

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

Untersuchungen zur Karzinogenese im Oropharynx
unter Berücksichtigung exogener und endogener Risikofaktoren

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

vorgelegt von

Sonja Christine Jaiser

aus Stuttgart

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. U. Harréus

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Thomas Mussack
Priv. Doz. Dr. Andreas Jung
Prof. Dr. Dennis Nowak

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2008

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	4
1.1 Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich	4
1.2 Das Oropharynxkarzinom	4
1.3 Anatomie des Oropharynx	5
1.4 DNA-Schädigung und Kanzerogenese	6
1.5 Mutagensensitivität	10
1.6 Reparaturkapazität	10
1.7 Fremdstoffe	11
1.7.1 Polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH)	11
1.7.2 N-Nitrosoverbindungen	12
1.8 Problemstellung und Ziele	14
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Patientenkollektiv	15
2.1.1 Anamnese der Patienten	15
2.1.2 Spender oropharyngealer Epithelien mit Oropharynxkarzinom	15
2.1.3 Spender oropharyngealer Epithelien ohne Oropharynxkarzinom	16
2.1.4 Spender der Lymphozyten	16
2.2 Zellseparation, Fremdstoffexposition	16
2.2.1 Gewinnung und Präparation der Gewebefragmente	16
2.2.2 Gewinnung der Lymphozyten	17
2.2.3 Untersuchungen an Schleimhautzellen	18
2.2.4 Untersuchungen an Lymphozyten	19
2.3 Messung der Mutagensensitivität	20
2.4 DNA-Reparatur	20
2.4.1 DNA-Reparatur von Schleimhautzellen	20
2.4.2 DNA-Reparatur von Lymphozyten	21
2.4.3 Messung der DNA-Reparaturkapazität	22
2.5 Übersicht des Versuchsaufbaus	23
2.6 Materialien	24
2.6.1 Chemikalien und Reagenzien	24
2.6.2 Medien und Zusätze	24
2.6.3 Enzyme	25
2.6.4 Testsubstanzen	25
2.6.5 Lösungen, Zellisolierung, Agarose, Puffer	25
2.6.6 Verbrauchsmaterialien	28

2.6.7 Geräte	29
2.7 Testverfahren	30
2.7.1 Die Mikrogelelektrophorese (MGE), Comet Assay	30
2.7.2 Der Comet Assay als Nachweismethode für DNA-Schädigung	31
2.7.3 Elektrophoretische Auftrennung der DNA	33
2.7.4 Digitale Analyse der DNA-Migration	33
2.8 Datenanalyse und Statistik	34
3. ERGEBNISSE	35
3.1 Genotoxizität von Umweltstoffen an humanem Gewebe	36
3.1.1 Genotoxische Wirkung von DMSO (Negativkontrolle) und N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin MNNG (Positivkontrolle) auf oropharyngeale Schleimhautzellen und Lymphozyten	37
3.1.2 Genotoxische Wirkung der Testsubstanzen B[a]P, BPDE, NNN und NNK auf oropharyngeale Schleimhautzellen und Lymphozyten	40
3.2 Messung endogener Risikomarker an humanen Schleimhautzellen des Oropharynx und Lymphozyten	45
3.2.1 Mutagensensitivität	45
3.2.2 DNA-Reparatur	46
3.2.3 DNA-Reparaturkapazität	47
3.2.3.1 DNA-Reparaturkapazität von Patienten mit und ohne Karzinom an oropharyngealen Schleimhautzellen	47
3.2.3.2 DNA-Reparaturkapazität von Tumorpatienten	48
3.2.3.3 DNA-Reparaturkapazität von tumorfreien Spendern	49
3.2.3.4 DNA-Reparaturkapazität von Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom an Lymphozyten	50
3.2.3.5 DNA-Reparaturkapazität der Schleimhautzellen von Tumorpatienten bei Konsum von <63g bzw. >63g Alkohol/d	51
4. DISKUSSION	53
4.1 Auswahl des Spenderkollektivs	53
4.1.1 Patienten mit Oropharynxkarzinom als Spender von Schleimhautzellen des Oropharynx	53
4.1.2 Patienten als tumorfreie Spender von Schleimhautzellen des Oropharynx	54
4.1.3 Spender der Lymphozyten	55
4.2 Diskussion der Methodik	55
4.3 Genotoxizität von Umweltstoffen als exogene Risikofaktoren	56
4.3.1 Genotoxizität polyzyklisch aromatischer Kohlenwasserstoffe	56
4.3.2 Genotoxizität von Nitrosaminen	57
4.4 Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität als endogener Risikofaktor	59
4.4.1 Mutagensensitivität	59
4.5 DNA-Reparatur	60

4.6 DNA-Reparaturkapazität	61
4.6.1 DNA-Reparaturkapazität von Schleimhautzellen	61
4.6.2 DNA-Reparaturkapazität von Lymphozyten	62
5. ZUSAMMENFASSUNG	64
6. LITERATUR	66
7. ANHANG	77
7.1 Anamnesen der Probenspender	77
7.2 Verwendete Abkürzungen	80
7.3 Abbildungsverzeichnis	81
7.4 Fragebogen für Patienten	82
7.5 Lebenslauf	86
7.6 Danksagung	87

1. Einleitung

1.1 Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich

Basierend auf den Zahlen des Krebsregisters des Saarlandes und des Tumorzentrums München machten die Malignome des Kopf-Hals-Bereichs 1998 einen Anteil von 6,3% aller Krebserkrankungen in Deutschland aus. Die rohe Mortalitätsrate bezogen auf 100.000 der Bevölkerung lag bei 15,5. Dabei stieg die Mortalitätsrate für Kopf-Hals-Malignome in den vergangenen 20 Jahren auf ca. das dreifache, was bei keiner anderen Krebserkrankung zu verzeichnen war.

1.2 Das Oropharynxkarzinom

Circa 90% aller Tumore des oberen Aerodigestivtraktes sind Plattenepithelkarzinome. Das Oropharynxkarzinom ist das zweithäufigste Karzinom nach dem Larynxkarzinom und stellt 10% aller Neoplasien im HNO-Bereich. Die Inzidenz der Oropharynxkarzinome liegt derzeit bei 0,5-2/100.000 Einwohner in Deutschland. In den 60-90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts kam es durch den gesteigerten Tabak- und Alkoholkonsum dieser Zeit zu einem starken Anstieg der Inzidenz, die in den letzten Jahren weitgehend konstant blieb. Der Häufigkeitsgipfel des Oropharynxkarzinomes liegt im 6.-7. Lebensjahrzehnt, wobei 3-4 mal mehr Männer als Frauen erkranken [Schlesinger-Raab et al., 2003].

Das Oropharynxkarzinom hat eine multifaktorielle Genese [Rosenquist, 2005, Hammerstedt et al., 2006, Dietz et al., 1999]. Die bedeutendsten Risikofaktoren sind der Tabakrauch und der Alkoholkonsum [Vlajinac et al., 2006, Auperin et al., 2005, Seitz et al., 1998]. Ihre Wirkung ist dosisabhängig und multiplikativ [Blot et al., 1988]. Tabakrauch gilt laut IARC (*International Agency for Research on Cancer*) als Klasse 1 Karzinogene d.h. „sicher krebserzeugend bei Menschen“. Laut Maier [1992] erhöht sich das Risiko ein Oropharynxkarzinom zu entwickeln bei einem Konsum von >75g/d Ethanol um den Faktor 12,5. Durch die Inhalation und Ingestion von Tabakrauch und Alkohol kommt der gesamte Rachen mit ihnen in Kontakt, was die Theorie einer Feldkarzinogenese in diesem Bereich verständlich macht [Jaloszynski et al., 2003]. Darüber hinaus kann bei Rauchern eine zusätzliche Exposition gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) zu einer überadditiven Risikoerhöhung für Karzinome im oberen Aerodigestivtrakt führen [Heidelberger Fall-Kontroll-Studie, 1999].

1.3 Anatomie des Oropharynx

Der Pharynx gliedert sich in drei Ebenen (Abb.1): Nasopharynx, Oropharynx und Hypopharynx. Der Oropharynx erstreckt sich vom Unterrand des Gaumensegels, dem Isthmus faucium, bis zum Oberrand des Kehldeckels. Dies beinhaltet die linguale Epiglottisfläche, die Valleculae epiglotticae, den Zungengrund mit den Tonsillae linguales, beidseits den Arcus palatoglossus, die Tonsilla palatina, den Arcus palatopharyngeus, darüber die Fossa supratonsillaris sowie die mesopharyngealen Rachenanteile.

