cancer 1982; 49: 1970-84.
- ⁴ Li D, Wang M, Dhingra K, Hittelman WN. Aromatic DNA adducts in adjacent tissues of breast cancer patients: clues to breast cancer etiology. Cancer Res 1996; 56: 287-93.
- ⁵ Marquardt H. Chemische Kanzerogenese. In: Marquardt H, Schäfer SG. Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1. Auflage. 124-37.
- ⁶ Schulte-Hermann R, Marian B, Busch W. Tumorpromotion. In: Marquardt H, Schäfer SG. Lehrbuch der Toxikologie. B1 Wissenschaftsverlag 1994. 148-77.
- ⁷ Fahrig R. Genotoxizität. In: Marquardt H, Schäfer SG. Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftsverlag. 106-109.
- ⁸ Mini Review. DNA adducts as markers of exposure to carcinogens and risk of cancer. Int J Cancer 2000; 88: 325-328.
- ⁹ Ames BN. Dietary pestizides (99,9% all natural). Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 7777-81.
- ¹⁰ Knasmüller S, Schwab C, Parzefall W. Kanzerogene und genotoxische Substanzen in Lebensmitteln und natürliche Protektionsmechanismen. J Ernährungsmed 2001; 3 (1): 5 -16.
- ¹¹ Chang-Claude J, Frentzel-Beyme R, Eilber U. Mortality pattern of German vegetarians after 11 years of follow-up. Epidemiology 1992; 3(5): 395-401.
- ¹² Watzl B, Leitzmann C. Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates Verlag, Stuttgart 1995.
- ¹³ Heinonen OP. The effect of vitamin E and β -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. N Engl J Med 1994; 330: 1029-35.
- ¹⁴ Kensler TW. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxification enzymes. Env Health Perspect 1997; 104: 965-70.
- ¹⁵ De Flora S, Ramel C. Mechanisms of inhibitions of mutagenesis and carcinogenesis: classification and overview. Metabol Res 1988; 202: 285-306.
- ¹⁶ Ozturk M, et al. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. Lancet 1991; 338: 1356-66.
- ¹⁷ Richter E. Azofarbstoffe. In: Marquardt H und Schäfer SG (Hrsg). Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftsverlag, Manheim, 1994; 492-504.
- ¹⁸ WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants 37th Report of the joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 1991; No. 806: 19-20.
- ¹⁹ Dees C. Erythrosine and breast cancer. Env Health Prespect 1997; 105: 625-31.
- ²⁰ IARC. Evaluation of carcinogenic risks to humans. Some food additives and naturally occurring substances. WHO, Lyon, 1983; Vol. 31: 47-52.
- ²¹ Harrison PT. Propionic acid and the phenomenon of rodent forestomach tumorigenesis: a review. Food Chem Toxicol 1992; 30: 333-40.
- ²² Verhagen H, Schildermann P, Leinjang JCS. Butylated hydroxyanisole in perspective. Mutat Res 1991; 80: 109-34.
- ²³ IARC. Evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. WHO, Lyon, 1986; Vol. 40: 123-61.
- ²⁴ Ellwein LB, Cohen SM. The health risks of saccharin revisited. Crit Rev Toxicol 1990; 20: 311-26.
- ²⁵ Lijinski W. Chemistry and biology of N-nitrosocompounds. University Press, Cambridge, 1992.
- ²⁶ Lijinski W. The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. Mutat Res 1991; 259: 251-61.
- ²⁷ Kataoka H, Kijima K, Maruo G. Determination of mutagenic heterocyclic amines in combustion smoke samples. Bull Environ Contam Toxicol 1998; 50: 60-67.
- ²⁸ Kataoka H, Hayatsu T, Hietsch G, Steinkellner H, Nishioka, S, Narimatsu S, Knasmüller S, Hayatsu H. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and A α C) in the water of the Danube river. Mutat Res 2000; 466: 27-35.
- ²⁹ Kataoka H. Methods for the determination of mutagenic heterocyclic amines and their applications in environmental analysis. J Chromatogr A 1997; 774: 121-142.
- ³⁰ Skog K, Johansson M, Jägerstad M, in: Adamson RH, Gustafsson JA, Ito N, Nagao M, Sugimura T, Wakabayashi K, Yamazoe Y (Eds). Proceedings of the 23rd international Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation. Princeton Scientific, Princeton, NJ, 1995; 9.
- ³¹ Jägerstad M, Reuterswärd AL, Oste R, Dahlqvist R, Grivas S, Olsson JC, Nyhammar T. Creatinine and Maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds. ACS Symp Ser 215 (1983) 507-519.

