

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

## **Acrylnitril-Proteinaddukte als neuer Expositionsmarker für Passivrauchen**

**I. Zwirner-Baier, A. Schmitt, G. Baier,**

Univ. HNO-Klinik Würzburg, Josef-Schneider-Straße 2, 97080 Würzburg

Förderkennzeichen: BWB 21015

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit Mitteln des  
Landes Baden-Württemberg gefördert

Dezember 2003

# Acrylnitril-Proteinaddukte als neuer Expositionsmarker für Passivraucher

Abschlussbericht BWB 21015

**I. Zwirner-Baier, A. Schmitt, G. Baier,**

Univ. HNO-Klinik Würzburg, Josef-Schneider-Straße 2, 97080 Würzburg

## 1. Einleitung

Acrylnitril ist in hohen Mengen im Tabakrauch vorhanden. Daher wurde dieser Stoff als Expositionsmarker für Passivraucher vorgeschlagen. Das etablierte N-terminale Valinaddukt an Hämoglobin (N-Cyanoethylvalin=CEV) soll auf seine Eignung als spezifischer Marker für Tabakrauchbelastung untersucht werden, besonders in Hinblick auf Passivraucherbelastung. Dieses Addukt bietet sich in besonderem Maße an, da Nichtraucher eine sehr niedrige Hintergrundbelastung haben und bei Rauchern eine Dosisabhängigkeit des Adduktes nachgewiesen wurde.

4-Aminobiphenyl (4-ABP) ist ein Humankarzinogen, das in vielen Studien als Tabakrauchtypischer Marker eingesetzt wurde. Bekannt wurde die Substanz durch die Blasenkrebsinduktion bei Chemikararbeitern. Aromatische Amine werden in der Regel durch Cytochrom-P-450 IA2 oxidiert, und hauptsächlich durch N-Acetyltransferasen und Glutathiontransferasen inaktiviert. Der Zusammenhang zwischen individueller Enzymausstattung und Einflüsse auf die Höhe von Expositionsmarkern wurde in verschiedenen Studien untersucht (Vineis, 1992, Yu et al., 1995). Das Oxidationsprodukt N-Hydroxylamin ist für die Bildung von Addukten am Hämoglobin ausschlaggebend. 4-ABP eignet sich als Biomarker, da ein großer Teil der Dosis an Hämoglobin bindet und die Addukte einfach bestimmbar sind (Neumann, 1988). 4-Aminobiphenyl und Acrylnitril sind wichtige Bestandteile des Zigarettenrauchs. Im Hauptstromrauch wurden ca. 5.0 ng 4-Aminobiphenyl (4-ABP) und 3-19 mg Acrylnitril/Zigarette beschrieben (Darrall et al, 1998). Acrylnitril ist in 100.000-fach höherer Menge im Zigarettenrauch vorhanden als 4-Aminobiphenyl.

Acrylnitril ist eine reaktive Substanz und wirkt direkt alkylierend. Sie bindet bevorzugt an Proteine, aber auch an DNA (Benz et al., 1997). Die biologisch wirksame Dosis von Acrylnitril kann anhand von Hämoglobinaddukten gemessen werden. Das N-Cyanoethylvalinaddukt am Hämoglobin wurde bei Rauchern und Nichtrauchern bestimmt und zeigt individuelle Unterschiede innerhalb der jeweiligen Gruppe (Licea-Perez et al., 1999). Ebenfalls soll Cotinin im Plasma gemessen werden, ein Metabolit von Nikotin, der für kurz zurückliegende Belastungen einen zusätzlichen Wert für innere Belastung ergibt (Crawford et al., 1994).

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Fragebogen:**

Ein Fragebogen zu Rauchgewohnheiten, Beruf, Ernährung und Umwelteinflüssen wurde von den Probanden parallel zu der Blutabnahme ausgefüllt.

### **2.2. Blutentnahme**

Die heparinisierten Blutproben (10 ml/Proband) wurden codiert und über eine Dichtegradientenzentrifugation in Lymphozyten, Erythrozyten und Plasma aufgetrennt. Die Erythrozyten wurden gewaschen und für die Messung der Hämoglobinaddukte verwendet, das Plasma für die Cotininbestimmung. Erythrozyten und Plasma wurden eingefroren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Fällung von Globin und Hämoglobin aufbewahrt.

### **2.3. Bestimmung von N-Cyanoethylvalin-Addukten (CEV-Addukte) am Hämoglobin**

Für die Bestimmung von Acrylnitriladdukten wurde aus ca. zwei Drittel der Erythrozyten Globin gefällt. Am Globin wird das alkylierte N-terminale Valin durch modifizierten Edmanabbau abgespalten und unter Zusatz von N-2-Ethoxyethyl-Valin-Alanin-anilid als internem Standard und nach Derivatisierung mit Pentafluorphenylisothiocyanat (Lewalter, 1996). Im chemischen Verhalten sollte der interne Standard dem Analyten nahe kommen, was durch die Wahl des Dipetides N-2-Ethoxyethyl-Valin-Alanin-anilid gelingt. Das Derivat des N-2-Cyanoethyl-Valins, das 1-(2-Cyanoethyl)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin, wurde extrahiert, aufgereinigt und mit Gaschromatographie/ Massenspektroskopie mit Elektronenstoß-Ionisation (70 eV) gemessen. Mit Hilfe des Single-Ion-Monitoring wurden die Massen  $m/z$ : 335 sowie  $m/z$ : 377 vermessen, die Auswertung erfolgte bevorzugt über die Masse  $m/z$ : 377. Der interne Standard wurde über die Massenspuren  $m/z$ : 367 und  $m/z$ : 396, bevorzugt  $m/z$ : 396 gemessen. Da die Proben sehr dreckig waren, wurde eine Vorsäule bei der gaschromatographischen Trennung benutzt.

Die Kalibrierung des Verfahrens erfolgt über die Verwendung von Dipetiden. Diese Standards entsprechen dem N-Terminus der alkylierten alpha-Globinkette während die Carboxylgruppe des Leucins als Anilid geschützt ist. Die Kalibrierstandards werden wie die

zu analysierenden Proben aufgearbeitet und analysiert. Die Probenwerte wurden in pmol/g Globin errechnet. Eine Umrechnung in µg/l Blut kann über die Globinkonzentration vorgenommen werden (144 g Globin/l Blut). Die Nachweisgrenze lag bei 10 pmol/g Globin.

#### **2.4. Bestimmung von 4-Aminobiphenyl-Hämoglobinaddukte**

Aus ca. einem Drittel der Erythrozyten wurde durch Zugabe von Ethanol Hämoglobin gefällt, abzentrifugiert, mehrfach gewaschen und getrocknet. 100 mg Hämoglobin wurden nach Zugabe von 100 pg des internen Standards  $d_9$ -4-Aminobiphenyl mit 6 ml 1M Natronlauge mit 0.05% SDS eine Stunde bei 20-25 °C hydrolysiert, dabei wird der ursprüngliche Aminoaromat als Spaltprodukt vom Protein wieder freigesetzt. Das aromatische Amin wurde anschließend durch Festphasenextraktion (C18-Kartuschen: Polysorb MP-1) isoliert und mit 1 ml Ethylacetat von den Säulen eluiert. Um die Proben für die GC/MS- Analyse zugänglich zu machen, wurden die getrockneten Probenextrakte mit 100 µl Pentafluorpropionsäureanhydrid derivatisiert. Mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge erfolgte die Aufkonzentration der Proben bis zur Trockene. Der verbliebene Rückstand wurde in 50 µl Ethylacetat aufgenommen und bis zur Messung bei -20°C zwischengelagert. Ein Aliquot des Extraktes wurde gaschromatographisch getrennt und massenspektrometrisch im negativen chemischen Ionisationsmodus (NCI) mit Methan als Reaktandgas gemessen. Zur Auswertung wurde das Verhältnis der Massenspuren  $m/z$  295 (4-Aminobiphenyl-PFPA-Derivat) im Verhältnis zu  $m/z$  304 ( $d_9$ -4-Aminobiphenyl-PFPA-Derivat) verwendet. Um die Schwankungen des Meßgerätes auszugleichen, wurde an jedem Meßtag die Empfindlichkeit des Massenspektrometers mit einer Standardreihe (Konzentrationsbereich: 100 fg/µl-10pg/µl) überprüft. Das Detektionslimit liegt bei 10 fg/µl 4-ABP-Derivat on column.