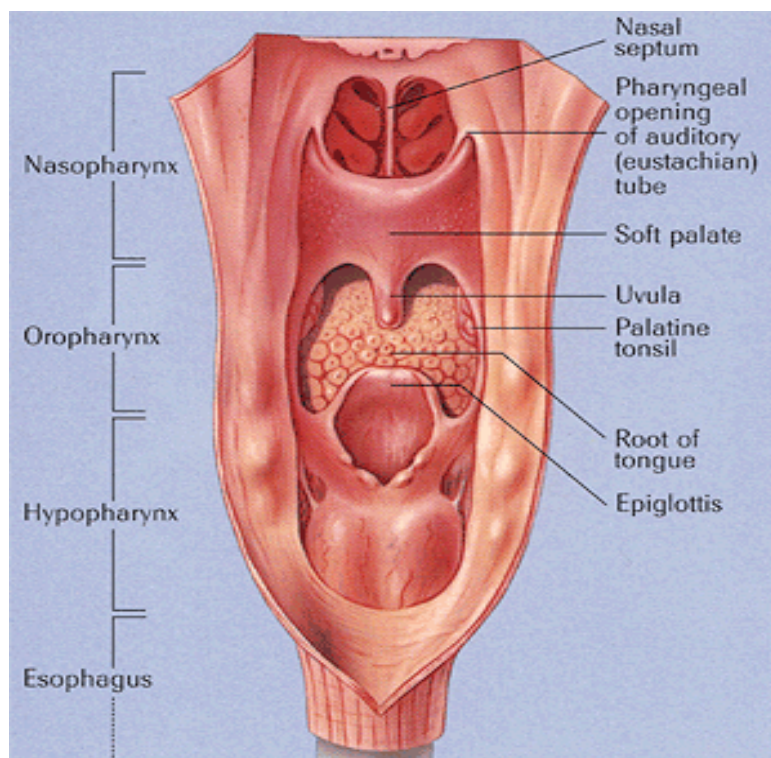


Image made available by a generous grant from Bristol-Myers Squibb

Abb. 1: Darstellung des Pharynx von dorsal in drei Ebenen.

1.4 DNA-Schädigung und Kanzerogenese

Überleben bedeutet für einen Organismus einerseits Zellteilung bei Bedarf, andererseits Zelluntergang durch DNA-Schädigung, Überalterung oder Apoptose. Bei der Zellteilung kommt es auf exakte Weitergabe der Erbsubstanz Desoxyribonukleinsäure (DNA) von Zellgeneration zu Zellgeneration an.

Der Mensch ist durch die Aufnahme von Nahrung und Genussmitteln wie z.B. Tabak und Alkohol sowie durch die Einflüsse aus Umwelt und Arbeitswelt ständig Stoffen ausgesetzt, die DNA-Schäden mit nachfolgenden Mutationen, d.h. Veränderungen seiner Erbsubstanz hervorrufen können. Mutationen entstehen auch bei der Verdopplung der DNA vor der Zellteilung und bei der Reparatur spontan entstandener Veränderungen der DNA. Die Mutationsrate liegt normalerweise bei einer Wahrscheinlichkeit von 10^8 bis 10^5 sehr niedrig. Das gegenwärtige Modell der Kanzerogenese, d.h. der Krebsentstehung (Abb. 2) ist ein mehrstufiger Mutations- und Selektionsprozess. Krebs kann bereits durch die Entartung einer einzigen Zelle, welche sich ungehindert teilt, entstehen.

Stufen der Krebsentstehung

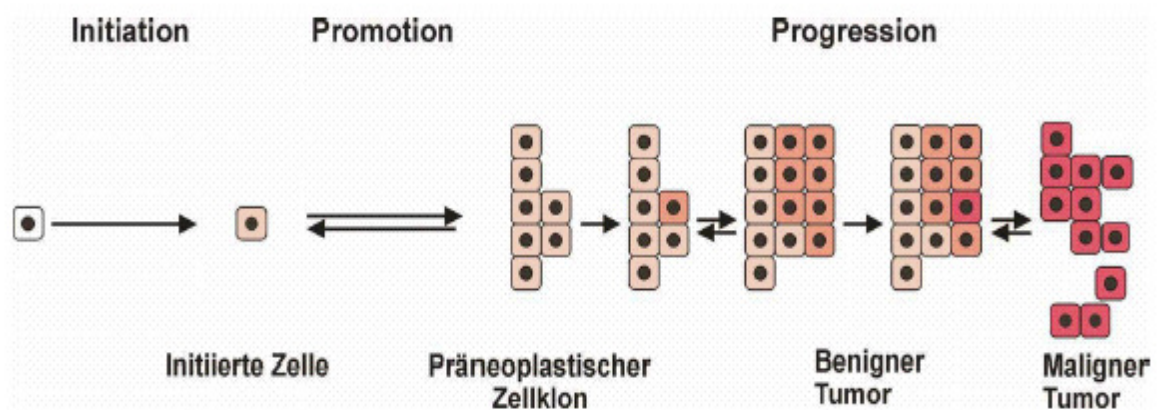


Abb. 2: Mehrstufenhypothese der Krebsentstehung

Quelle: Prof. Dr. W. Parzefall, Institut für Krebsforschung, Universität Wien

1. Initiation:

Am Beginn der Krebsentstehung steht das Einwirken von mutagenen bzw. genotoxischen Substanzen. Diese treten in Wechselwirkung mit der DNA des Zellkerns und können zu Mutationen führen. Bei mangelhafter Reparatur können diese Mutationen als irreversibler Schaden erhalten bleiben.

2. Promotion:

Unter Tumorpromotion versteht man den Prozess der Beschleunigung und Verstärkung der vorausgegangenen Initiation. Durch Promotoren (unspezifische Faktoren) und Einwirken von Karzinogenen kann diese Zeit verkürzt werden. Dieser Prozess kann Monate bis Jahre dauern. Es kommt zur Proliferation der initiierten Zellen und Bildung von präneoplastischen Zellpopulationen mit identischen Mutationen. Initiation und Promotion sind nicht unabhängig voneinander zu betrachten, da die initiierte Zelle sich in Gegenwart eines Promotors stärker vermehren kann als eine normale Zelle [Schulte-Herrmann et al., 1994].

3. Progression:

Progression bezeichnet den Übergang eines benignen, d.h. gutartigen, in einen malignen, d.h. bösartigen Tumor. Die zunehmende genetische Instabilität der Tumorzellen ist charakteristisch für diese Phase. Dadurch entsteht eine höhere Wahrscheinlichkeit der Ausprägung von Tumorheterogenitäten und der Tumorprogression unter Ausbildung metastasierender Subklone [Bosch, 1991].

Trichopoulos [1996] berichtete, dass ca. 25% aller Mutationen in Körper endogen bedingt sind. Verursacht werden diese Mutationen z.B. durch freie Radikale, die im Zellstoffwechsel gebildet werden [Higuchi, 2003], durch Polymorphismen von Enzymen z.B. Cytochrom P450 [Gronau et al., 2003] und durch p53-Genmutationen [Miyazaki et al., 2002, Agirre et al., 2003, Sarasin, 2003]. Diese Veränderungen beeinträchtigen die individuelle Reparaturkapazität, Mutagensensitivität und damit die Suszeptibilität, d.h. die Empfindlichkeit gegenüber kanzerogenen Stoffen. Die verbleibenden 75% der Mutationen sind auf exogene Ursachen zurückzuführen. Als Schwerpunkte im Kopf-Hals-Bereich werden hier Tabakkonsum mit ca. 30% und falsche Ernährungsgewohnheiten zu ca. 30% angenommen [Lagiou et al., 2005, Levi, 1999]. Mutationen werden ebenso durch ionisierende Strahlung [Vilenchik et al., 2003], Viren [Hafkamp et al., 2003, Herrero, 2003] sowie in Umwelt und Arbeitsumgebung vorhandene chemische Substanzen verursacht.

Belegt werden diese Zahlen vorwiegend durch epidemiologische Studien und experimentelle Untersuchungen an Mikroorganismen und Tierversuchen [Wogan et al., 2004, Übersicht in Maier und Sennewald, 1994].

Zur Umwandlung einer normalen in eine maligne Zelle reicht also eine Mutation nicht aus, es müssen mehrere genetische Veränderungen zusammenkommen. Als Beispiele wären zu nennen, die Aktivierung eines Protoonkogens, d.h. Vorläufer eines zellulären Onkogens, die Inaktivierung von sogenannten Tumor-Suppressorgenen und die Daueraktivierung von membranassoziierten ras-Proteinen, die nach Bindung an einen Wachstumsfaktor nicht mehr inaktiviert werden können und zur ungehinderten Zellteilung führen. Auf lange Sicht können diese Veränderungen zu Selektionsvorteilen mit verstärkter Proliferationstendenz und verringertem Differenzierungsgrad des Zellklons führen (Abb. 3). Es gibt verschiedene Arten von DNA-Schäden, welche abhängig vom verantwortlichen Fremdstoff entstehen können:

1. Punktmutationen,

Transversionen (Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase),

Transitionen (Austausch einer Purinbase gegen eine andere Purinbase),

Deletionen (Basenverlust),

Insertionen (Einfügen einzelner Basen)

2. Amplifikation (Vervielfältigung einer Basensequenz)

3. Translokation (Umlagerung eines Bruchstücks eines Chromosoms auf ein anderes Chromosom)

4. Einzel- und Doppelstrangbrüche.

Die vorliegende Arbeit befasst sich unter anderem mit der Untersuchung von DNA-Strangbrüchen und deren Reparatur.