- ³² Skog K. Cooking procedures and food mutagens: a literature review. *Food Chem Toxicol* 1993; 31(9): 655-75.
- ³³ Felton JS, Knize MG. Occurrence, identification, and bacterial mutagenicity of heterocyclic amines in cooked food. *Mutat Res* 1991; 259: 205-217.
- ³⁴ Felton JS, Knize MG, Shen NH, Andresen BD, Bjeldanes LF, Hatch FT. Identification of the mutagens in cooked beef. *Environ Health Perspect* 1986; 67: 17-24.
- ³⁵ Knize MG, Salmon CP, Mehta SS, Felton JS. Analysis of cooked muscle meats for heterocyclic aromatic amine carcinogens. *Mutat Res* 1997; 376: 129-134.
- ³⁶ Loprieno N, Boncristiani G, Loprieno G. An experimental approach to identifying the genotoxic risk from cooked meat mutagens. *Food Chem Toxicol* 1991; 29(6): 377-86.
- ³⁷ Felton JS, Wu R, Knize MG, Thompson LH, Hatch FT. Heterocyclic Amine Mutagenicity/ Carcinogenicity: Influence of Repair, Metabolism, and Structure. In: Adamson RH, Gustafsson JA, Ito N, Nagao M, Sugimura T, Wakabayashi K, Yamazoe Y (Eds). *Proceedings of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, 23rd international Symposium, Heterocyclic Amines in Cooked Foods: Possible Human Carcinogens*. Princeton Scientific, Princeton, NJ, 1995; 93.
- ³⁸ Pfau W, Martin FL, Cole KJ, Venitt S, Phillips DH, Grover PL and Marquardt H. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis* 1999; 20: 545-551.
- ³⁹ Pfau W, and Marquardt H. Cell transformation in vitro by food-derived heterocyclic amines Trp-P-1, Trp-P-2 and N²-OH-PhIP. *Toxicology* 2001; 166: 25-30.
- ⁴⁰ Wakabayashi K, Sugiura T. Heterocyclic amines formed in the diet: carcinogenicity and its modulation by dietary factors. *J Nutr Biochem* 1998; 9: 604.
- ⁴¹ Ohgaki H, Takayama S, Sugimura T. Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food. *Mutat Res* 1991; 259: 399-410.
- ⁴² Snyderwine EG. Mammary gland carcinogenesis by food-derived heterocyclic amines: Metabolism and additional factors influencing carcinogenesis by 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Environ Mol Mutagen* 2002; 39: 165-170.
- ⁴³ Hatch FT, Knize GM, Moore DH, Felton JS. Quantitative correlation of mutagenic and carcinogenic potencies for heterocyclic amines from cooked foods and additional aromatic amines. *Mutat Res* 1992; 271: 269-87.
- ⁴⁴ Boobis AR, Lynch AM, Murray S, De La Torre R, Solans A, Farré M, Segura J, Gooderham NJ and Davies DS. CYP1A2 catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens in the major route of metabolism in humans. *Cancer Res* 1994; 54: 89-94.
- ⁴⁵ Snyderwine EG. Some perspectives on the nutritional aspects of breast cancer research. Food derived heterocyclic amines as etiologic agents in human mammary cancer. *Cancer* 1994; 74: 1070-1077.
- ⁴⁶ Turesky RJ (1994). DNA adducts of heterocyclic aromatic amines, arylazides and 4-nitroquinoline-1-oxide. In Hemminki K, Dipple A, Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerbäck D and Bartsch H (Eds) *DNA Adducts-Identification and Biological Significance*. IARC Scientific Publications No. 125, IARC, Lyon, pp. 217-228.
- ⁴⁷ Zheng W, Gustafson DR, Sinha R, Cerhan JR, Moore D, Hong C, Anderson KE, Kushi LH, Sellers TA, and Folsom AR. Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1724-1729.
- ⁴⁸ Minchin RF, Kadlubar FF, Ilett KF. Role of acetylation in colorectal cancer. *Mutat Res* 1993; 290: 35-42.
- ⁴⁹ Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jensen M, Kadlubar FF. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1994; 3: 675-82.
- ⁵⁰ Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 2002; 419: 448.
- ⁵¹ Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert M-C, Riediker S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002; 419: 449.
- ⁵² Rydberg P, Luening B, Wachtmeister CA, Eriksson L, Toernqvist M. Applicability of a modified Edman procedure for measurement of protein adducts: Mechanisms of formation and degradation of phenylthiohydantoins. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 570-581.
- ⁵³ Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Toernqvist M. Acrylamide: A cooking carcinogen?. *Chem Res Toxicol*; 13: 517-522.
- ⁵⁴ Callemann CJ, Wu Y, He F, Tian G, Bergmark E, Zhang S, Deng H, Wang Y, Crofton KM, Fennell T, Costa LG. Relationship between biomarkers of exposure and neurological effects in a group of workers exposed to acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1994; 126: 197-201.