#### **2.5. Bestimmung von Cotinin im Plasma**

Das Cotinin wurde aus der Plasmaprobe (600 µl) unter Anwendung von Festphasenextraktion (Isolute HM-N, Separtis) gewonnen, aufkonzentriert und mit HPLC (Fließmittel: 30 mmol Zitronensäure, 30 mmol Kaliumdihydrogenphosphat, pH 6.0, 14% Acetonitril; Säule: C18, 250 x 4.0 mm, Fluß: 1.0 ml) kombiniert mit UV-Detektion (262 nm) vermessen. Der Gehalt wurde über eine externe Standardreihe (5-5000 ng/ml) bestimmt, die täglich parallel zu den

Proben vermessen wurde. Zur Kontrolle der Aufarbeitung wurde pro Reihe jeweils eine mit 100 ng dotierte Plasmaprobe mitaufgearbeitet. Die Nachweisgrenze wurde mit 5 µg/l Plasma bestimmt, die Bestimmungsgrenze lag bei 10 µg/l Plasma.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Allgemeines

Im Zeitraum Juni 2002-Februar 2003 wurden an der HNO-Klinik Würzburg bei ambulanten und stationären Patienten Blutproben entnommen. Die Studiendaten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

*Tabelle 1: Studiendaten*

Teilnehmer:	262
Blutproben:	262
Fragebogenrücklauf:	251 (=95.8%)
Verwertbare Angabe zum Rauchen:	248 (=95.6%)

#### 3.2. Fragebogen

Von 251 Teilnehmern liegt ein vollständig ausgefüllter Fragebogen (95,8%) vor. Die Einteilung der Probanden in Raucher, Nichtraucher und Passivraucher erfolgte an Hand der Selbstauskünfte im Fragebogen (Tabelle 2). Personen, die in den letzten 4 Monaten das Zigarettenrauchen einstellten, wurden ausgeschlossen (n= 4).

*Tabelle 2: Einteilung der Studienpopulation*

	<b>Raucher</b>	<b>Nichtraucher</b>	<b>Passivraucher</b>	<b>Nicht klassifizierbar</b>
Anzahl	n=102	n=103	n=31	n=10
Alter	18-75	19-84	16-67	
Geschlecht (m/w)	71/31	60/43	15/16	
Zigaretten (Mittel)	1-50 (17)	-	1-40 (12.4)	

Als Raucher wurden Personen klassifiziert, die mindestens 1 Zigarette pro Tag rauchten. Die Auswertung der Fragebögen ergab einen Zigarettenkonsum zwischen 1 und 50 Zigaretten/Tag in der Rauchergruppe. Dazu kam oft noch eine nicht geringe Passivrauch-

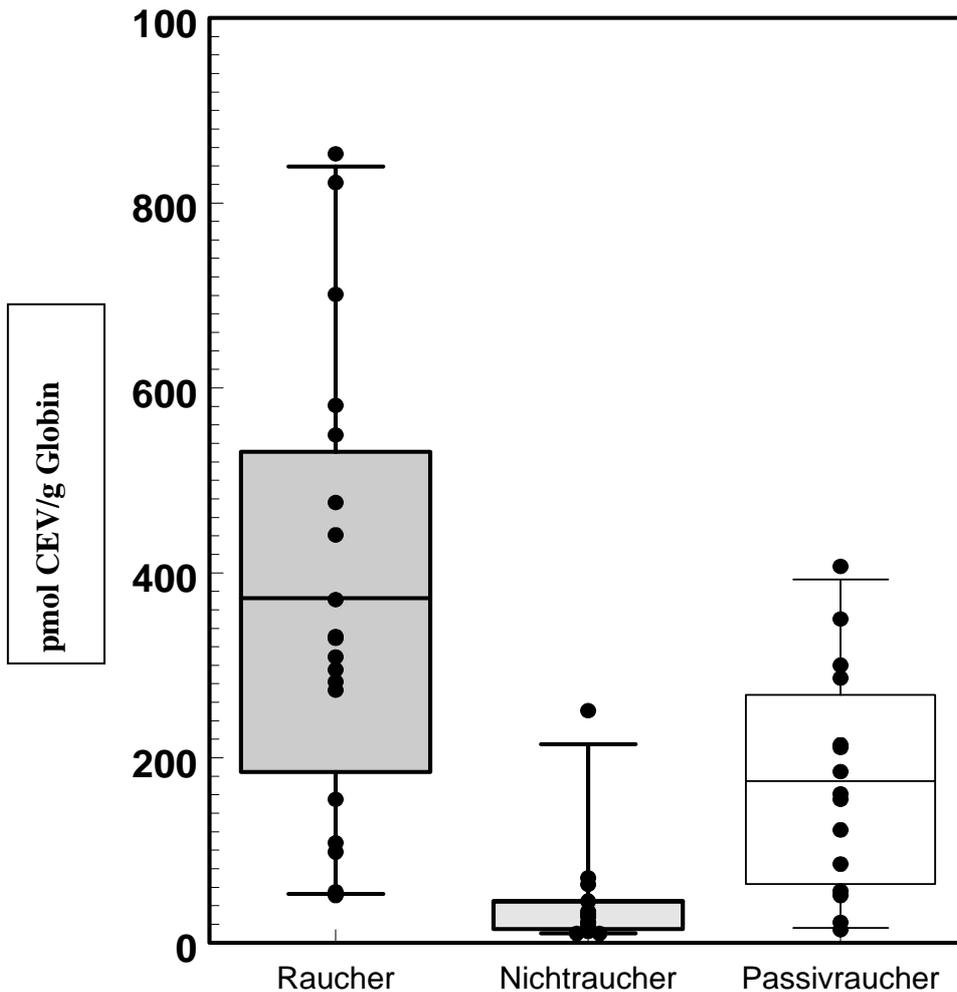
Belastung durch ebenfalls rauchende im Haushalt des Rauchers lebende Personen (Eltern, Großeltern, Kinder). Bei der Auswertung des Fragebogens zeigte sich, dass viele Personen, die bei der Befragung vor der Blutabnahme sich als „Passiv-Raucher“ bezeichnet hatten, selbst Gelegenheitsraucher (pro Woche bis zu 3 Zigaretten) waren oder niedrig exponiert waren (nur am Wochenende, Kurzstreckenfahrgemeinschaft mit Raucher). Diese Personen wurden daher in die Gruppe der Raucher bzw. Nichtraucher eingeordnet. Als Nichtraucher wurden Personen angesehen, bei denen niemand im Haushalt oder am Arbeitsplatz rauchte und auch Ex-Raucher, die seit mindestens 6 Monaten nicht mehr rauchten.

### **3.3. N-Cyanoethylvalin-Addukte (CEV-Addukte) am Hämoglobin**

Die Aufarbeitung und Messung der Acrylnitriladdukte bereitete Probleme, da sie hauptsächlich in den Sommermonaten erfolgte. Bedingt durch extrem hohen Außentemperaturen in 2003 traten mehrfach pro Woche technische Probleme mit der Klimaanlage zur Kühlung der Laborräume und des Meßraums auf. Die Messungen der Proben mit GC/MS mußten abgebrochen werden, sobald die Kühlung ausfiel. Mehr als 50 Proben wurden bei der Auswertung ausgeschlossen, weil, die oben angesprochenen, technischen Probleme an Meßtagen aufgetreten waren, 30 weitere Proben waren nicht auswertbar, weil die Aufarbeitung nicht standardisiert durchgeführt werden konnte. Insgesamt konnten trotzdem von 48 Probanden (19 Raucher, 14 Nichtraucher, 15 Passivraucher) Daten erhalten werden, die in Abbildung 1 dargestellt sind.

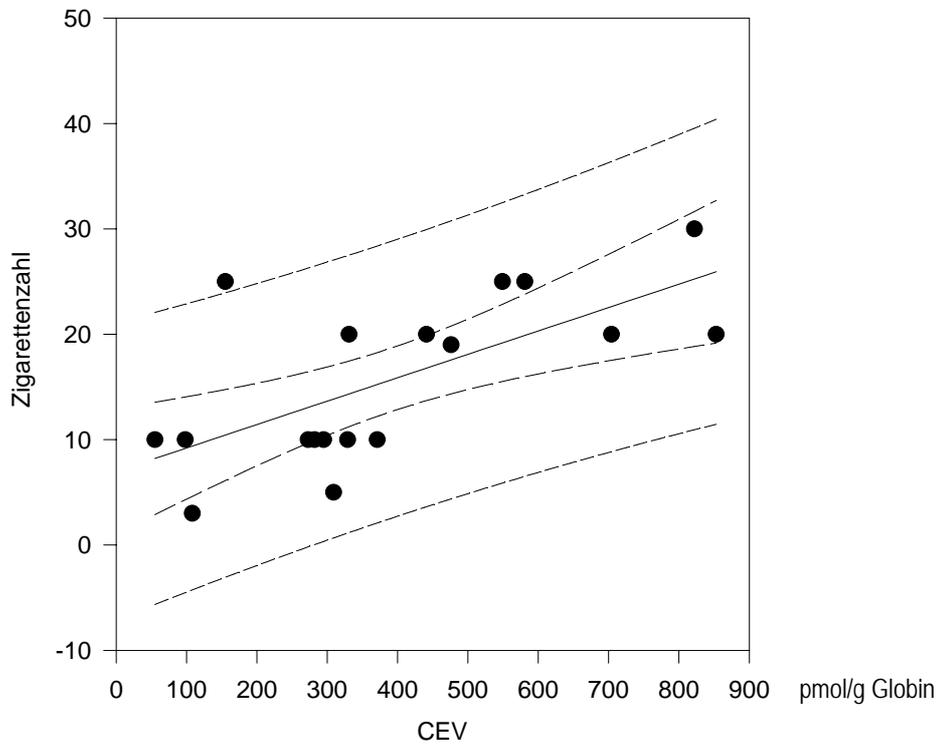
Bei den Rauchern lag der Mittelwert bei  $372 \pm 242$  pmol/g, bei den Nichtrauchern bei  $45 \pm 62$  pmol/g und bei den Passivrauchern bei  $174 \pm 121$  pmol/g. Alle drei Gruppen zeigten Unterschiede mit hoher statistischer Signifikanz: Raucher zu Nichtraucher  $p=0,00002$ ; Raucher zu Passivraucher  $p=0,007$ ; Nichtraucher zu Passivraucher  $p=0,001$ . Da die Werte in allen drei untersuchten Gruppen normal verteilt waren, wurde zur statistischen Auswertung der Student t-test verwendet.