Wichtige Schritte in der chemischen Kanzerogenese

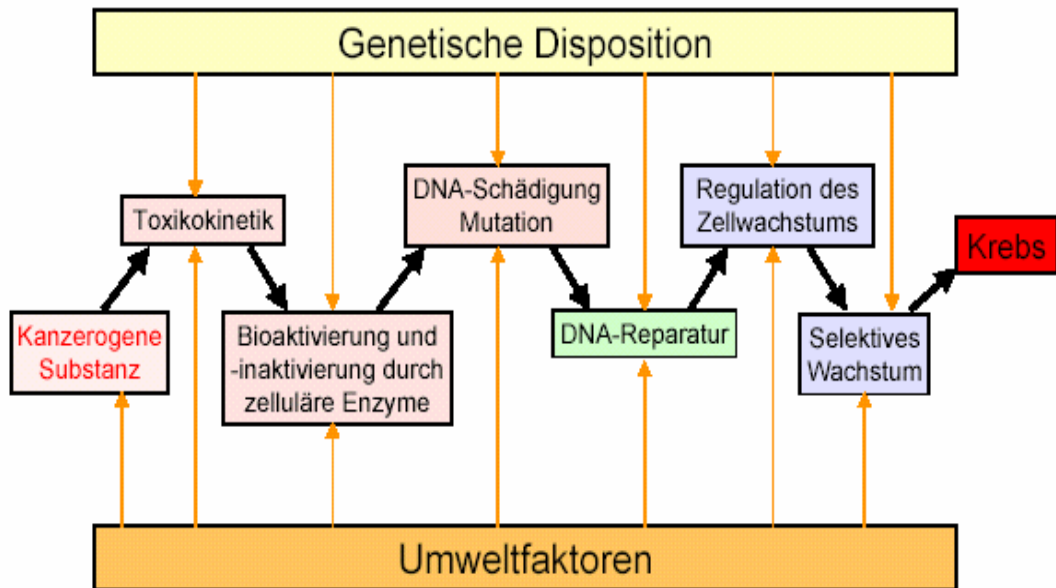


Abb. 3: Krebsentstehung anhand der genetischen Disposition und Umweltfaktoren

Quelle: Prof. Dr. W. Parzefall, Institut für Krebsforschung, Universität Wien

Karzinogene werden in Tumorinitiatoren, welche einen Tumor auslösen können und Tumorpromotoren wie etwa Alkohol, welche proliferationsfördernd wirken können, eingeteilt. Bei Alkoholkonsum muss zwischen chronischem und akutem Konsum unterschieden werden. Die akute Exposition führt meist zu reversiblen Strangbrüchen der DNA. Chronischer Alkoholabusus kann hingegen zu verminderter Zellüberlebensfähigkeit führen [Lamarche et al., 2003].

Entscheidend für die Wirkung des jeweiligen Stoffes ist seine primäre Toxizität sowie die Menge und Dauer der Aufnahme. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stoffen handelt es sich um Präkanzerogene, d.h. diese Stoffe bedürfen zuerst einer entsprechenden stoffwechselbedingten Umwandlung, um karzinogen wirken zu können. Bei dieser Umwandlung unterscheidet man eine Phase I und eine Phase II Reaktion. In der Phase I werden lipophile Stoffe in solche mit höherer Reagibilität umgewandelt. Dies geschieht über Oxidation, etwa von aromatischen Kohlenwasserstoffen zu reaktionsfreudigen Epoxiden, oder über Reduktion z.B. von aromatischen Nitroverbindungen. Dies kann sowohl zu einer „Entgiftung“ wie auch einer „Giftung“ der Stoffe führen. In der Phase II Reaktion werden die Produkte dann an hydrophile körpereigene Substrate gekoppelt und können über Niere oder Galle ausgeschieden werden.

1.5 Mutagensensitivität

Bereits seit 1965 findet der Begriff der Mutagensensitivität, d.h. der DNA-Empfindlichkeit gegenüber Schadstoffen, in der wissenschaftlichen Literatur Anwendung. Im Zusammenhang mit der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen wurde die Mutagensensitivität des öfteren als endogenen Risikomarker beschrieben [Cloos et al., 1996]. So spielt neben der Exposition gegenüber Kanzerogenen auch die individuelle Mutagensensitivität eine bedeutende Rolle in der Risikoabschätzung für Krebserkrankungen [Szekely et al., 2005, Yu et al., 1999]. Sie kann gemessen werden in der Anzahl der DNA- bzw. Chromosomenstrangbrüche pro Zelle nach Behandlung mit Fremdstoffen. Ist die Mutagensensitivität erhöht, so wird ein erhöhtes Krebsrisiko vermutet, was im Falle einer beruflichen Exposition z.B. gegenüber Nitrosaminen oder polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen von Bedeutung ist. Die Mutagensensitivität ist ein individueller Faktor, abhängig von der Aktivierung von Karzinogenen [Degawa et al., 1994] oder der Effizienz der Detoxifikation u.a. oxidativer Radikale [Cerutti et al., 1994]. Untersuchungen der individuellen Mutagensensitivität und damit Identifizierung von Personengruppen mit erhöhtem Risiko der Krebsentstehung könnten einen Beitrag zur Tumorprävention leisten.

1.6 Reparaturkapazität

Ein weiterer wichtiger Biomarker im Rahmen der Krebsentwicklung ist die individuelle DNA-Reparaturkapazität [Bohr, 2002]. Effektive DNA-Reparatur schützt vor Auswirkungen genotoxischer Stoffe, während Polymorphismen der Reparaturenzyme die Mutationsrate und damit das Risiko Krebs zu entwickeln erhöhen können [Berwick und Vineis, 2000]. Ohne die intakte Aktivität der Enzyme der Cytochrom P450 Familie [Hong und Yang, 1997, Lang et al., 1999], der Glutathion-S-Transferasen [Knudsen et al., 2001] und der Alkoholdehydrogenase 3 [Coutelle et al., 1997] uvm. kann eine Zelle nicht überleben. Die Reparaturkapazität stellt ebenso einen endogene Risikofaktoren in der Krebsentstehung dar.

1.7 Fremdstoffe

1.7.1 Polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH)

PAH sind eine Gruppe ringförmiger Kohlenwasserstoffverbindungen, deren Molekülgerüst aus mehreren miteinander verbundenen Benzolringen besteht. Benzo[a]pyren (B[a]P), ihr Hauptvertreter, wird laut International Agency for Research on Cancer [IARC, 2001] in die Klasse 2A der krebserzeugenden Stoffe eingeteilt und ist somit „wahrscheinlich für den Menschen karzinogen“. PAH entstehen bei der unvollständigen Verbrennung organischen Materials und sind gering wasserlöslich. Mineralöl, Kohle und Abgase aus der Treibstoffverbrennung sind die Hauptemissionsquellen, sie werden aber auch beim Rauchen von Tabak [Smith et al., 2000], beim Grillen, Braten und Räuchern von Fleisch gebildet [Kazerouni et al., 2001]. In Deutschland gelten zur Zeit für B[a]P die Grenzwerte von 1µg/kg für Lebensmittel, 0,0002mg/l für Trinkwasser und von <5ng/m³ für Luft. In Raucherhaushalten kann es zu Höchstwerten von 400ng/m³ Luft kommen. Über die Nahrung nehmen wir 20-500ng/d zu uns. Die technische Richtwertkonzentration (TRK-Wert) liegt bei 0,002mg/m³ [BArbBl. 10/89 S.58].

Die metabolische Aktivierung von B[a]P erfolgt über verschiedene Oxidationen durch die Cytochrom P450 Enzyme CYP 1A1, CYP 1B1 und CYP 2E1, welche durch die Anwesenheit von PAH induziert werden [Degawa et al., 1994]. Über Benzpyren-dihydrodiol-Zwischenprodukte entsteht durch die CYP-Enzyme, die Prostaglandin-H-Synthase und die Myeloperoxidase das stark elektrophile und reaktive Epoxid (+)-anti-BP-7,8-dihydrodiol-9,10-oxid (BPDE).

In der vorliegenden Studie wurde Benzo[a]pyren und sein aktiver Metabolit BPDE untersucht. Als wichtige Zielstruktur für die Interaktion mit der DNA gelten hier Sequenzen, die Protoonkogene und Tumorsuppressorgene repräsentieren. BPDE bindet bevorzugt an Guanidinreste und induziert hier Transversionsmutationen zu Thymin [Puisieux et al., 1991, Liang et al., 2003, Yu et al., 2002]. Als anerkannte ubiquitäre Karzinogene sind die polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffe gut geeignet zur Testung der Mutagensensitivität und Reparaturkapazität an Oropharynxmukosa und Lymphozyten des Menschen.

1.7.2 N-Nitrosoverbindungen

N-Nitrosoverbindungen werden laut Klassifikation der IARC [1998] in die Klasse 2A der krebserzeugenden Stoffe eingeteilt, auch sie sind „wahrscheinlich krebserzeugend bei Menschen“. Verbreitung finden diese leicht flüchtigen Stoffe in der Gummiindustrie [Brown, 1999], sowie der metall- und lederverarbeitenden Industrie. Allgemein sind diese Xenobiotika auch in Lebensmitteln z.B. Pökelfleisch [Knekt et al., 1999], in Kosmetika [Eisenbrand et al., 1991], in Tabakrauch [Abdel-Rahman et al., 2000] und in Medikamenten enthalten. Die tägliche Aufnahme von Nitrosaminen liegt im Bevölkerungsdurchschnitt bei 0,4-0,5µg/d; der Rauch einer Zigarette enthält 0,75µg. Charakteristisch für Nitrosamine ist, dass sie aus der Umwelt aufgenommen sowie im Organismus selbst gebildet werden können. Dies erfolgt über die Aufnahme nitrosierbarer Amine zusammen mit nitrosierenden Stoffen, wie z.B. Nitrit. Nitrat und Nitrit werden über Trinkwasser sowie über tierische (Pökelfleisch) und pflanzliche Lebensmittel aufgenommen. Nitrate werden durch die physiologische Normalflora der Mundhöhle zu Nitrit reduziert. Im sauren Milieu des Magens und bei Anwesenheit nitrosierbarer Aminosubstrate können N-Nitrosoverbindungen gebildet werden. Außerdem hängt dies mit dem Vorhandensein von Katalysatoren, wie etwa Formaldehyd, Lecithin oder Inhibitoren dieser Reaktionen, wie Vitamin C oder E ab. 90% aller N-Nitrosoverbindungen wirken kanzerogen, was in Tierversuchen nachgewiesen werden konnte. Sie können Membranen leicht durchdringen, im Körper aufgenommen werden und in der Mundhöhle, dem Ösophagus und der Lunge Krebs verursachen [Du et al., 2000, Hecht, 1999].