- ⁵⁵ Johnson KA, Gorzinski SJ, Bodner KM, Campbell RA, Wolf CA, Friedmann MA, Mast RW. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 85: 154-168.
- ⁵⁶ Friedman MA, Dulak LH, Stedham MA. A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam Appl Toxicol* 1995; 27: 95-105.
- ⁵⁷ Sobel W, Bond GG, Parsons TW, Brenner FE. Acrylamide cohort mortality study. *Br J Ind Med* 1986; 43: 785-788.
- ⁵⁸ Collins JJ, Swaen GMH, Marsh GM, Utidjian HMD, Caporossi JC, Lucas LJ. Mortality patterns among workers exposed to acrylamide. *J Occup Med* 1989; 31: 614-617.
- ⁵⁹ Marsh GM, Gula MJ, Youk AO, Schall LC. Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup Environ Med* 1999; 56: 181-190.
- ⁶⁰ Mucci LA, Dickman PW, Steineck G, Adami H-O, Augustsson K. Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: Absence of an association in a population- based study in Sweden. *Brit J Cancer* 2003; 88: 84-89.
- ⁶¹ Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Sega GA, Brusick DJ. Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mut Res* 1995; 330: 71-99.
- ⁶² Constanza ME. Epidemiology and risk factors for breast cancer. UpToDate 2004. <http://www.uptodate.com>.
- ⁶³ Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *Lancet* 2001;358: 1389.
- ⁶⁴ Clemons, M, Goss, P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl Med* 2001; 344:276.
- ⁶⁵ Henderson, BE, Bernstein, L. The international variation in breast cancer rates: an epidemiological assessment. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 18 Suppl 1: S11.
- ⁶⁶ MacMahon, B, Trichopoulos, D, Brown, J, et al. Age at menarche, urine estrogens and breast cancer risk. *Int J Cancer* 1982; 30:427
- ⁶⁷ Hsieh, C-C, Trichopoulos, D, Katsouyanni, K, et al. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer* 1990; 46:796.
- ⁶⁸ Hamilton, AS, Mack, TM. Puberty and genetic susceptibility to breast cancer in a case-control study in twins. *N Engl J Med* 2003; 348:2313.
- ⁶⁹ Kelsey, JL, Gammon, MD, John, EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15:36.
- ⁷⁰ Zheng, T, Holford, TR, Mayne,ST, et al. Lactation and breast cancer risk: a case-control study in Connecticut. *Br J Cancer* 2001; 84:1472.
- ⁷¹ Tryggvadottir, L, Tulinius, H, Eyfjord, JE, Sigurvinsson, T. Breastfeeding and reduced risk of breast cancer in an icelandic cohort study. *Am J Epidemiol* 2001; 154:37.
- ⁷² Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360:187
- ⁷³ Rogan WJ. Pollutants in breast milk. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1996; 150: 981-990.
- ⁷⁴ Martin FL, Cole KJ, Weaver G, Williams JA, Millar BC, Grover PL and Phillips DH. Genotoxicity of human milk extracts and detection of DNA damage in exfoliated cells recovered from breast milk. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 494-504.
- ⁷⁵ Somogyi A and Beck H. Nurturing and breast-feeding: exposure to chemicals in breast milk. *Environ Health Perspect* 1993; 101 (Suppl. 2): 45-52.
- ⁷⁶ Ghoshal A and Snyderwine EG. Excretion of food-derived heterocyclic amine carcinogens into breast milk of lactating rats and formation of DNA adducts in the newborn. *Carcinogenesis* 1993; 14: 2199-2203.
- ⁷⁷ Mauthe RJ, Snyderwine EG, Ghoshal A, Freeman SPHT and Turteltaub KW. Distribution and metabolism of 2-amino-1-methyl-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in female rats and their pups at dietary doses. *Carcinogenesis* 1998; 19: 919-924.
- ⁷⁸ Brinton, LA, Schairer, C, Hoover, RN, Fraumeni, JF Jr. Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Invest* 1988; 6:245.
- ⁷⁹ Beral, V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362:419.
- ⁸⁰ Risks and benefits of estrogen and progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:321.
- ⁸¹ Marchbanks, PA, McDonald, JA, Wilson, HG, et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 2025.