## Cyanoethylvalinaddukte



**Abb. 1:** Die Cyanoethylvalinaddukt mengen in den einzelnen Gruppen sind in der Form von Boxplots dargestellt. Jeder Punkt stellt den Meßwert eines Probanden dar. Die Box enthält 50% der Werte, der Balken nach oben ist begrenzt durch die 95te Perzentile, der Balken nach unten durch die 5te Perzentile. Der Mittelwert ist durch den Balken in der Box abgebildet. Die Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden mit der Hälfte der Nachweisgrenze einbezogen.

Bei 18 Rauchern wurde die Menge der gemessenen Acrylnitriladdukte mit der im Fragebogen angegebenen Zigarettenzahl/Tag korreliert. Es zeigte sich eine positive Korrelation  $r=0.67$ ,  $p=0.0024$  (Abb.2). In der Gruppe der Passivrauch-belasteten Probanden ( $n=14$ ) konnte keine Korrelation zwischen den passiv-gerauchten Zigaretten und dem Adduktspiegel gefunden werden ( $r=0.45$ ,  $p=0.1$ ).



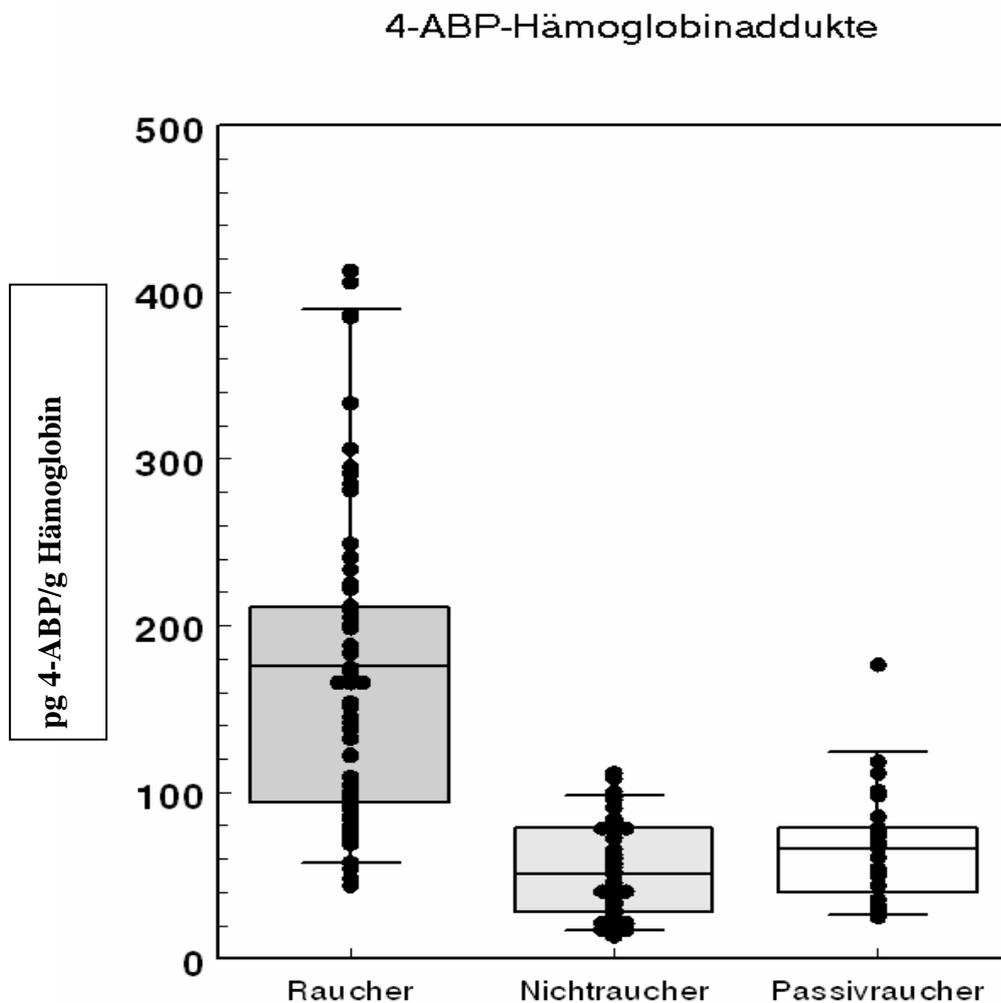
**Abb.2:** Korrelation der CEV-Addukte in der Rauchergruppe mit der Angabe der gerauchten Zigaretten pro Tag ( $r=0.67$ ,  $p=0.002$ )

### 3.4. 4-Aminobiphenyl-Hämoglobinaddukte

Auch bei der Messung der Hämoglobinaddukte traten die oben beschriebenen technischen Probleme auf. Da die Messungen aber hauptsächlich im Frühjahr erfolgten, konnte der Großteil der Proben ausgewertet werden. Bei 65,7% der Raucher ( $n=67$  Probanden), 61,2% der Nichtraucher ( $n=63$  Probanden) und 66,7% der Passivrauch-belasteten Personen ( $n=28$  Probanden) wurden 4-Aminobiphenyl-Adduktspiegel am Hämoglobin bestimmt. Alle Proben wurden einmal aufgearbeitet und zum Teil mehrfach gemessen. Das als interner Standard zugesetzte deuterierte 4-ABP ermöglicht diese Vorgehensweise. In vorangegangenen Studien zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung doppelt aufgearbeiteter Proben (Abweichungen  $>5\%$ ). Die Proben wurden ein zweites Mal mit GC/MS vermessen, wenn der Tagesfaktor für das Ansprechen des Massenspektrometers  $>1.2$  oder kleiner  $0.8$  war.

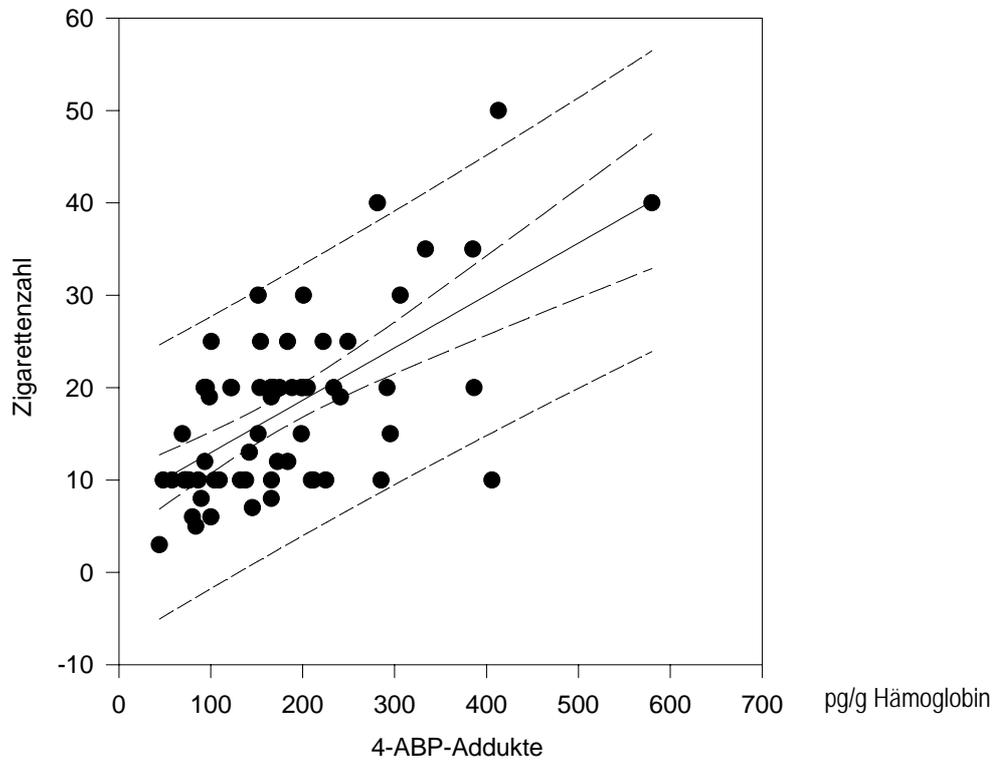
Die Rauchergruppe zeigte den höchsten Mittelwert:  $175.2 \pm 103.3$  pg/g Hb, die Mittelwerte der Nichtraucher und Passivraucher waren niedriger, bei Nichtrauchern lag er bei  $51.1 \pm 27.9$  pg/g Hb und in der Passivrauchgruppe bei  $66.3 \pm 33.7$  pg/g Hb. Der Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern ( $p < 0.0001$ ) und zwischen Rauchern und Passivrauchern