Die in dieser Studie untersuchten Nitrosamine sind N-Nitrosornicotin (NNN), 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) und N-Nitrosodiethylamin (NDEA). NNN wird laut IARC [1987] in die Klasse 2B der Karzinogene eingeteilt, d.h. es wirkt lediglich „möglicherweise bei Menschen karzinogen“. Bisher sind keine ausreichenden Daten verfügbar um die Karzinogenität von NNN beim Menschen zu belegen, die vorliegenden Untersuchungen sollen einen Beitrag hierzu leisten. Enthalten ist dieses Nicotinderivat hauptsächlich in Tabakrauch [Hecht, 1999] mit ca. 200-3000ng im Hauptstrom von filterlosen Zigaretten.

NNK, ebenfalls ein Tabakinhaltsstoff [Hecht, 1988 bzw. 1999] der Klasse 2B [IARC], stellte sich in Tierversuchen als stärker kanzerogen heraus als NNN [Koppang et al., 1997]. Auch für NNK sind bisher nicht ausreichende Daten verfügbar um seine humane Kanzerogenität zu beweisen. In der vorliegenden Studie wurde die Mutagensensitivität von NNK direkt an humanen Schleimhautzellen und Lymphozyten getestet.

NDEA ist laut IARC [1998] ein Klasse 2A Karzinogen und somit „wahrscheinlich krebserzeugend bei Menschen“. Die Exposition gegenüber NDEA hat einen lokalen und systemischen karzinogenen Effekt. 20-70ng NDEA sind z.B. im Hauptstrom filterloser Zigaretten enthalten.

Das als Positivkontrolle verwendete N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroguanidine (MNNG) ist ein Klasse 2A Karzinogen und „wahrscheinlich krebserzeugend bei Menschen“ [IARC, 1998]. MNNG ist ein direktes Karzinogen, es benötigt keine Aktivierung und reagiert direkt alkylierend mit zellulären Komponenten wie DNA und RNA. Bei *in vitro* Versuchen induziert es Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausche und DNA-Strangbrüche. Reparaturversuche mit Nitrosaminen in der Konstellation gematchter Gruppen von Tumor- und Kontrollpatienten an humanen Schleimhautzellen und Lymphozyten existieren bisher nicht.

1.8 Problemstellung und Ziele

Schädigende Einflüsse aus der Umwelt und Arbeitswelt tragen zur Krebsentstehung des Oropharynx bei. Prävention maligner Erkrankungen ist möglich, wenn exogene Ursachen bekannt und ihre Wirkungsweisen erforscht und verstanden werden. Des Weiteren gilt es, endogene Ursachen der Krebsentstehung wie individuelle Mutagensensitivität und Reparaturkapazitäten genauer zu verstehen. Fragen nach der Ätiologie, der Prävention und der Früherkennung von Karzinomen des Oropharynx und Fragen zu DNA-schädigenden Auswirkungen bestimmter Nitrosamine (NDEA, NNN, NNK) und PAH (B[a]P, BPDE) für den Menschen standen hinter diesen Untersuchungen. Die alkalische Mikrogelelektrophorese (Comet Assay), als etabliertes Kurzzeittestverfahren für DNA-Schädigungen, wurde an einer nach Alter und Geschlecht gematchten Fall-Kontroll-Studie mit jeweils 23 männlichen Tumor- und Kontrollpatienten eingesetzt. Untersucht wurden Mukosazellen des Oropharynx und Lymphozyten des Menschen mit folgenden Fragestellungen:

- Sind Unterschiede in der Mutagensensitivität bei Patienten mit und Patienten ohne Oropharynxkarzinom vorhanden, und können diese mit dem Comet Assay gezeigt werden?
- Sind Unterschiede in der Reparaturkapazität von Patienten mit und Patienten ohne Oropharynxkarzinom nachweisbar?
- Wie vergleichbar ist die genotoxische Empfindlichkeit humaner Schleimhautzellen mit jener von peripheren Lymphozyten?
- Können Rückschlüsse von den Reparaturkapazitäten peripherer Lymphozyten auf die Reparaturkapazitäten von Mukosazellen des Oropharynx der jeweiligen Probanden gezogen werden?
- Wie wirken sich Alkohol- und Tabakkonsum auf die individuelle DNA-Reparaturkapazität des Menschen aus?
- Kann der Nachweis DNA-schädigender Auswirkungen einerseits auf humane Lymphozyten und andererseits auf Schleimhautzellen des Oropharynx als Zielgewebe der humanen Kopf-Hals-Karzinogenese erbracht werden?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die Probenspender von Schleimhautgewebe und Blut waren Patienten der Klinik und Poliklinik der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München. Das Patientenkollektiv wurde rekrutiert aus der „Studie zur Mutagensensitivität und DNA-Reparatur von Patienten mit malignen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich und tumorfreien Patienten unter Berücksichtigung endogener und exogener Risikofaktoren“, Projekt Nr. 073/00 der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München. Alle Patienten wurden nach den Vorgaben des Antrages mündlich und schriftlich über die wissenschaftliche Verwendung ihrer Proben aufgeklärt. Systemerkrankungen und Infektionserkrankungen der Patienten, ausgenommen der Tumorerkrankung der untersuchten Gruppe waren Ausschlusskriterien.

2.1.1 Anamnese der Patienten

Jeder Patient füllte einen eigens für die Studie konzipierten Fragebogen (siehe Anhang 7.4) aus. Mit diesem konnten individuelle Vorbelastungen gegenüber Fremdstoffen durch die Umwelt und Arbeitswelt erhoben werden. Darüber hinaus wurde der persönliche Alkohol- und Tabakkonsum abgefragt. Der Alkoholkonsum wurde in g/Tag umgerechnet. Der Ethanolgehalt wurde für Bier mit 25g/l, für Wein mit 88g/l und für Spirituosen mit 400g/l als Grundlage verwendet. Der Tabakkonsum wurde für jeden Patienten in pack years berechnet. Hierzu wurde die Anzahl der Jahre, in denen geraucht wurde, mit der Anzahl der täglich konsumierten Zigarettenschachteln multipliziert (eine Schachtel = 20 Zigaretten). Körpergröße und Gewicht wurden zur Errechnung des individuellen “Body-Mass-Indexes“ (BMI) erfragt [Kabat et al., 1994].

Der BMI wurde nach der Formel: **Körpergewicht / Körpergröße² [kg/ m²]** errechnet.

2.1.2 Spender oropharyngealer Epithelien mit Oropharynxkarzinom

Es wurden 23 Männer im Alter zwischen 40 und 60 Jahren (Durchschnittsalter 50,1 Jahre) untersucht. Einschlusskriterien waren eine positive Alkohol- und Tabakanamnese und ein histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom im Oropharynxbereich. Es wurden Proben verwendet, welche im Rahmen von Tumoroperationen anfielen, ohne dass zusätzliches

Gewebe entnommen werden musste. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst tumorferne und tumorfreie Mukosa verwendet wurde.

2.1.3 Spender oropharyngealer Epithelien ohne Oropharynxkarzinom

Die Gruppe bestand aus 23 Männern im Alter zwischen 32 und 61 Jahren (Durchschnittsalter 48,1 Jahre) mit einer positiven Alkohol- und Tabakanamnese. Es wurden Proben verwendet, die im Rahmen einer Mandeloperation, aufgrund chronischer Tonsillitiden bzw. im Zusammenhang mit Hyperplasien bei obstruktiven Schlafstörungen entfernt wurden.

2.1.4 Spender der Lymphozyten

Jedem der unter 2.1.2 und 2.1.3 genannten Patienten, wurde im Rahmen der Operation 20ml heparinisiertes Vollblut entnommen. Hieraus erfolgte die sofortige Lymphozytenisolation für die weiteren Versuche.

2.2 Zellseparation, Fremdstoffexposition

2.2.1 Gewinnung und Präparation der Gewebefragmente

Der unmittelbare und lichtgeschützte Transport vom Operationssaal in das Labor erfolgte in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%). Daraufhin wurde die Schleimhaut unter sterilen Bedingungen zunächst makroskopisch von anhängenden Geweberesten und Blutbestandteilen getrennt.