- ⁸² Hankinson, SE, Willett, WC, Manson, JE, et al. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1292.
- ⁸³ Cauley, JA, Lucas, FL, Kuller, LH, et al. Elevated serum estradiol. *Ann Intern Med* 1999; 130:270.
- ⁸⁴ Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:606.
- ⁸⁵ Harris, JR, Lippman, ME, Veronesi, U, Willet, W. Breast Cancer. *N Engl J Med* 1992; 327:319.
- ⁸⁶ Kelsey JL, Horn-Ross PL. Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 7-18.
- ⁸⁷ Tominaga S, Kuroishi T. Epidemiology of breast cancer in Japan. *Cancer Lett* 1995; 90: 75-79.
- ⁸⁸ Buell P. Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51: 1479-1483.
- ⁸⁹ Hoegh, H, McKendry, CJ, Wright, WE, et al. Cancer incidence by race/ ethnicity California, 1988-1989 (unpublished report,1992).
- ⁹⁰ Bradley, CJ, Given, CW, Roberts, C. Race, socioeconomic status, and breast cancer treatment and survival. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 490.
- ⁹¹ Kelsey, JL, Fischer, DB, Holford, TR, et al. Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1981: 67: 327.
- ⁹² Hunter, DJ, Spiegelman, D, Adami, HO, et al. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer: a pooled analysis. *N Engl J Med* 1996; 334:356.
- ⁹³ Cho, E, Spiegelman, D, Hunter, DJ, et al. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1079.
- ⁹⁴ Boyd, NF, Stone, J, Vogt, KN, et al. Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. *Br J Cancer* 2003;89:1672.
- ⁹⁵ Ronco A, De Stefani E, Mendilaharsu M, Deneo-Pellegrini H. Meat, fat and risk of breast cancer: a case-control study from Uruguay. *Int J Cancer* 1996; 65: 328-331.
- ⁹⁶ Willett, WC, Rockhill, B, Hankinson, SE, et al. Epidemiology and nongenetic causes of breast cancer. In: *Diseases of the breast*, Harris, JR, Lippman, ME, Morrow, M, Osborne, CK (Eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2000. p.175.
- ⁹⁷ Mannisto S, Virtanen M, Kataja V, Uusitupa M, Pietinen P. Lifetime alcohol and breast cancer: a case-control study in Finland. *Public Health Nutr* 2000; 3: 11-18.
- ⁹⁸ Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 1998, 279: 535-540.
- ⁹⁹ Rohan TE, Jain M, Howe GR, Miller AB. Alcohol consumption and risk of breast cancer: a cohort study. *Cancer causes Control* 2000; 11:239-247.
- ¹⁰⁰ Yu H, Alcohol consumption and breast cancer risk. *JAMA* 1998; 280: 1138-1139.
- ¹⁰¹ Yu H, Berkel J. Do insulin-like growth factors mediate the effect of alcohol on breast cancer risk? *Med Hypotheses* 1999; 52: 491-496.
- ¹⁰² Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, Giovannucci EL, Rosner BA, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *JAMA* 1999; 281: 1632- 1637.
- ¹⁰³ Sellers TA, Kushi Lh, Cerhan JR, Vierkant RA, Gapstur SM, Vachon CM, Olson JE, Thorneau TM, Folsom AR. Dietary folate intake, alcohol, and risk of breast cancer in a prospective study of postmenopausal women. *Epidemiology* 2001; 12: 420-428.
- ¹⁰⁴ Minton, JP, Foecking, MK, Webster, DJ, Matthews, RH. Response of fibrocystic disease to caffeine withdrawal and correlation of cyclic nucleotides with breast disease. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135: 157.
- ¹⁰⁵ Snyderwine EG. Diet and mammary gland carcinogenesis. *Recent Results Cancer Res* 1998; 152: 3-10.
- ¹⁰⁶ Smith-Warner SA, Spiegelman D, YaunSS, Adami HO, Beeson WL, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Goldbohm RA, et al. Intake of fruits and vegetables and risk of breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 2001; 285: 769-776
- ¹⁰⁷ Zhang S, Hunter DJ, Forman MR, Rosner BA, Speizer FE, Colditz GA, Manson JE, Hankinson SE, Willett WC. Dietary carotenoids and vitamins A, C and E and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 547-556.
- ¹⁰⁸ Ambrosone CB, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Graham S, Nemoto T, Freudenheim JL. Interaction of family history of breast cancer and dietary antioxidants with breast cancer risk. *Cancer Causes Control* 1995; 6: 407-415.
- ¹⁰⁹ Egan, KM, Stampfer, MJ, Giovannucci, E, et al. Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 988.
- ¹¹⁰ John, EM, Kelsey, JL. Radiation and other environmental exposures and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15:157.