( $p < 0.0001$ ) war hochsignifikant. Auch war die Unterscheidung auf Gruppenbasis von Nichtrauchern und Passivrauchern möglich ( $p = 0.027$ ), allerdings weit weniger deutlich, die starke Überlappung der beiden Gruppen ist in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3:** Die Verteilung der 4-Aminobiphenyl-Hämoglobinaddukte in den einzelnen Gruppen ist in der Form von Boxplots dargestellt. Jeder Punkt stellt den Meßwert eines Probanden dar. Die Box enthält 50% der Werte, der Balken nach oben ist begrenzt durch die 95te Perzentile, der Balken nach unten durch die 5te Perzentile. Der Balken in der Box stellt den Mittelwert dar. Die Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden mit der Hälfte der Nachweisgrenze einbezogen.

Die Anzahl der gerauchten Zigaretten/Tag wurde mit den gemessenen Adduktspiegeln von 4-Aminobiphenyl korreliert. Bei 66 Rauchern mit Angabe zur Zigarettenzahl im Fragebogen ergab sich ein Korrelationskoeffizient von  $r=0.63$ ,  $p=0.0000003$ .

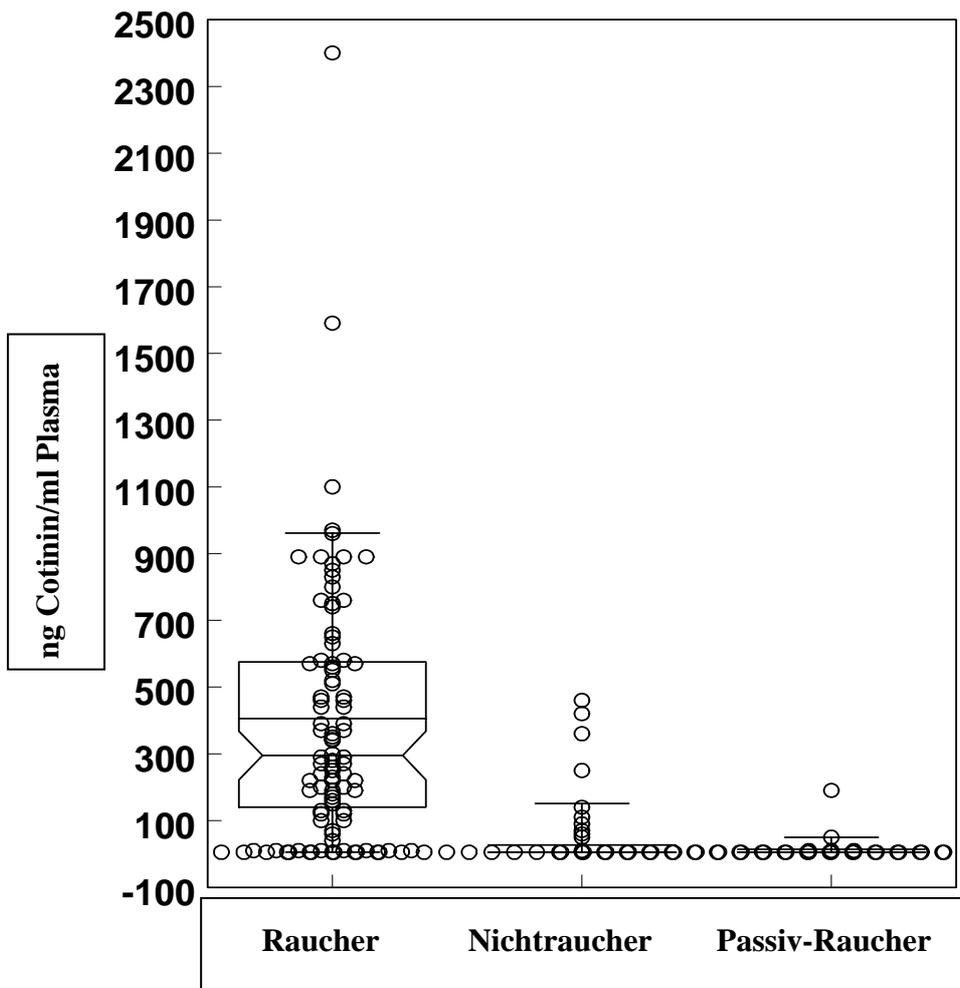


**Abb.4:** Korrelation der 4-ABP-Hämoglobinaddukte in der Rauchergruppe mit dem Zigarettenkonsum/Tag ( $r=0.63$ ,  $p=0.0000003$ )

Keine Korrelation für passiv gerauchte Zigarettenanzahl und Adduktspiegel ergab sich in der Passiv-rauchenden Gruppe ( $r=0.42$ ,  $p=0.17$ ).

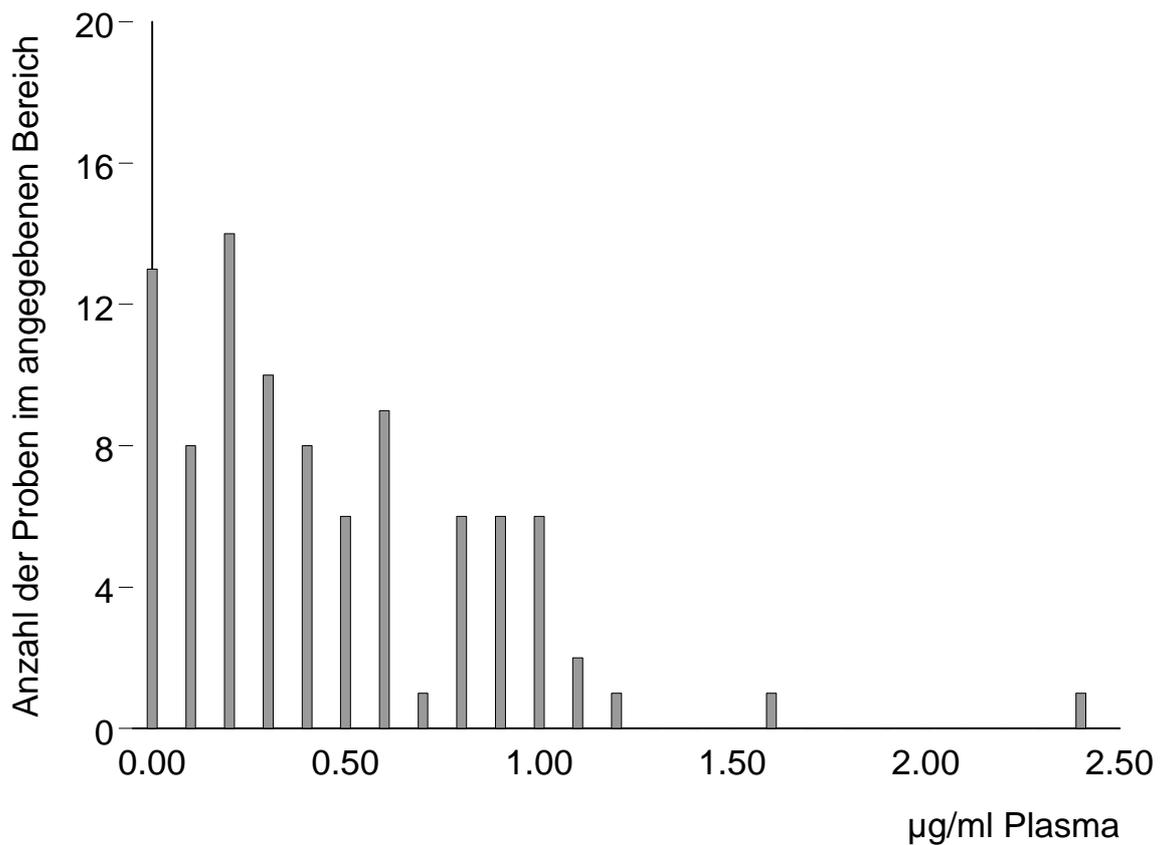
### 3.5. Cotininspiegel im Plasma

In den entnommenen Plasmaproben konnten bei 94 Nichtrauchern, 89 Rauchern und 31 passivrauchenden Personen Cotinin-Bestimmungen durchgeführt werden. Die Verteilung der Meßwerte in den einzelnen Gruppen ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abb. 5:** Die Ergebnisse der Cotininbestimmungen sind in der Form von Boxplots dargestellt. Jeder Punkt stellt den Meßwert eines Probanden dar. Die Box enthält 50% der Werte, der Balken nach oben ist begrenzt durch die 95te Perzentile, der Balken nach unten durch die 5te Perzentile. Die Einkerbung stellt den Medianwert dar, der Balken den Mittelwert. Die Werte unterhalb der Nachweisgrenze (5 ng/ml) wurden mit der Hälfte der Nachweisgrenze einbezogen.