Die Schleimhaut wurde einer einstündigen enzymatischen Verdauung bei 37°C im Schüttelwasserbad für die Einzelzellgewinnung zugeführt. Hierfür wurden 50mg Protease, 10mg Hyaluronidase und 10mg Kollagenase P in 10ml sterilfiltriertem Joklik Medium gelöst und mit der Schleimhautbiopsie inkubiert [Harréus et al., 1999, Pool-Zobel et al., 1992].

2.2.2 Gewinnung der Lymphozyten

20ml heparinisiertes Vollblut wurde von allen Probanden gewonnen. Das Vollblut wurde mit 9ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) unter sterilen Bedingungen auf 15ml Biocoll-Separationsmedium geschichtet und bei Raumtemperatur für 20 Minuten zentrifugiert (2000U/min, mit freiem Auslauf).

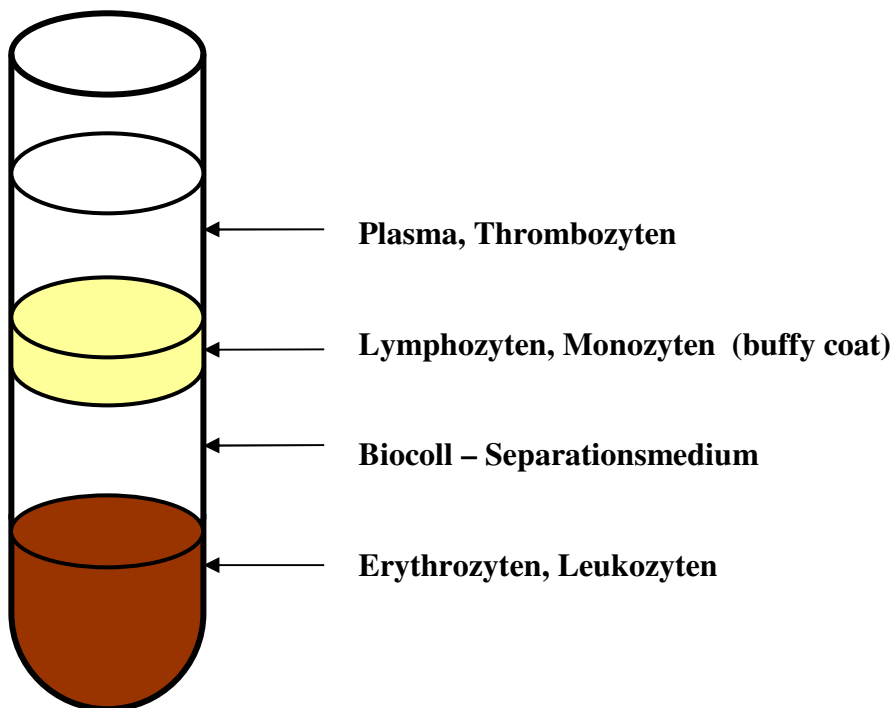


Abb. 4: Isolierung von Lymphozyten über Biocoll-Separationsmedium nach Zentrifugation.

Dabei bildeten sich verschiedene Schichten (Abb. 4). Die hierbei entstandene milchig-trübe Bande, der sogenannte „buffy coat“ aus Lymphozyten und Monozyten, wurde im Anschluss mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in 15ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Es wurde erneut 10 Minuten lang bei 2000U/min zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde, nach Dekantieren des Überstandes, mit 1ml fötalem Kälberserum (FCS) resuspendiert. Zur Bestimmung der Vitalität und Zellzahl wurde ein Aliquot der Lymphozytensuspension mit der gleichen Menge Trypanblau vermengt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Nun wurden Aliquots von jeweils 1×10^6 Zellen in 1ml Tieffriermedium, bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) in

Kryogefäße (Nalgene, Rochester, USA) gefüllt und in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter, der eine geregelte Temperaturabnahme von 1°C pro Stunde zulässt, im -80°C Gefrierschrank gelagert. Die Arbeitsgruppe um Schmezer zeigte 2001, dass die Kryokonservierung bis 12 Monate die Sensitivität der Lymphozyten nicht beeinträchtigt. Die Reproduzierbarkeit mit dem Comet Assay war gut.

2.2.3 Untersuchungen an Schleimhautzellen

Alle Arbeitsschritte erfolgten in langwelligem Rotlicht, um zusätzlichen DNA-Schäden durch UV-Strahlung vorzubeugen. Nach der enzymatischen Einzelzellgewinnung wurde das inkubierte Gewebe durch Zellstoff grobgefiltert, um größere Fragmente zu entfernen. Die Zellsuspension wurde nach Zugabe von 1ml Jokliklösung bei 400 Umdrehungen/min für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes und erneutem Resuspendieren der Zellen mit 1ml Joklik, versetzte man 50µl Zellsuspension mit der gleichen Menge Trypanblaulösung und füllte mit einem Tropfen des Gemisches eine Neubauer-Zählkammer. Hiermit folgte die Zellzählung und Vitalitätsprüfung, mittels Trypanblau-Ausschlusstest (0,4% Trypanblau) nach Phillips [1973]. Mit einem Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung wurde die Anzahl der vitalen (ungefärbten) und die der avitalen (blaugefärbten) Zellen sowie die Gesamtzahl der Zellen bestimmt gemäß der Formel: **Vitalität (%) = ungefärbte Zellen/Gesamtzahl x 100**

2.2.3.1 Fremdstoffinkubation

Pro Fremdstoff wurden jeweils 3 Ansätze mit je 1×10^5 Zellen in 100µl Jokliklösung nach Zugabe der folgenden Substanzen inkubiert:

- [166mM] Dimethylsulfoxid (Negativkontrolle)
- [1mM] Benzo[a]pyren (B[a]P)
- [9µM] Benzo[a]pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxid (BPDE)
- [10mM] N-Nitrosornicotin (NNN)
- [10mM] 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)
- [50mM] N-Nitrosodiethylamin (NDEA)
- [0,0035mM] N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) (Positivkontrolle).

Im Vorfeld wurden in unserem Labor Versuche zur Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve, der Genotoxizität und Zytotoxizität der Umweltstoffe durchgeführt. Die Inkubation erfolgte im Schüttelwasserbad bei 37°C für 60 Minuten. Das bei allen Proben als Lösungsmittel eingesetzte Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Negativkontrolle.

Im Anschluss an alle Inkubationen erfolgte eine zweite Vitalitätsprüfung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest, wie unter 2.2.3 beschrieben. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur und 400 Umdrehungen/min für 5 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Die Zellaliquots wurden in 75µl 0,7% Low-melting Agarose resuspendiert und auf mit 0,5% Normal-melting Agarose beschichteten Objektträgern, mit entlang der Längskante befindlicher Mattierung (Sonderanfertigung der Firma Langenbrinck), aufgetragen. Die Zellschicht wurde mit 85µl 0,7% Agarose gedeckt. Nach Entfernung des Deckglases folgte eine einstündige Lyse der Zell- und Kernmembranen bei 4°C im Kühlschrank. Hierfür stellte man die Objektträger vertikal in eine Färbekammer, die mit 100ml einer frisch angesetzten Lyselösung gefüllt war (2,5M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 1% N-Lauroylsarcosinsalz, 10mM Trishydroxymethylaminomethan, 1% Triton-X und 10% DMSO bei pH 10).

2.2.4 Untersuchungen an Lymphozyten

Zu 9ml PBS (4°C) wurde ein Aliquot der Lymphozyten direkt nach deren Auftauen zugegeben und anschließend für 10 Minuten mit 2000 Umdrehungen/min bei 4°C mit freiem Auslauf zentrifugiert. Dieser Vorgang war nötig, um das Tieffriermedium herauszuwaschen und einer Schädigung der Lymphozyten nach dem Auftauen vorzubeugen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet der Lymphozyten mit 1ml Medium (RPMI 1640 Medium+15% FCS) resuspendiert. Die Zellzählung und Vitalitätstestung erfolgte, wie für die Schleimhautzellen unter 2.2.3 beschrieben, mit dem Trypanblau-Ausschlusstest.

2.2.4.1 Fremdstoffinkubation

Es wurden pro Fremdstoff 3 Ansätze, mit je 1×10^5 Zellen in 100µl Medium, nach Zugabe von 900µl Medium, mit folgenden Substanzen inkubiert:

- [166mM] DMSO (Negativkontrolle)
- [0,5mM] B[a]P
- [9µM] BPDE

- [10mM] NNN
- [10mM] NNK
- [50mM] NDEA
- [0,035mM] MNNG (Positivkontrolle).

Die Inkubation erfolgte im Schüttelwasserbad bei 37°C für 60 Minuten. Nach der einstündigen Inkubation wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 2000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Zum Ausschluss zytotoxischer Effekte wurde auch hier ein Vitalitätstest mit Trypanblau, wie unter 2.2.3 beschrieben, durchgeführt.

Der Überstand wurde abpipettiert und die Lymphozytenaliquots in 75µl 0,7% Agarose aufgenommen und auf die mit einer Schicht 0,5% Agarose beschichteten Objektträger aufgebracht. Anschließend wurde die zweite Schicht mit je 85µl 0,7% Agarose aufgetragen. Es folgte eine einstündige Lyse der Zell- und Kernmembranen bei 4°C im Kühlschrank.