- ¹¹¹ Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Cancers of the lung and pleura. in *Cancer Epidemiology and Prevention* [Schottenfeld D, Fraumeni J Jr, eds.] New York: Oxford University Press 1996; 637-665.
- ¹¹² Bonnet, M, Guinebretiere, JM, Kremmer, E, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Indt.* 1999; 91: 1376.
- ¹¹³ Wong, M, Pagano, JS, Schiller, JT, et al. New associations of human papillomavirus, simian virus 40, and epstein-barr virus with human cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1832.
- ¹¹⁴ Riboli E. Nutrition and cancer: Background and rationale of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Ann Oncol* 1992; 3: 783-91.
- ¹¹⁵ Rohrmann S and Becker N. Development of a short questionnaire to assess the dietary intake of heterocyclic aromatic amines. *Public Health Nutr* 2002; 5: 7-8.
- ¹¹⁶ Martin, F.L. et al, Genotoxicity of human mammary lipid, *Cancer Research* 56, 5342-5346, December 1, 1996
- ¹¹⁷ Gross GA. Simple methods for quantifying mutagenic heterocyclic aromatic amines in food products. *Carcinogenesis* 1990; 11:1597.
- ¹¹⁸ Toribio, F. et al, Evaluation of different clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines in a lyophilized meat extract, *J. Chromatography A*, 836 223-233, 1999
- ¹¹⁹ Easty, G.C. et al, Preparation and identification of human breast epithelial cells in culture, *Int. J. Cancer*: 26, 577-584, 1980
- ¹²⁰ Maron DM and Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 64: 159-165 and ;113: 173-215.
- ¹²¹ Yahagi T, NagaoM, Seino Y, Matsushima T, Sugimura T and Okada M. Mutagenicity of N-nitrosamines on Salmonella. *Mutat Res* 1977; 48: 121-130.
- ¹²² Watanabe M, Ishidate M, and Nohmi T. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of Salmonella typhimurium tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat Res* 1990; 234: 337-348.
- ¹²³ Josephy PD, DeBruin LS, Lord HL, Oak JN, Evans DH, Guo Z, Dong M and Guengerich FP. Bioactivation of aromatic amines by recombinant human cytochrome P4501A2 expressed in Ames tester strain bacteria: A substitute for activation by mammalian tissue preparations. *Cancer Res* 1995; 55: 799-802.
- ¹²⁴ Ames BN, McCann J and Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/ Mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 364-374.
- ¹²⁵ Gupta RC. ³²P-postlabelling analysis of bulky aromatic adducts. In: Phillips DH, Castegnaro M and Bartsch H (Eds.) Postlabelling methods for detection of DNA adducts. IARC Scientific Publications 1993; No. 124.
- ¹²⁶ Gupta RC. Enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer Res* 1985; 45: 5656-5662.
- ¹²⁷ Gorlewska-Roberts K, Green B, Fares M, Ambrosone CB, Kadlubar FF. Carcinogen-DNA adducts in human breast epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 2002; 39 (2-3): 184-92.
- ¹²⁸ Brandstetter BR, Korfmann A, Bergmann MM. Dietary Habits in the German EPIC Cohorts: Food Group Intake Estimated With Food Frequency Questionnaire. *Ann Nutr Metab* 1999; 43: 246-57.
- ¹²⁹ Abdulkarim BG, Smith JS, Heterocyclic Amines in Fresh and Processed Meat Products. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4680-87.
- ¹³⁰ Sinha R, Knize MG, Salmon CP et al. Heterocyclic Amine Content of Pork Products Cooked by Different Methods and by Varying Degrees of Doneness. *Fd Chem Toxicol* 1998 (a); 36: 289-97.
- ¹³¹ Sinha R, Kulldorf M, Curtin J et al. Fried, well-done red meat and risk of lung cancer in women (United States). *Cancer Causes Control* 1998 (b); 9: 621-30.
- ¹³² Sinha R, Rothman N, Salmon CP et al. Heterocyclic Amine Content in Beef Cooked By Different Methods to Varying Degrees of Doneness and Gravy Made from Meat Drippings. *Fd Chem Toxicol* 1998 (c); 36: 279-87.
- ¹³³ Skog K, Augustsson K, Steineck G et al. Polar and Non-polar Heterocyclic Amines in Cooked Fish and Meat Products and their Corresponding Pan Residues. *Fd Chem Toxicol* 1997; 35: 555-65.
- ¹³⁴ Rohrmann S, Becker N. Development of a short questionnaire to assess the dietary intake of heterocyclic aromatic amines. *Pub Health Nutr* 2002; 5: 1-8.
- ¹³⁵ Bohlscheid-Thomas S, Hoting I, Boeing H, Wahrendorf J. Reproducibility and relative validity of food group intake in a food frequency questionnaire developed for the German part of the EPIC-project. *Int J Epidemiol* 1997; 26 (Suppl. 1): S59-S70.
- ¹³⁶ Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC. Ceiling culture of mature human adipocytes: use in studies of adipocyte functions. *J Endocrinology* 2000. 164: 119-128.