Die Verteilung der Einzelwerte von Cotinin in der Rauchergruppe ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abb.6:** Verteilung der Cotinin-Plasmakonzentrationen in der Gruppe der Raucher (n=89)

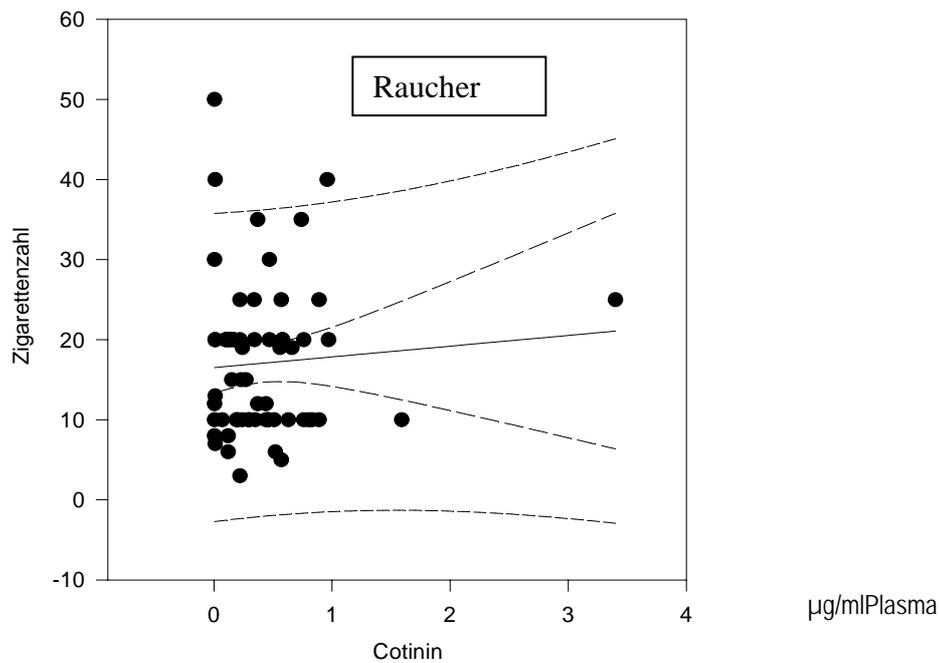
Da viel Proben in der Nichtraucher-Gruppe und Passivrauch-belasteten Gruppe unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurden die prozentualen Anteile der Proben in den drei Gruppen über der Nachweisgrenze aufgelistet (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Cotinin-Messungen**

	<b>Raucher</b> (n=89)	<b>Nichtraucher</b> (n=94)	<b>Passiv-Raucher</b> (n=31)
Probe > NG	89%	7%	13%
Median (ng/ml)	290	<NG	<NG
Mittelwert (ng/ml)	399.4	26.1	<NG

NG = Nachweisgrenze: 5 ng/ml

Keine Korrelation zeigte sich zwischen Anzahl gerauchter Zigaretten/Tag und Cotininspiegel in der Rauchergruppe (Abb.7).

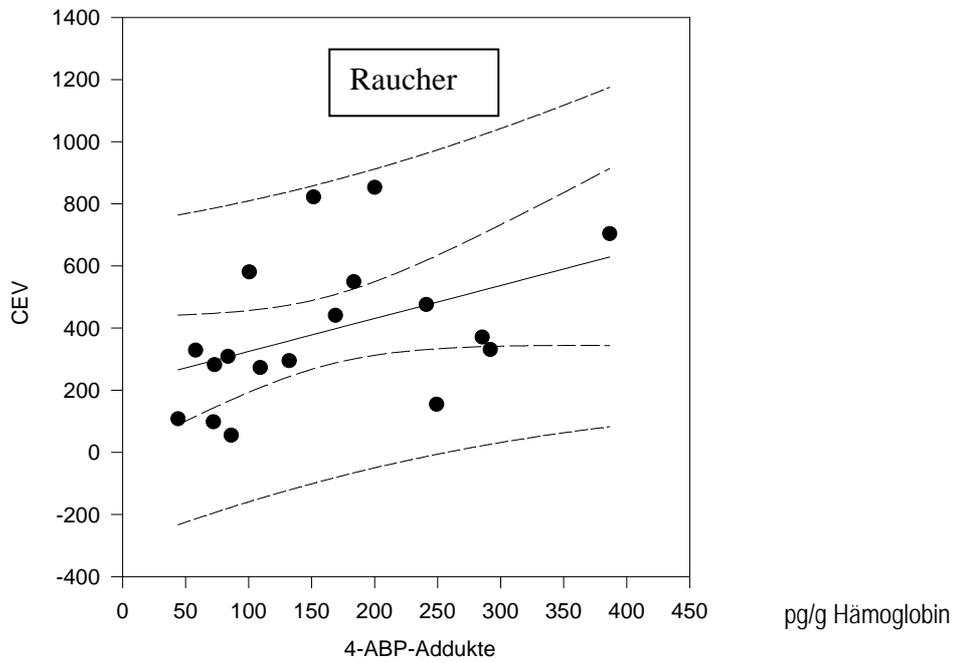


**Abb. 7:** keine Korrelation Cotininwerte im Plasma in der Rauchergruppe mit dem Zigarettenkonsum/Tag

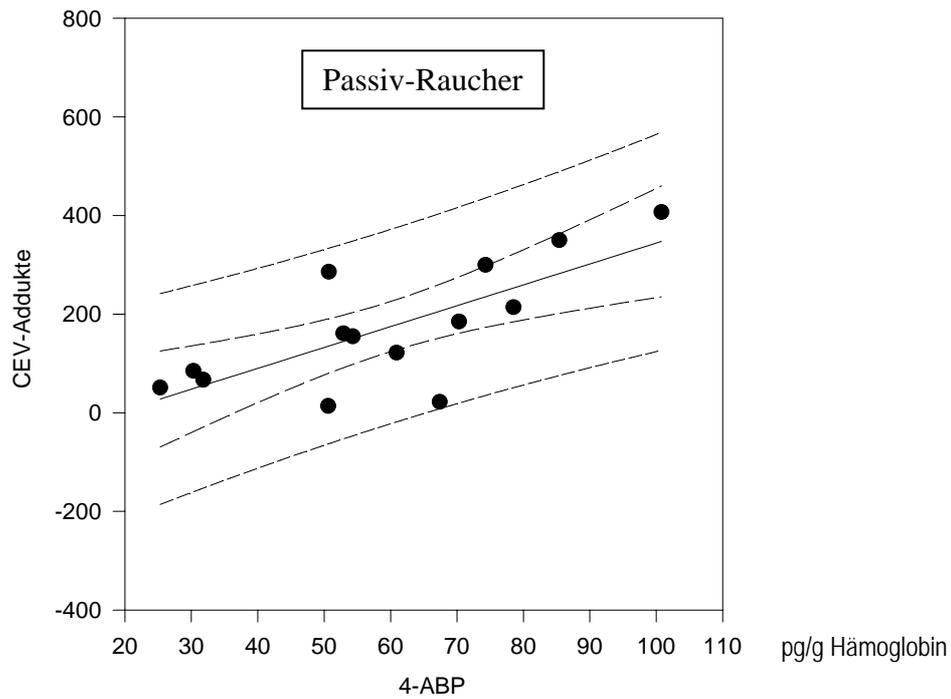
### 3.6. Korrelationen der gemessenen Marker in den unterschiedlich belasteten Gruppen

Proteinaddukte und Cotininspiegel im Plasma

In 62 Raucherproben und 9 Passivrauchern wurden Cotininspiegel im Plasma und Hämoglobinaddukte parallel bestimmt. In beiden Gruppen zeigte sich keine Korrelation der Biomarker. Bei 17 Rauchern und 11 Passivrauchern zeigte sich ebenfalls keine Korrelation zwischen Cotinin und den Acrylnitriladdukt mengen. Dagegen fanden sich bei 18 Rauchern eine schwache Korrelation für beiden analysierten Proteinaddukte ( $R=0.43$ ,  $p=0.05$ ) Abb.8.