2.3 Messung der Mutagensensitivität

Die Mutagensensitivität, d.h. die individuelle Empfindlichkeit gegenüber einer Fremdstoffexposition, wurde an Zellen der nach Geschlecht, Alter, Tabak- und Alkoholkonsum gematchten Patientengruppen anhand von Inkubation mit Tabakinhaltstoffen untersucht. Exemplarisch wurde die Mutagensensitivität nach Inkubation der oropharyngealen Schleimhautzellen und Lymphozyten mit dem Nitrosamin NDEA im Ergebnisteil unter 3.2.1 dargestellt. Durch das Matching der Spender konnten wichtige auf das Ergebnis Einfluss nehmende Faktoren berücksichtigt werden. Es erfolgte die digitale Analyse der DNA-Schädigung.

2.4 DNA-Reparatur

2.4.1 DNA-Reparatur von Schleimhautzellen

Zur Testung der Reparaturkapazität von Schleimhautzellen wurden die Zellen zuerst über den Zeitraum von eine Stunde mit NDEA inkubiert. Um das Nitrosamin zu entfernen, wurden zwei Waschvorgänge mit jeweils 200µl Joklik vor der DNA-Reparatur durchgeführt, gefolgt von einer Zentrifugation bei Raumtemperatur und 400 Umdrehungen/min für jeweils 5 Minuten. Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Nach Zugabe von 200µl Joklik erfolgte die DNA-Reparatur für 15 Minuten bzw. 30 Minuten bei 37°C im

Schüttelwasserbad. Längere Reparaturintervalle bei 37°C wurden für Mukosazellen nicht gewährt, da sich bei Vorversuchen ansteigenden Werten in der Zytotoxizität zeigten.

Im Anschluss an die Reparatur fand eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 Umdrehungen/min statt. Darauf folgte die Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlusstest in einer Neubauer Zählkammer. Die Schleimhautzellen wurden in 75µl 0,7% Agarose aufgenommen und auf die vorbereiteten, mit 0,5% Agarose beschichteten Objektträger aufgebracht. Abschließend wurde die zweite Schicht mit je 85µl 0,7% Agarose aufgetragen. Nun folgte eine einstündige Lyse der Zell- und Kernmembranen bei 4°C im Kühlschrank.

2.4.2 DNA-Reparatur von Lymphozyten

Für die Testung der Reparaturkapazität der Lymphozyten wurden die Zellen zuerst mit NDEA inkubiert. Als Lösungsmittel und Negativkontrolle wurde bidestilliertes Wasser benutzt. Nach Auftauen der Lymphozytenaliquots wurden sie in 9ml PBS bei 4°C für 10 Minuten mit 2000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Pro Ansatz (100000 Zellen in 100µl) wurde je 100µl der NDEA-Lösung für die Inkubation bei 37°C für 60 Minuten im Schüttelwasserbad zugegeben. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 2000 Umdrehungen/min und 4°C wurden die Überstände dekantiert. Die Testsubstanz wurde mit Hilfe eines 2-maligen Waschvorganges (je 5ml PBS) entfernt.

Anschließend hatten die Lymphozyten für 15, 30 und 60 Minuten in 1ml Medium (RPMI 1640+15% FCS) bei 37°C im Schüttelwasserbad die Möglichkeit zur DNA-Reparatur. Nach Ablauf der Reparatur fand eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 Umdrehungen/min und 4°C statt. Darauf folgte die Vitalitätsbestimmung, wie unter 2.2.3 beschrieben, mittels Trypanblau-Ausschlusstest in einer Neubauer Zählkammer.

Die Lymphozyten wurden in 75µl 0,7% Agarose aufgenommen und auf die schon mit einer Schicht 0,5% Agarose beschichteten Objektträger aufgebracht.

Abschließend wurde nach 5 Minuten die zweite Schicht mit je 85µl 0,7% Agarose aufgetragen. Nun erfolgte eine einstündige Lyse der Zell- und Kernmembranen bei 4°C im Kühlschrank.

2.4.3 Messung der DNA-Reparaturkapazität

Die DNA-Reparaturkapazität, definiert als prozentualer Anteil innerhalb eines definierten Zeitraumes reparierter DNA nach entsprechender vorausgegangener Schädigung, wurde sowohl an Schleimhautzellen als auch an Lymphozyten gemessen. Nach Bestimmung der DNA-Schädigung, wurden die Ergebnisse nach 15 und 30 Minuten Reparatur und zusätzlich nach 60 Minuten bei Lymphozyten, in ein Verhältnis zur Ausgangsschädigung gesetzt und digital analysiert. Die Reparaturkapazität wurde in % angegeben.

2.5 Übersicht des Versuchsaufbaus

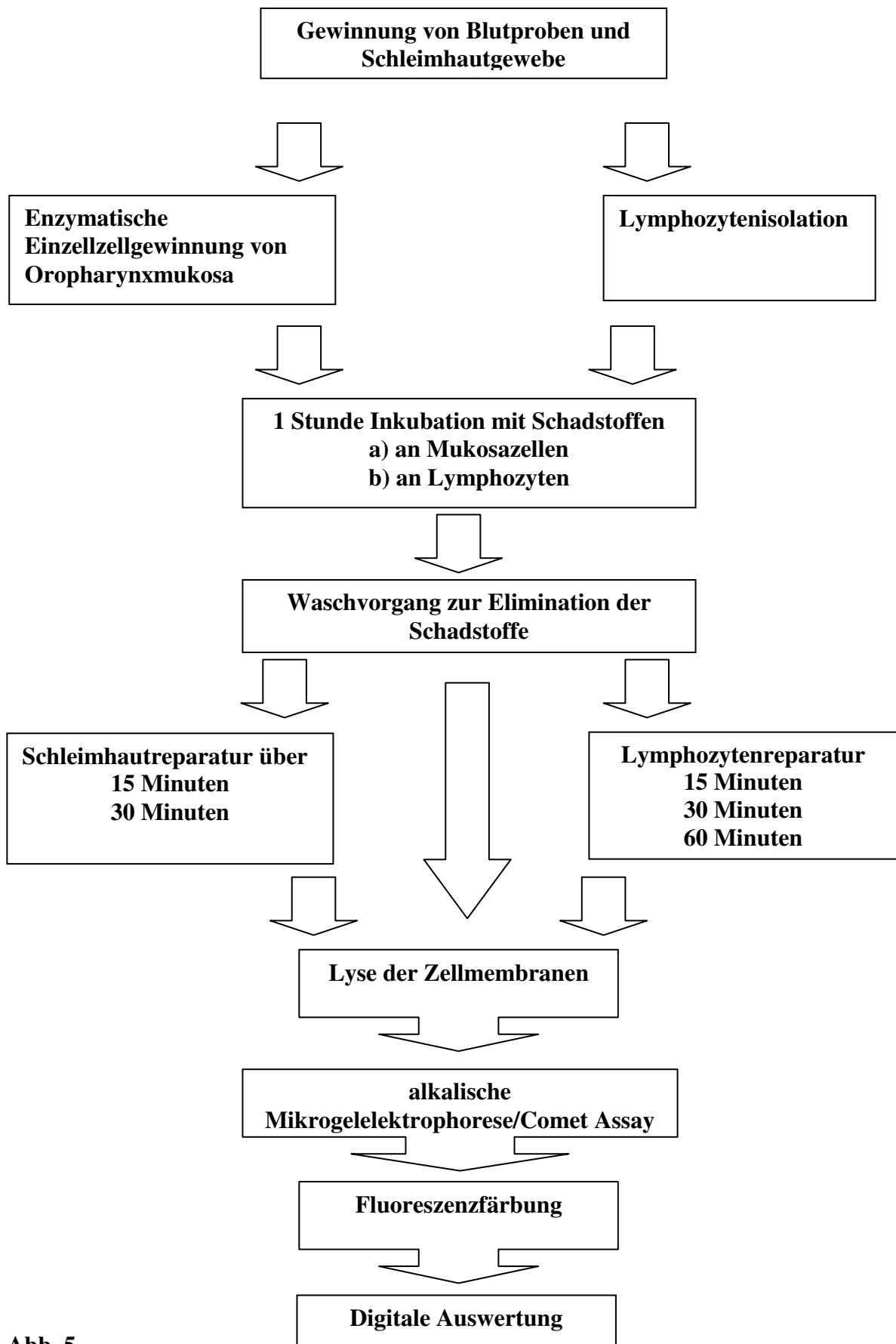


Abb. 5

2.6 Materialien

Im Folgenden werden die für den Versuchsaufbau notwendigen Chemikalien mit den entsprechenden Bezugsquellen aufgeführt.