- ¹³⁷ Brooks P and Lawley PD. Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to DNA. *Nature* 1964. 202: 781-784.
- ¹³⁸ Hemminki K. DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis* 1993; 14: 2007-2012.
- ¹³⁹ Strauss BS. The origin of point mutations in human tumor cells. *Cancer Res* 1992. 52: 249-253.
- ¹⁴⁰ Gupta RC, Spencer-Beach G. Natural and endogenous DNA adducts as detected by ³²P-postlabeling. *Regul Toxicol Pharmacol* 1996. 23: 14-21.
- ¹⁴¹ Agundez JAG, Ladero JM, Olivera M, Abildua R, Roman JM, Benitez J. Genetic analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in breast cancer patient. *Oncology* 1995. 52: 7-11.
- ¹⁴² Perera FP, Estabrook A, Hewer A, Channing K, Rundle A, Mooney LA, Whyatt R, Phillips DH. Carcinogen-DNA adducts in human breast tissue. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 1995. 4: 233-238.
- ¹⁴³ Friesen MD, Kaderlik K, et al. Analysis of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rat and human tissues by alkaline hydrolysis and gas chromatography/ electron capture mass spectrometry: validation by comparison with ³²P-postlabeling. *Chem Res Toxicol* 1994. 7:733-739.
- ¹⁴⁴ Totsuka Y, Fukutome K, Takahashi M, Takahashi S, Tada A, Sugimura T and Wakabayashi K. Presence of N2-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (dG-C8-MeIQx) in human tissues. *Carcinogenesis* 1996. 17: 1029-1034.
- ¹⁴⁵ Jijiang Z et al. Detection of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine-DNA adducts in normal breast tissues and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 2003. 12: 830-837.
- ¹⁴⁶ Pfau W et al. DNA adducts in human breast tissue: association with N-acetyltransferase-2 (NAT2) and NAT1 genotypes. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 1998. 7: 1019-1025.
- ¹⁴⁷ De Stefani E, Doneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M et al. A. Meat intake, heterocyclic amines and risk of colorectal cancer: a case control-control study in Uruguay. *Int J Oncol* 1997. 10: 573-580.
- ¹⁴⁸ Sinha R, Kulldorf M, Chow Wong-Ho et al. Dietary intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 2001. 10: 559-562.
- ¹⁴⁹ Sinha R, Kulldorf M, Swanson CA et al. Dietary heterocyclic amines and the risk of lung cancer among missouri women. *Cancer Res* 2000. 60: 3753-3757.
- ¹⁵⁰ Sinha R, Gustafson DR, Kulldorf M et al. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, a carcinogen in high-temperature-cooked meat, and Breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2000. 92: 1352-1354.
- ¹⁵¹ Delfino RJ, Sinha R, Smith C et al. Breast cancer, heterocyclic amines from meat and N-acetyltransferase 2 genotype. *Carcinogenesis* 2000. 21: 607-615.
- ¹⁵² Augustsson K, Skog K, Jägerstad M et al. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet* 1999. 353: 703-707.
- ¹⁵³ Lightfoot TJ, Coxhead JM, Cupid BC, Nicholson S, Garner RC. Analysis of DNA adducts by accelerator mass spectrometry in human breast tissue after administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and benzo[a]pyrene. *Mutat Res* 2000. 472: 119-127.
- ¹⁵⁴ Byrne C, Sinha R, Platz EA et al. Predictors of dietary heterocyclic amines in three prospective cohorts. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 1998. 7: 523-529.
- ¹⁵⁵ Cantwell M, Beth M et al. Relative validity of a food frequency questionnaire with a meat-cooking and heterocyclic amine module. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 2004. 13: 293-298.
- ¹⁵⁶ De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M et al. Case-control study on the role of heterocyclic amines in the etiology of upper aerodigestive cancers in Uruguay. *Nurt Cancer* 1998 (a): 32: 43-48.
- ¹⁵⁷ Keating GA, Sinha R, Layton D et al. Comparison of heterocyclic amine levels in home-cooked meats with exposure indicators (United States). *Cancer Causes Control* 2000. 11: 731-39.
- ¹⁵⁸ Mann N. Dietary lean red meat and human evolution. *Eur J Nutr* 2000. 39: 71-79.
- ¹⁵⁹ Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 2000. 21: 387-395.
- ¹⁶⁰ Kraus RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, et al. AHA dietary guidelines. Revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000. 102: 2284-99.
- ¹⁶¹ Bingham SA. Diet and colorectal cancer prevention. *Biochem Soc Trans* 2000. 28: 12-6.
- ¹⁶² World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research (WCRF/ AICR). Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: WCRF/ AICR, 1997.
- ¹⁶³ Committee on Medical Aspects of Food and Nutrition Policy (COMA). Nutritional Aspects of the Development of Cancer. Report of the Working Group on Diet and Cancer. Report on Health and Social Subject No. 48. Norwich, UK: The Stationary Office, 1998.
- ¹⁶⁴ Norat T, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer : a review of epidemiologic evidence. *Nutr Rev* 2001. 59: 37-47.