**Abb.8:** Korrelation der CEV-Addukte mit den 4-ABP-Hämoglobinaddukten bei Rauchern



**Abb.9:** Korrelation der CEV-Addukte mit den 4-ABP-Hämoglobinaddukten bei Passivrauchern

Ebenfalls wurde eine signifikante Korrelation zwischen 4-ABP-Adduktspiegeln und CEV-Adduktspiegeln ( $r=0.74$ ,  $p=0.002$ ) bei 14 Personen aus der Passivrauch-belasteten Gruppe gezeigt (Abb. 9).

## **4. Diskussion**

### **4.1. Fragebogen**

Es wurden mehr Blutproben abgenommen als im Antrag vorgesehen waren, da es sich herausstellte, dass nicht von allen Probanden das, zur Bestimmung der verschiedenen Parameter, benötigte Untersuchungsmaterial gewonnen werden konnte.

Der tägliche Zigarettenkonsum lag im Durchschnitt bei 17 Zigaretten, eine Vielzahl der Raucher gab entweder 10 oder 20 Zigaretten pro Tag an. Bei 14 % der Raucher fehlte die Angabe zur täglich gerauchten Zigarettenzahl.

Bei der Auswertung der Fragebögen stellte sich heraus, dass gerade in der Gruppe, die sich selbst als der Passiv-Raucher eingestuft hatte, viele Personen nicht eindeutig klassifizierbar waren. Zehn Passivrauch-exponierte Personen machten unklare oder keine Angaben zur rauchenden Person, Menge der passiv-gerauchten Zigaretten oder zum Ort der Belastung, diese Proben wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Zwölf weitere Personen rauchten regelmäßig selbst und 5 weitere gelegentlich, so daß diese Personen zu den Rauchern umgruppiert werden mußten. Mehrere Personen (n=4) waren nur 1-2 mal pro Woche niedrig belastet, andere (n=5) nur am Wochenende durch Besuch von Gaststätten, öffentlichen Veranstaltungen, Tanzlokalen. Diese Personen wurden in die Gruppe der Nichtraucher eingeordnet, da die Belastung mit Tabakrauch in oben genannten Fällen zu den, normaler Lebensstil vorausgesetzt, nicht vermeidbaren Belastungen gehört. Übrig blieben 31 Probanden (n= 31), die, laut Angaben im Fragebogen, eindeutig und ausreichend Passivrauch belastet waren.

### **4.2. N-Caynoethylvalinaddukte am Hämoglobin**

Trotz der niedrigen Probandenzahl in allen drei Gruppen (Raucher n=19, Passiv-Raucher n=15, Nichtraucher n=14) wurden signifikante Unterschiede in der Höhe der Adduktspiegel zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt. Diese Unterschiede auf Gruppenbasis empfehlen Acrylnitril als sensitiven Marker für Passivrauchexposition. Die Korrelation ( $r=0.68$ ) der Adduktspiegel mit der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten belegt eindeutig Rauchen als Belastungsquelle und belegt die Spezifität des Markers. Auch bei anderen Studien wurde die Zunahme von CEV-Addukten mit Anzahl der gerauchten Zigaretten gefunden (Fennell et al., 2000). Acrylnitril ist spezifisch für Tabakrauch, das zeigt sich auch dadurch, daß viele Probanden aus der Nichtrauchergruppe Adduktspiegel unterhalb der Nachweisgrenze haben

und die Werte in der passivrauchenden Gruppe zwischen denen der Raucher und der Nichtraucher liegen. Vereinzelt traten Hintergrundbelastungen bei Nichtrauchern auf, die möglicherweise auf nicht vermeidbare Belastungen durch Teilnahme an öffentlichen Veranstaltungen oder Besuch von Lokalen zurückzuführen sind.

Die Meßwerte der Raucher und der Nichtrauchergruppe in unserer Studie liegen höher als die in der Arbeit von Schettgen et al. (2002), aber niedriger als bei beruflich belasteten Personen, wobei bei beruflicher Belastung die zusätzliche Belastung durch Rauchen kaum eine Rolle spielt (Thier et al., 2002).

In allen drei Gruppen fällt die große Spannbreite der Meßwerte innerhalb der einzelnen Gruppen auf. Bei Acrylnitril werden zwei verschiedenen Metabolismuswege beschrieben, der ein führt zu detoxifizierenden Glutathionmetaboliten, der andere zu gentoxischen Epoxidmetaboliten. Das letztere wird als N-Cyanoethylvalinaddukt gemessen und ist je nach Stoffwechsellage in höheren oder niedrigeren Dosen im Individuum vorhanden.

Dies kann auf Polymorphismen bei den metabolisierenden Enzymen begründet sein.

Aktivierende Enzyme wie das CYP2E1 oder desaktivierende Enzyme wie Glutathiontransferasen (GSTT1, GSTM1, GSTP1) kommen in verschiedenen Genvarianten im Menschen vor. Bis dato konnte jedoch das Auftreten einer einzelnen Genvariante bei exponierten Personen noch nicht mit der Höhe der Adduktspiegel signifikant positive korreliert werden, aber es gibt Hinweise, dass einzelne Varianten ein Rolle spielen könnten und daß womöglich nicht eine, sondern das Zusammenspiel zweier oder mehrerer Enzym polymorphismen für die interindividuellen Unterschiede verantwortlich sind (Thier et al., 2002, Fennell et al., 2000).

#### **4.3. 4-Aminobiphenyl-Hämoglobinaddukte**

Raucher hatten signifikant höhere 4-ABP-Adduktspiegel als Nichtraucher ( $p < 0.0001$ ) und Passivraucher ( $p < 0.0001$ ). Mehr als 50% der Raucher haben Adduktspiegel oberhalb der Nichtraucher und Passivraucher (Abb.3). Mit zunehmender Anzahl an gerauchten Zigaretten steigt der Adduktspiegel für 4-ABP bei den Rauchern. Die festgestellte Dosis-Wirkungsbeziehung wird durch Ergebnisse früherer Studien gestützt (Dallinga et al. 1998, Bryant et al., 1987).

Einige Individuen fallen durch sehr niedrige oder sehr hohe Adduktspiegel auf, die unterschiedlich verfügbare Mengen an dem biologisch wirksamen Metaboliten N-Hydroxylamin im Körper zurückzuführen sind. Unterschiede bei der Bildung von N-Hydroxylamin sind begründet auf aktivierende und desaktivierende Stoffwechselforgänge im

Individuum. Die Ursache liegt in der unterschiedlichen polymorphen Enzymausstattung bei den Cytochrom P450 Enzymen (CYP1A2) oder bei N-Acetyltransferasen (NAT1, NAT2) wie Glutathiontransferasen (GSTM1, GSTT1).

So zeigten in einer Gruppe von Rauchern langsame Acetylierer höhere Hämoglobinadduktspiegel an 4-ABP als schnelle Acetylierer (Vineis, 1992). Die Kombination langsamer Acetylierer und schneller N-Oxidierer zeigt höhere Adduktspiegel als schneller Acetylierer und langsamer N-Oxidierer (Landi et al., 1999). Bei vielen Studien zur individuellen Belastung mit Schadstoffen wurde eine große Spannweite der Werte in den einzelnen Gruppen festgestellt (Baier et al. 2000, Neumann et al. 1995, Zwirner-Baier et al. 1999).

Überraschenderweise war auch der Unterschied auf Gruppenbasis zwischen Nichtrauchern und Passivrauch-belasteten Personen signifikant unterschiedlich ( $p=0.027$ ). Betrachtet man aber die Verteilung der Werte, sieht man, daß mehr als 70% der Werte von Nichtrauchern und Passivrauchern im gleichen Konzentrationsbereich liegen, so daß eine Meßwert-basierte Unterscheidung, ob ein Individuum Passivrauch-belastet ist oder nicht, kaum möglich ist.

Bei allen Nichtrauchern war eine Hintergrundbelastung nachweisbar. Dies zeigt zum einen ein ubiquitäres Vorkommen von Tabakrauch in der Umwelt und wirft zum anderen die Frage nach weiteren möglichen Belastungsquellen auf.