2.6.1 Chemikalien und Reagenzien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na ₂ EDTA)	Serva, Heidelberg
Low-Melting-Temperature-Agarose	FMC-Bio-Products, Rockland, Maine, USA
Normal-Melting-Agarose	FMC-Bio-Products, Rockland, Maine, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid Plättchen (NaOH wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck, Darmstadt
Triton-X-100 (t-Octylphenoxypolyethanol)	Sigma, Steinheim
Trypan Blue Stain 0.4% Trypanblau	Gibco, BRL life technologies, Eggenstein

2.6.2 Medien und Zusätze

Folgende Artikel standen zur Verfügung:

Biocoll Separating Solution D 1.077	Biochrom KG, Berlin
Phosphate buffered saline (PBS) (ohne Ca, Mg und Sodium Bicarbonate)	Gibco, BRL life technologies, Eggenstein
MEM-Joklik Medium (ohne L-Glutamine und NaHCO ₃)	Linaris, Bettingen am Main
Fetal Bovin Serum (FCS)	Gibco, BRL life technologies, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim
RPMI 1640 Medium mit 2.0g/l L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin

2.6.3 Enzyme

Folgende Enzyme wurde verwendet:

Protease aus <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma, Steinheim
Hyaluronidase aus Schafshoden	Boehringer, Mannheim
Kollagenase P aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Boehringer, Mannheim

2.6.4 Testsubstanzen

Polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe

Benzo[a]pyren (B[a]P)	Fluka, Neu Ulm
Benzo[a]pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxid (+/-) (BPDE)	Midwest Research Institute, USA

N^o-Nitrosoverbindungen

N-Nitrosornicotin (NNN)	Midwest Research Institute, USA
4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)	Midwest Research Institute, USA
N-Nitrosodiethylamin (NDEA)	Sigma, Steinheim
N-Methyl-N ^o -nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.6.5 Lösungen, Zellisolierung, Agarose, Puffer

MEM-Joklik

- 10,98g Pulvermedium Joklik-MEM (ohne L-Glutamine und NaHCO₃),
- 2g NaHCO₃,
- 10ml Penicillin-Streptomycin,

pro Liter bidestilliertem Wasser. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und portionsweise bei 4°C aufbewahrt.

Enzymlösung zur Zellisolierung

- 50mg Protease,
- 10mg Hyaluronidase,
- 10mg Kollagenase P,

sind in 10ml Joklik anzusetzen. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bis zur Verwendung im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt.

Agarose

- 0,5%ige Normal-Melting-Agarose,
- 0,7%ige Low-Melting-Agarose,

wurden jeweils in PBS unter kurzem Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und bis zum weiteren Gebrauch bei 37°C im Wasserbad aufbewahrt.

Lysestammlösung

Die einzelnen Komponenten wurden jeweils getrennt angesetzt und erst bei Bedarf gemischt.

- 146,4g NaCl [2,5M],
- 1,2g Trishydroxymethylaminomethan [10mM],
- 37,2g Na₂ EDTA [100mM],
- 10g [1%] N-Lauroylsarcosin Natrium Salz,

NaCl und Trishydroxymethylaminomethan wurden in 500ml Aqua bidest. gelöst, Na₂EDTA in 160ml Aqua bidest. mit Zugabe von NaOH-Plätzchen und N-Lauroylsarcosin Natrium Salz in 160ml Aqua bidest. ebenfalls gelöst. Nach Vermischen aller Komponenten wurde der pH-Wert auf 10 eingestellt und auf einen Liter Aqua bidest. aufgefüllt.

Lysepuffer

- 1ml Triton X-100 [1%] (t-Octylphenoxypolyethanol)
- 10ml DMSO [10%]
- 89ml Lysestammlösung

Triton-X-100 und DMSO wurden in einen 100ml Messzylinder gegeben und mit Lyselösung auf 100ml aufgefüllt. Dieser Lysepuffer wurde jeweils für den aktuellen Versuch neu hergestellt.

Elektrophoresepuffer

- 24g NaOH-Plätzchen [300mM],
- 0,744g Na₂EDTA [1mM],

wurden in 2 Liter Aqua bidest. gelöst und bei 4°C gelagert.

Neutralisationspuffer [400mM]

48,5g Trishydroxymethylaminomethan wurde mit 990ml Aqua bidest. gemischt und auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Färbelösung (Stammlösung)

10mg Ethidiumbromid / 50ml bidestilliertes Wasser [0,2mg/ml]

Die Lösung wurde bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Kurz vor dem Versuch wurde eine 1:10 Verdünnung der Stammlösung mit Aqua bidest. hergestellt und sterilfiltriert (Ethidiumbromid-Färbelösung).

2.6.6 Verbrauchsmaterialien

Für die Durchführung der Arbeit wurden folgende Materialien verwendet, Bezugsquellen nachstehend:

Tabelle 1:

Cryoröhrchen (Cryogenetic Vials)	Merk, Darmstadt
Deckgläser Stärke 0 (24x70mm)	Langenbrinck, Emmendingen
Diamantschreiber	Schubert
Einmalspritzen (5ml, 10ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Millex-GS Sterilfilter blau 0,22µm Filter Unit	Millipore, Molsheim, Frankreich
Millex-GV Sterilfilter gelb 0,22µm Filter Unit	Millipore, Molsheim, Frankreich
Objektträgerkasten für 50 Objektträger	GLW, Würzburg
Objektträger geschnitten, doppelseitiger Mattrand (26x76mm)	Langenbrinck, Emmendingen
Pasteurpipetten steril, 7ml	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen für 20µl, 100µl und 1000µl Standardtips	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit rotem Deckel 15ml (redcap)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit blauem Deckel 50ml (bluecap)	Greiner, Frickenhausen
Röhrchen mit Schraubverschluss (Lymphozytenröhrchen) für 13ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zählkammer Neubauer improved	Merck, Darmstadt

2.6.7 Geräte

Folgende Geräte standen zur Durchführung der Mikrogelelektrophorese zur Verfügung:

Tabelle 2:

Bezeichnung	Typ	Hersteller	Ort
Analysewaage	Voyager	Ohaus	Gießen
Auswertung:			
Programm Komet	3.1	Kinetik Imaging	Liverpool
Datenspeicherung	MS Excel	Microsoft	
Elektrophoresenetzgerät	E865	Renner	Dannstadt
Elektrophoresewanne		Renner	Dannstadt
Gefrierschrank		Bosch	Stuttgart
Gefrierschrank (-80°C)		NBS	Nürtingen
Kühlschrank (+4°C)		Bosch	Stuttgart
Magnetrührer	Combimag RCT	IKA	Staufen
Mikroskope:			
Standardmikroskop		Zeiss	Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop	DMLB	Leica	Heerbrugg
Objektive	40x/0,5; 10x/0,22; 4x/0,1	Leica	Heerbrugg
Mikrowelle	MWS 2819	Bauknecht	Schorndorf
pH-Meter	766 Calimatic	Knick	Berlin
Schüttelwasserbad	1083	GFL	Burgwedel
Schüttler	Vortex Genie 2	Scientific Ind.	Bohemia, NY/USA
Sterilbank	Herasafe	Heraeus	Hanau
Waage	1419	Sartorius	Gießen
Zellzählkammer	Neubauer	Merck	Darmstadt
Zentrifuge	Varifuge 3.0 RS	Heraeus	Hanau
Zentrifuge	Varifuge 3.0 R	Heraeus	Hanau

2.7 Testverfahren

2.7.1 Die Mikrogelelektrophorese (MGE), Comet Assay

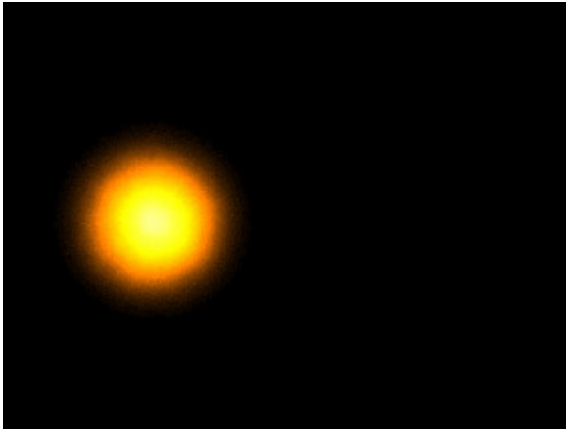
Schon 1978 gelang es Rydberg und Johanson das Migrationverhalten der Erbsubstanz von Einzelzellen mit Elektrophorese zu untersuchen. Nach Bestrahlung der Zellen und Fluoreszenzfärbung konnte ein dosisabhängiges Wanderungsverhalten der geschädigten DNA photometrisch gemessen werden. Auch Ostling und Johanson nutzten die Vorteile der damals [1984] noch neutralen Version der Mikrogelelektrophorese.

Die MGE bietet viele Vorteile. Für die Untersuchung reichen wenige Zellen aus, sie ist einfach durchzuführen, schnell, preiswert und benötigt keine radioaktive Markierung. Mit der neutralen Version werden hauptsächlich Doppelstrangbrüche detektiert [Fairbairn et al., 1995]. Als etablierte Methode zur Genotoxizitätsbestimmung wurde die MGE in den folgenden Jahren immer weiter entwickelt. Die Modifikation von Singh et al. [1988] und Kuchenmeister [1991] hin zu einer alkalischen Elektrophorese ermöglichte nun den Nachweis von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen sowie von inkompletten Exzisionsreparaturstellen an humanen Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes. Diese modifizierte Version der MGE stellt die methodische Grundlage der vorliegenden Arbeit dar.