- ¹⁶⁵ Sandhu MS, White IR, McPherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001. 10: 439-46.
- ¹⁶⁶ Truswell AS. Report of an expert workshop on meat intake and colorectal cancer risk convened in December 1998 in Adelaide, South Australia. *Eur J Cancer Prev* 1999. 8: 175-8.
- ¹⁶⁷ Report of the Working Group on Diet and Cancer of the Committee on Medical Aspects of Food and Nutrition Policy. Nutritional aspects of the development of cancer. Rep Health Soc Subj (Lond) 1998;48:i-xiv, 1-274
- ¹⁶⁸ American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. *Nutrition* 1999 Jun;15(6):523-6
- ¹⁶⁹ Scheppach W, Bingham S, Boutron-Ruault MC, et al. WHO consensus statement on the role of nutrition in colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1999. 8: 57-62.
- ¹⁷⁰ Truswell AS. Whether meat is a risk factor for cancer remains uncertain. *BMJ* 1999. 319: 187.
- ¹⁷¹ Truswell AS. Report of an expert workshop on meat intake and colorectal cancer risk convened in December 1998 in Adelaide, South Australia. *Eur J Cancer Prev* 1999. 8: 175-178.
- ¹⁷² Hill MJ. Meat and cancer. *Eur J Cancer Prev* 1999. 8: 173-174.
- ¹⁷³ Chao A, Thun MJ, Connell CJ, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA* 2005. 293: 172-82.
- ¹⁷⁴ Norat T, Bingham S, Ferrari P, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst* 2005. 97: 906-16.
- ¹⁷⁵ Connor WE. *n*-3 Fatty acids from fish and fish oil: panacea or nostrum? *Am J Clin Nutr* 2001. 74(4): 415-6.
- ¹⁷⁶ Caygill CP, et al. Fat, fish, fish oil and cancer. *Br J Cancer* 1996. 74(1): 159-64.
- ¹⁷⁷ Fernandez E, et al. Fish consumption and cancer risk. *Am J Clin Nutr* 1999. 70(1): 85-90.
- ¹⁷⁸ De Deckere EA. Possible beneficial effect of fish and fish *n*-3 polyunsaturated fatty acids in breast and colorectal cancer. Review. *Eur J Cancer Prev* 1999. 8(3): 213-21.
- ¹⁷⁹ Norrish AE, et al. Prostate cancer risk and consumption of fish oils: a dietary biomarker-based case-control study. *Br J Cancer* 1999. 81(7): 1238-42.
- ¹⁸⁰ Terry P, et al. Fatty fish consumption and risk of prostate cancer. *Lancet* 2001. 357(9270): 1764-6.
- ¹⁸¹ Menotti A, et al. Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: cross-cultural correlations in the Seven Countries Study. The Seven Countries Study Research Group. *Eur J Epidemiol* 1999. 15(6): 507-15.
- ¹⁸² Marckmann P, et al. Fish consumption and coronary heart disease mortality. A systematic review of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 1999. 53(8): 585-90.
- ¹⁸³ Zhang J, et al. Fish consumption and mortality from all causes, ischemic heart disease, and stroke: an ecological study. *Prev Med* 1999. 28(5): 520-9.
- ¹⁸⁴ Oomen CM, et al. Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy, and the Netherlands. *Am J Epidemiol* 2000. 151(10): 999-1006.
- ¹⁸⁵ Schmidt EB, et al. *n*-3 Fatty acids from fish and coronary artery disease: implications for public health. Review. *Public Health Nutr* 2000. 3(1): 91-8.
- ¹⁸⁶ Nestel P. Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. *Am J Clin Nutr* 2000. 71(1): 228-31.
- ¹⁸⁷ Hallgren CG, et al. Markers of high fish intake are associated with decreased risk of a first myocardial infarction. *Br J Nutr* 2001. 86(3): 397-404.
- ¹⁸⁸ Nkondjock A, Ghadirian P. Associated nutritional risk of breast and colon cancers: a population-based case-control study in Montreal, Canada. *Cancer Lett* 2005. 223(1):85-91.
- ¹⁸⁹ Mannisto S, Dixon LB, Balder HF, et al. Dietary patterns and breast cancer risk: results from three cohort studies in the DIETSCAN project. *Cancer Causes Control* 2005. 16: 725-33.
- ¹⁹⁰ Frankel EN. Lipid Oxidation. Dundee, Oily Press 1998.
- ¹⁹¹ Kanzawa K, H. Ashida. Catabolic fat of dietary trilinoylglycerol hydroperoxides in rat gastrointestinal. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998. 1393: 336-348.
- ¹⁹² Kanzawa K, Ashida H. Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998. 1393: 349-361.
- ¹⁹³ Bartsch H et al. Etheno-DNA adducts as tools in human cancer etiology and chemoprevention. *Eur J Cancer Prev* 1997. 6: 529-534.
- ¹⁹⁴ Chung FL et al. Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis* 1996. 17: 2105-2111.
- ¹⁹⁵ Bartsch H et al. Formation, detection and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA. *Drug Metab Rev* 1994. 26: 349-371.