#### **4.4. Cotininspiegel im Plasma**

In den drei Gruppen waren die Cotininwerte der Probanden nicht normal verteilt, daher wurde zur Berechnung der Signifikanzunterschiede der Mann-Whitney rank sum Test verwendet. Es konnte ein signifikanter Unterschied in den Cotininspiegeln zwischen Rauchern und Passivrauchern ( $p<0.001$ ) oder zwischen Nichtrauchern und Rauchern ( $p<0.001$ ) bestimmt werden. In der Tabakrauch-belasteten Gruppe war bei 13% der Personen Cotinin nachweisbar, d.h. bei fast doppelt so vielen Probanden als in der Nichtrauchergruppe. Dagegen zeigte die Gruppe der Passiv-Raucher im Vergleich zu der Gruppe der Nichtraucher keinen Unterschied ( $p=0.84$ ). Die Spannweite der Werte der einzelnen Individuen in der Rauchergruppe lag zwischen <Nachweisgrenze und 2400 ng/ml Plasma. Männer hatten einen Trend zu höheren Gehalten an Cotinin im Plasma als Frauen. Keine Korrelation konnte zwischen Anzahl der gerauchten Zigaretten und Höhe der Cotininspiegel gefunden werden.

Bei der Messung des Cotinins im Plasma ergab sich eine Zeitabhängigkeit der Blutspiegel zur letzten gerauchten Zigarette. Probanden mit niedriger Zigarettenzahl/Tag, aber geringem zeitlichem Abstand zur letzten Zigarette hatten höhere Werte, als Probanden mit hoher Zigarettenzahl/Tag, aber langem Abstand zur letzten gerauchten Zigarette. Bei einem Teil der rauchenden Patienten, die stationär in die Klinik aufgenommen wurden und bei denen Blutproben an folgenden Tag abgenommen wurden, lagen die Cotinin-Plasmaspiegel im Bereich der Nichtraucher. Diese Ergebnisse zeigen deutlich den Einfluß der relativ kurzen Halbwertszeit von Cotinin im Blut ( $t_{1/2}=14$  Stunden). Dieser Einfluß erklärt auch die fehlende Korrelation zwischen gerauchter Zigarettenzahl und Cotininspiegel im Plasma der Raucher. Ein weiterer Grund kann in einer falschen Angabe zur Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten im Fragebogen liegen. Auch kann eine Hintergrundbelastung mit Cotinin aus der Nahrung (Tee, Tomaten) nicht ausgeschlossen werden.

Die Cotininspiegel werden als relativ spezifisch für Tabakrauchexposition angesehen (Bennowitz, 1999). Die Ergebnisse belegen, daß Cotinin gut geeignet ist zwischen Rauchern und Nichtrauchern oder Passivrauchern zu unterscheiden, aber nicht zwischen Passivrauchern und Nichtrauchern. Der Zeitpunkt der Probenahme und die Frage nach dem Zeitpunkt der letzten gerauchten Zigarette sind für Cotinin als Marker für Rauchen von entscheidender Bedeutung.

#### **4.5 Vergleichende Betrachtung der untersuchten Biomarker**

Ein Raucher kann von einem Nichtraucher durch Messung einer der drei getesteten Marker mit ausreichender Sicherheit identifiziert werden. Die Cotininspiegel im Plasma nehmen allerdings mit  $t_{1/2}=14$  Stunden ab, so daß das Zeitfenster für zuverlässige Messungen im Bereich von Stunden liegt.

Die Korrelation von N-Cyanoethylvalinaddukten mit 4-Aminobiphenyladdukten in der Gruppe der Raucher als auch der Passivraucher zeigt, daß beide Marker mit Zigarettenrauchen in Zusammenhang stehen und als geeignete Biomarker für Tabakrauchbelastung anzusehen sind.

Der große Vorteil der beiden Proteinaddukte liegt in der Unabhängigkeit der Probeentnahmezeitpunktes und der Tatsache, daß auch niedrigste Belastungen über ca. 4 Monate akkumulieren, da die Hämoglobinaddukte mit der Lebensdauer der Erythrozyten korrelieren (Neumann, 1988). Es spielt keine Rolle, ob der Proband die letzte Zigarette gestern oder vor Wochen geraucht hat. Bemerkenswert ist der signifikante Unterschied zwischen der Gruppe

von Nichtrauchern und der Gruppe von Passivrauchern, der bei den Adduktspiegeln von 4-Aminobiphenyl ( $p=0.027$ ) und von Acrylnitril ( $p=0.001$ ) auftrat, aber nicht bei Cotinin zu sehen war.

Bei dem Nachweis von Passivrauchbelastung ist das Acrylnitriladdukt am spezifischsten, da die Gruppen sich am deutlichsten unterscheiden, auch deutlich sichtbar an den, sich nicht überlappenden, 50%-Bereichen der Werte in den untersuchten Gruppen.

Nur bei niedrigen Expositionen ist die Unterscheidung zwischen Nichtraucher und Passivraucher (passiv gerauchte Zigarettenmenge=1-2/Tag) mit dem CEV-Addukt nicht sicher möglich. Das gleiche gilt für Gelegenheitsraucher (1 Zig/Tag) und Passivraucher. Vergleicht man die drei Methoden auf Basis der problemlosen Anwendbarkeit, sind die Cotininspiegel am einfachsten zu bestimmen, liefern aber die am wenigsten aussagekräftigen Werte. Die aufwendigere Analytik zur Messung der Proteinaddukte liefert ohne Zweifel eindeutig zuverlässigere Ergebnisse.

Die Addukte von Acrylnitril bieten gegenüber den 4-Aminobiphenyladdukten den Vorteil, daß Hintergrundbelastung nur bei einzelnen Personen auftritt, was die Vermutung erhärtet, daß für die, bei allen Nichtrauchern vorhandene Hintergrundbelastung von 4-ABP, neben Rauchen auch andere Quellen, wie Nahrung und Verkehr, einen Beitrag liefern (Chiang et al., 1999, UBA,1999). Für Acrylnitril scheint es außer Rauchen und berufliche Belastung keine weiteren Quellen zu geben. Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse kann Acrylnitril als Expositionsmarker für Passivrauchbelastung empfohlen werden.

## 5. Literatur

Baier, G., Stopper, H., Zwirner-Baier I.

Hemoglobin adducts and micronuclei as biomarker in tobacco smoke exposed children, Arch. Pharmacol. Suppl. 361, R175, 2000

Bennowitz N.L.

Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure, Environm. Health. Perspect., 107, Suppl. 2, 349-55, 1999.

Bryant, M. S., Skipper, P.L., Tannenbaum S.R.

Hemoglobin adducts of 4-aminophenyl in smokers and nonsmokers, Cancer Research, 47, 602-608, 1987

Chiang, T.A., Wu, P.F., Liao, S.Y., Wang, L.F., Ying, C.K.

Mutagenicity and aromatic amine content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan, Food and Chem. Toxicol., 37, 125-134, 1999.

Crawford, F.G., Mayer, J., Santella, R.M., Cooper, T.B., Ottmann, R., Tsai, W.Y., Simon-Cereijido, G., Wang, M., Tang, D., Perera, F.P.

Biomarkers of environmental tobacco smoke in preschool children and their mothers, J. Natl. Cancer Inst., 86, 1398-1402, 1994.

Dallinga, J.W., Pachen, D.M. Wijnhoven, S.W., Breedijk, A., van't Veer, L. Wigbout, G. , van Zandwijk, N., Maas, L-M., van Agen, E., Kleinjans, J.C. van Schooten, F.J.

The use of 4-aminobiphenyl hemoglobin adducts and DNA adducts in lymphocytes of smokers as biomarker of exposure, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 7, 571-7, 1998

Darrall, K.G., Figgins, J.A., Brown, R.D., Phillips G.F.

Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke, Analyst, 123, 1095-1101, 1998.

DFG, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der DFG-

Arbeitsgruppe „Analytische Chemie“, Analysen im biol. Material, Band 2, 1-20 und D1-D9 (1996)

Fennell, T.R., MacNeela, J.P., Morris, R.W., Watson, M., Thompson, C.L., Bell, D.A.  
Hemoglobin adducts from acrylonitrile and ethylene oxide in cigarette smokers: effects of glutathione S-transferase T1-null and M1-null genotypes, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9, 705-712, 2000

Landi, M.T., Sinha R. Lang, N.P. Kadlubar, F.F.  
Chapter 16, Human cytochrome P450 1A2, *IARC Sci. Publ.*, 148, 173-195, 1999.

Lewalter J.  
N-alkylvaline levels in globin as a new type of biomarker in risk assessment of alkylating agents, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 68, 519-530, 1996.

Licea Perez H., Segerbäck D., Osterman-Golkar S.  
Adducts of acrylonitrile with hemoglobin in nonsmokers and in participants in a smoking cessation program, *Chem. Res. Toxicol.*, 12, 869-873, 1999.

Neumann, H.G., Hemoglobin binding in control of exposure to and risk assessment of aromatic amines, *IARC Sci. Publ.*, 89, 771-778, 1988.

Neumann, H.G., van Dorp C., Zwirner-Baier I.  
The implications for risk assessment of measuring the relative contribution to exposure from occupation, environment and lifestyle, *Toxicol. Letters*, 82-83, 771-8, 1995.

Thier, R., Lewalter, J., Selinski, S., Bolt, H.M.  
Possible impact of human CYP2E1 polymorphisms on the metabolism of acrylonitrile, *Toxicology Letters*, 128, 249-255, 2002.

Schettgen, T., Broding, H.C., Angerer J., Drexler, H.  
Hemoglobin adducts of ethylene oxide, propylene oxide, acrylonitrile and acrylamide-biomarkers in occupational and environmental medicine, *Toxicology Letters*, 134, 65-70, 2002.

Umweltbundesamt

Durchführung eines Risikovergleichs zwischen Dieselmotoremissionen und Ottoemissionen hinsichtlich ihrer kanzerogenen und nichtkanzerogenen Wirkungen, Forschungsbericht Nr. 29761001/01, 1999

Vineis P., Ronco G.

Interindividual variation in carcinogen metabolism and bladder cancer risk, *Environ. Health Perspect.*, 98, 95-98, 1992.

Yu, M.C., Ross, R.K., Chan, K.K., Henderson, B.E., Skipper, P.L., Tannenbaum, S.R., Coetzee, G.A.

Glutathione S-transferase M1 genotype affects aminobiphenyl-hemoglobin adduct in white, black and Asian smokers and nonsmokers, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 4, 861-4, 1995.

Zwirner-Baier I., Neumann, H.G

Polycyclic nitroarenes (nitro-PAH) as biomarker of exposure to diesel exhaust, *Mutation Research*, 441, 135-144, 1999.

## Zusammenfassung

Ein universeller, sensitiver und spezifischer Expositionsmarker für Tabakrauch wurde identifiziert, der es ermöglicht, bei Personen eine Passivrauchbelastung quantitativ nachzuweisen. Neben bekannten Expositionsmarkern für Tabakrauch wie 4-Aminobiphenyl (4-ABP) und Cotinin, die nicht universell einsetzbar sind, wurde das N-terminale Cyanovalinaddukt von Acrylnitril am Globin bei Rauchern, Nichtrauchern und Passivrauchern gemessen, da Acrylnitril, wie die beiden anderen Stoffe auch, im Tabakrauch gefunden wurde.

Im Zeitraum Juni 2002-Februar 2003 wurden an der HNO-Klinik Würzburg 262 Probanden mit Hilfe eines Fragebogens interviewt (95.8% Rücklauf) und eine Blutprobe entnommen. Die Auswertung der Fragebögen ergab, daß 31 Personen passiv Tabakrauch belastet, 102 Personen Raucher (1-50 Zigaretten/Tag) und 103 Personen Nichtraucher waren.

Die N-Cyanoethylvalinaddukte (CEV) unterschieden sich signifikant in allen drei Gruppen, bei Rauchern (n=19, Mittelwert:  $372 \pm 242$  pmol/g) Nichtrauchern (n=14, Mittelwert:  $45 \pm 62$  pmol/g,  $p=0.00002$ ) und Passivrauchern (n=15, Mittelwert:  $174 \pm 121$  pmol/g,  $p=0.007$ ). Der Unterschied zwischen der Gruppe der Nichtraucher und der Gruppe der Passivraucher war hoch signifikant  $p=0.001$ . Die äußere Belastung als Angabe von gerauchten Zigaretten korrelierte mit der inneren Belastung sowohl bei Rauchern als auch bei Passivrauchern. Auch die 4-Aminobiphenyl-Hämoglobinaddukte zeigten signifikant unterschiedliche Adduktspiegel zwischen den Gruppen: Raucher (n=67, Mittelwert:  $175 \pm 103$  pg/g), Nichtraucher (n=63, Mittelwert:  $51 \pm 28$  pg/g,  $p<0.0001$ ), Passivraucher (n=28, Mittelwert:  $66 \pm 34$  pg/g,  $p<0.0001$ ). Vergleicht man Passivraucher mit Nichtrauchern war auch hier der Unterschied signifikant ( $p=0.07$ ) allerdings schwächer als bei Acrylnitril. Beide Proteinaddukte sind auf Tabakrauchbelastung zurückzuführen, das zeigt die zwar schwache Korrelation der Adduktspiegel sowohl bei 18 Rauchern ( $r=0.43$ ,  $p=0.05$ ) als auch bei 14 Passivrauchern ( $r=0.73$ ,  $p=0.002$ ).

Bei 7% der Nichtraucher (n=94), bei 89% der Raucher (n=89, Medianwert: 290 ng/ml) und 13% Passivraucher (n=31) wurden Cotininspiegel im Plasma oberhalb der Nachweisgrenze bestimmt. Ein signifikanter Unterschied in den Cotininspiegeln ergab sich zwischen Rauchern und Passiv-Rauchern ( $p<0.001$ ) oder zwischen Nichtrauchern und Rauchern ( $p<0.001$ ), dagegen zeigte die Gruppe der Passiv-Raucher im Vergleich zu der Gruppe der Nichtraucher keinen Unterschied ( $p=0.84$ ). Keine Korrelation konnte zwischen Anzahl der gerauchten Zigaretten und Höhe der Cotininspiegel gefunden werden.

4-ABP-Addukt eignen sich zur Bestimmung von Tabakrauchbelastungen, allerdings mit der Einschränkung, daß hier eine unvermeidbare Hintergrundbelastung bei jedem Individuum vorhanden ist. Dagegen ist Cotinin nur als Kurzzeitmarker geeignet, um zwischen Rauchern und Nichtrauchern oder Passiv-Rauchern zu unterscheiden.

Die Ergebnisse belegen, daß Acrylnitril als sensitiver und spezifischer Marker für Passivrauchbelastung eingesetzt werden kann, um niedrige und auch länger zurückliegende Tabakrauchbelastungen zu bestimmen

## Summary

The project has identified an universal, sensitive and specific marker of tobacco smoke exposure, which is suitable to determine a passive smoke exposure in persons. For tobacco smoke 4-aminobiphenyl and cotinine are known as marker of exposure. In this study, additional to the both two markers, the N-terminal valin adduct of acrylonitrile, available in a high extent in tobacco smoke, was determined in smokers, nonsmokers and passive smokers as new marker.

During June 2002- February 2003, 262 persons were asked at the ENT-department of the University of Würzburg to complete a questionnaire and to give a blood sample. 31 Patients were classified as passive smokers, 102 as smokers and 103 as non-smokers.

The N-cyanoethyl valin adduct levels were significantly different in all groups, smokers (n=19, mean:  $372\pm 242$  pmol/g) nonsmokers (n=14, mean:  $45\pm 62$  pmol/g,  $p=0.00002$ ) and passive smokers (n=15, mean:  $174\pm 121$  pmol/g,  $p=0.007$ ). The difference between the group of nonsmokers and passive smokers was highly significant ( $p=0.001$ ). External exposure determined as number of cigarettes correlates with the internal exposure in smokers as well as passive smokers.

4-Aminobiphenyl hemoglobin adducts showed different adduct levels between the groups: smokers (n=67, mean:  $175\pm 103$  pg/g), nonsmokers (n=63, mean:  $51\pm 28$  pg/g,  $p<0.0001$ ), passive smokers (n=28, mean:  $66\pm 34$  pg/g,  $p<0.0001$ ). Compared to acrylonitrile the difference between nonsmokers and passive smokers was lower.

Both protein adducts were related to tobacco smoke expressed by the correlation of the adduct levels in 18 smokers ( $r=0.43$ ,  $p=0.05$ ) as well as 14 passive smokers ( $r=0.73$ ,  $p=0.002$ ).

Cotinine plasma concentrations were determined in 94 non-smokers, 31 passive smokers and 89 smokers. Levels above detection limit were found in 7% of the non-smokers, 13% of the passive smokers and 89% of the smokers (median: 290 ng/ml plasma). A significant difference in the concentrations of plasma cotinine was seen between smokers and non-smokers ( $p<0.001$ ) or passive-smokers ( $p<0.001$ ), but not between passive smokers and non-smokers ( $p=0.84$ ). No correlation was found between number of cigarettes and amount of cotinine in smokers. The results indicate the suitability of cotinine as short time marker for smoking and non-smoking or passive smoking, but not for non-smoking and passive smoking. 4-Aminobiphenyl hemoglobin adducts can be used for determination of passive smoking, but the unavoidable background has to be regarded coming from other sources as tobacco smoking.

In summary, acrylonitrile is the most suitable, sensitive and specific marker of exposure to passive smoking as shown by the results of this study.