-
- ¹⁹⁶ Guichard Y et al. Formation and accumulation of DNA ethenobases in adult Sprague-Dawley rats exposed to vinyl chloride. *Carcinogenesis* 1996. 17: 1553-1559.
- ¹⁹⁷ Nair J et al. High dietary ω -6 polyunsaturated fatty acids drastically increase formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1997. 6: 597-601.
- ¹⁹⁸ Seitz HK and Simanowski UA. Alcohol and carcinogenesis. *Annu Rev Nutr* 1988. 8: 99-119.
- ¹⁹⁹ Garro A and Lieber C. Alcohol and cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990. 30: 219-249.
- ²⁰⁰ Wright R, et al. Alcohol-induced breast cancer: a proposed mechanism. *Free Radic Biol Med* 1999. 26: 348-354.
- ²⁰¹ Singletary K and McNary M. Influence of ethanol intake on mammary gland morphology and cell proliferation in normal and carcinogen-treated rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1994. 18: 1261-1266.
- ²⁰² Brooks P. DNA damage, DNA repair and alcohol toxicity – a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1997. 21: 1073-1082.
- ²⁰³ Ginsberg E. Estrogen, alcohol and breast cancer risk. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999. 69: 299-306.
- ²⁰⁴ Singletary K. Ethanol and experimental breast cancer: a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1997. 21: 334-339.
- ²⁰⁵ Perera FP, et al. Carcinogen-DNA adducts in human breast tissue. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1995. 4: 233-238.
- ²⁰⁶ Farinati F, et al. Effect of chronic ethanol consumption on activation of nitrosoparalidine to a mutagen by rat upper alimentary tract, lung and hepatic tissue. *Drug Metab Disp* 1985. 13: 210-214.
- ²⁰⁷ Seitz HK, et al. Enhanced pulmonary and intestinal activation of procarcinogens and mutagens after chronic ethanol consumption in the rat. *Eur J Clin Invest* 1981. 11: 33-37.
- ²⁰⁸ Garro A, et al. The effects of chronic ethanol consumption on carcinogen metabolism and on O^6 -methylguanine transferase-mediated repair of alkylated DNA. *Alcohol Clin Exp Res* 1986. 10: 73S-77S.
- ²⁰⁹ Schwab CE, Huber WW, Parzefall W et al. Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Crit Rev Toxicol* 2000. 30(1): 1-69.
- ²¹⁰ Hayatsu H, Arimoto S et al. Dietary inhibitions of mutagenesis and carcinogenesis. *Mut Res* 1988. 202: 429-446.
- ²¹¹ Comin-Anduix B, Boren J, Martinez S, et al. The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. *Eur J Biochem* 2001. 268: 4177-4182.
- ²¹² Felton JS, Knize MG et al. Isolation and characterisation of new mutagens from fried ground beef. *Carcinogenesis* 1984. 5: 95-102.
- ²¹³ Thompson PA et al. Evidence for the presence of mutagenic arylamines in human breast milk and DNA adducts in exfoliated breast ductal epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 2002. 39: 134-142.
- ²¹⁴ Pfau W, Martin FL, et al. Morphological transformation of C3H/M2 mouse fibroblasts by, and genotoxicity of extracts of human milk. *Mut Res* 2001. 498: 207-217.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Pfau und Prof. Dr. H. Marquardt für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in der Abteilung für Allgemeine Toxikologie des Pharmakologischen Instituts der Universität Hamburg durchzuführen. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Pfau für seine Betreuung und Unterstützung.

Die Berechnungen zur alimentären HAA-Aufnahme in dieser Dissertation wurden mit Hilfe der Abteilung für Klinische Epidemiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums ermöglicht. Mein Dank gilt Fr. Dr. S. Rohrmann für diese Zusammenarbeit.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Wittig und Herrn Dr. Pasel des Diakonie Krankenhaus Alten Eichen sowie Herrn Prof. Dr. J. Caselitz und seinen Mitarbeitern der Pathologie des Allgemeinen Krankenhaus Altona für die zur Verfügungstellung der Gewebeproben bzw. für deren Aufarbeitung.

Ein herzlicher Dank gilt den Mitarbeitern der Abteilung für Allgemeine Toxikologie: Angelika Piasecki, Annegret Ruge, Sabine Schröder und Klaus Söhren. Ich bedanke mich für ihre tatkräftige Unterstützung. Ohne sie wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Schließlich danke ich PD Dr. S. Kropf und Dipl.-Math. M. Grüning aus dem Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg für die statistische Beratung.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Jung
Vorname: Sea-Uck Lukas
Geburtsdatum/ -ort: 23.07.1975, Hamburg

Schulbildung:

1986 - 1995 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Hamburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

08/1995 - 08/1996 Endo-Klinik, Hamburg

Hochschulbildung:

10/1997 - 06/2004 Universität Hamburg - UKE: Studiengang Medizin
09/1999 Ärztliche Vorprüfung
02/2000 - 03/2000 Famulatur
Pathologisches Institut
Allgemeines Krankenhaus Barmbek, Hamburg
04/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07/2001 - 08/2001 Famulatur
Dept. of Hepato-Biliary Surgery and Liver Transplantation
University of Ulsan College of Medicine
Asan Medical Center, Seoul
08/2001 - 09/2001 Famulatur
Dept. of Emergency Medicine
University of Ulsan College of Medicine
Asan Medical Center, Seoul
09/2002 - 10/2002 Famulatur
Abteilung für Innere Medizin
Allgemeines Krankenhaus St. Georg, Hamburg
04/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeiten:

Seit 01.01.2005 Assistenzarzt, Neurologisches Rehabilitationszentrum der Median
Kliniken in Magdeburg in Kooperation mit der Neurologischen Klinik II
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

12 Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

S. Jung