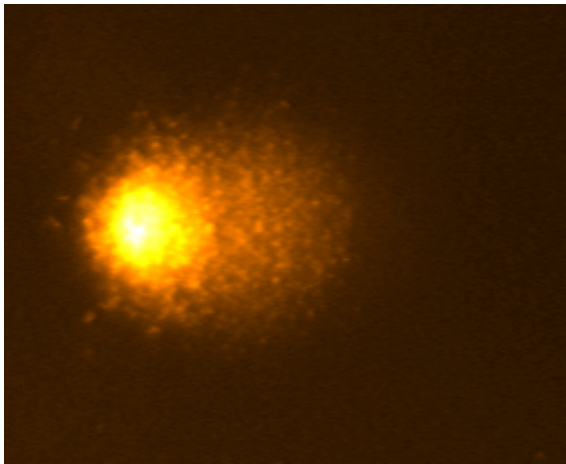
Die MGE ist eine vielseitig *in vivo* und *in vitro* anwendbare Methode. Es wurden mit ihr unter anderem Untersuchungen an Zellkulturen [Hanelt et al., 1997], an humanen Epithelien und Lymphozyten [Harréus et al., 1999], an Schleimhautzellkulturen bzw. Miniorganen [Kleinsasser et al., 2001], an Nagern [Devi et al. 2001, Frei und Kuchenmeister, 2001], Amphibien [Clemsts et al., 1997] und Pflanzen [Ptacek et al., 2001] erfolgreich durchgeführt. Die Einzelzellen werden nach der Fremdstoffinkubation der alkalischen Mikrogelelektrophorese zugeführt. Das Migrationsverhalten der DNA nach Fremdstoffinkubation während der Elektrophorese ist abhängig von der DNA-Organisation im Zellkern. Dort zeigt die DNA neben ihrer Helixstruktur zusätzliche Verdrillungen („supercoiling“). Vor dem Start der MGE erfolgt durch das alkalische Milieu eine Entspiralisierung dieser DNA-Verdrillungen und eine weitgehende Spaltung des Doppelstrangs durch Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen. Die Ribonukleinsäure (RNA) hat auf die Auswertung keinen Einfluss, da zelluläre RNA im alkalischen Milieu abgebaut wird.

2.7.2 Der Comet Assay als Nachweismethode für DNA-Schädigung

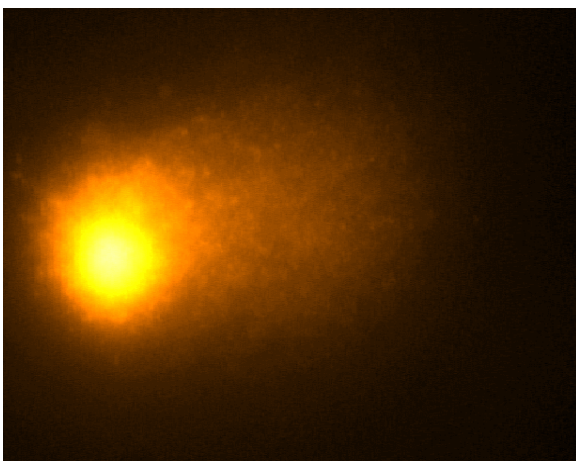
Abhängig vom Ausmaß der induzierten Strangbrüche zeigen die DNA-Fragmente während der Elektrophorese verschiedene Migrationsmuster (Abb. 6-8). Je stärker die Schädigung, desto schneller und somit weiter wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Im alkalischen Milieu der verwendeten Elektrophorese wandern die einzelnen DNA-Fragmente, welche durch Inkubation mit der jeweiligen Testsubstanz induziert werden, je nach Molekulargewicht unterschiedlich lange Strecken in Richtung Anode. Hierbei entsteht ein kometenförmiges DNA-Muster, welches im Kopf die weitgehend intakte DNA und im Schweif die DNA-Fragmente von Einzel- und Doppelstrangbrüchen enthält. Abbildung 6 zeigt eine weitgehend intakte DNA, mit punktförmiger Fluoreszenz, nach Färbung mit Ethidiumbromid unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 400facher Vergrößerung. Das Migrations- und Fluoreszenzverhalten von DNA nach mittelgradiger Schädigung ist in Abbildung 7 zu sehen, hier ist der Hauptanteil der DNA noch im Kopf enthalten. Abbildung 8 zeigt die deutliche DNA-Schädigung, hier ist der Hauptanteil der DNA-Fragmente im Schweif enthalten.

**Abb. 6:**

DNA einer Zelle ohne erkennbare Fragmentierung nach alkalischer Denaturierung, Elektrophorese und Fluoreszenzfärbung mit Ethidiumbromid; Fluoreszenzmikroskopie, Vergrößerung 400fach.

**Abb. 7:**

Mittelgradige DNA-Schädigung einer Zelle nach alkalischer Denaturierung, Elektrophorese und Fluoreszenzfärbung mit Ethidiumbromid; Fluoreszenzmikroskopie, Vergrößerung 400fach.

**Abb. 8:**

DNA einer Zelle mit starker DNA-Schädigung nach alkalischer Denaturierung, Elektrophorese und Fluoreszenzfärbung mit Ethidiumbromid; Fluoreszenzmikroskopie, Vergrößerung 400fach.

2.7.3 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Nach der mindestens einstündigen Auflösung der Membranen wurden die Objektträger in eine wassergekühlte Elektrophoresekammer (Renner, Dannstadt) gelegt. Der auf 4°C temperierter Elektrophoresepuffer [300mM NaOH, 1mM Na₂EDTA, pH 12] wurde bis zur vollständigen Bedeckung der Objektträger nachgefüllt. In 20 Minuten im alkalischen Milieu wurden die DNA-Doppelstränge und Verdrillungen („supercoils“) gelöst. Nun konnten die DNA-Fragmente im elektrischen Feld (25V, 300mA) Richtung Anode wandern. Nach 20 Minuten wurden die Objektträger auf eine Färbebrücke gelegt und dreimal im Abstand von jeweils 5 Minuten mit Trishydroxymethylaminomethan [400mM] neutralisiert. Abschließend wurden alle Objektträger mit je 75µl des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid angefärbt und in einem angefeuchteten, lichtgeschützten Objektträgerkasten bei 4°C bis zur Auswertung für maximal 48h aufbewahrt.

2.7.4 Digitale Analyse der DNA-Migration

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mit einem DMLB Fluoreszenzmikroskop (Leica, Heerbrugg, Schweiz) und einer daran gekoppelten CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung (Komet 3.1, Kinetic ImagingTM, Liverpool, GB).

Eine Quantifizierung der DNA-Schädigung bzw. Reparatur ist unter anderem mit dem Olive Tailmoment (OTM) möglich. Dieser errechnet sich aus dem Produkt des Medians der Wanderungsstrecke und dem Quotient der DNA im Kometenschweif in Relation zur Gesamt-DNA einer Zelle [Olive et al., 1993]. Hiermit kann eine quantitative Aussage über die DNA-Fragmentierung getroffen werden und nach Modifikation des Versuchsablaufes auch über die DNA-Reparaturkapazität. Eine qualitative Aussage der DNA-Reparatur ist hiermit nicht möglich. Der OTM wird ohne Einheit angegeben.

OTM= Median der Wanderungsstrecke x DNA im Schweif/Gesamt-DNA

2.8 Datenanalyse und Statistik

Das Programm SPSSTM 12.0 wurde für die statistische Analyse benutzt. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde die graphische Darstellung in Boxplots gewählt. Ein Boxplot besteht aus einem Kasten, welcher die Hälfte (25-75%) der experimentellen Daten enthält, sowie den Median, angezeigt durch eine horizontale Linie. Die höchsten und niedrigsten Datenwerte werden durch die außen anliegenden T-Linien markiert. Ausgenommen der Werte, die um das eineinhalbfache bzw. dreifache außerhalb der Kastenlänge liegen, diese sind durch Sterne (Extremwerte) und Kreise (Ausreißer) gekennzeichnet. Die Rohdaten wurden unter MS Excel gespeichert. Aus diesen OTM-Werten wurden zur Veranschaulichung der Reparaturkapazität Excelgraphen erstellt.

Die statistische Analyse basiert auf den mittleren OTM-Werten von 80 Zellen (zwei Objektträger je Ansatz, 40 Zellen je Objektträger), die für jede getestete Substanz, Zellart und Spender ausgewertet wurden.

Um verbundene Stichproben, d.h. in einem Patientenkollektiv OTM-Werte der Fremdstoffinkubation mit den OTM-Werten der Kontrollansätze zu vergleichen, wurde der Wilcoxon-Test für abhängige Daten herangezogen. Das Testverfahren des Mann-Whitney-U-Tests wurde angewendet, um unabhängige Werte, d.h. OTM-Werte von Tumorpatienten mit OTM-Werten von tumorfreien Spendern zu vergleichen.

Das allgemeine Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

Im folgenden Teil werden die Versuchsergebnisse dieser Studie graphisch dargestellt und statistisch analysiert. Bei allen Untersuchungen dieser Arbeit lag die Zellvitalität >80%. Die Ausgangsvitalität betrug für Schleimhautzellen 100%, für Lymphozyten >85%. Nach Inkubation mit den Testsubstanzen errechneten sich Vitalitäten von >92% für Schleimhautzellen und von >80% für Lymphozyten. Vitalitäten <80% galten als Ausschlusskriterium. In der Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass eine mittels Comet Assay nachgewiesene relevante genotoxische Reaktion erst dann beschrieben wird, wenn der Olive Tailmoment (OTM) nach Fremdstoffinkubation >2 ist [Olive et al., 1993].

3.1 Genotoxizität von Umweltstoffen an humanem Gewebe

Die Grafiken geben einen Überblick über alle Testsubstanzen und Größenordnungen der stoffspezifischen genotoxischen Auswirkungen auf oropharyngeale Schleimhautzellen (linker Balken) und Lymphozyten (rechte Balken).

Tumorpatienten

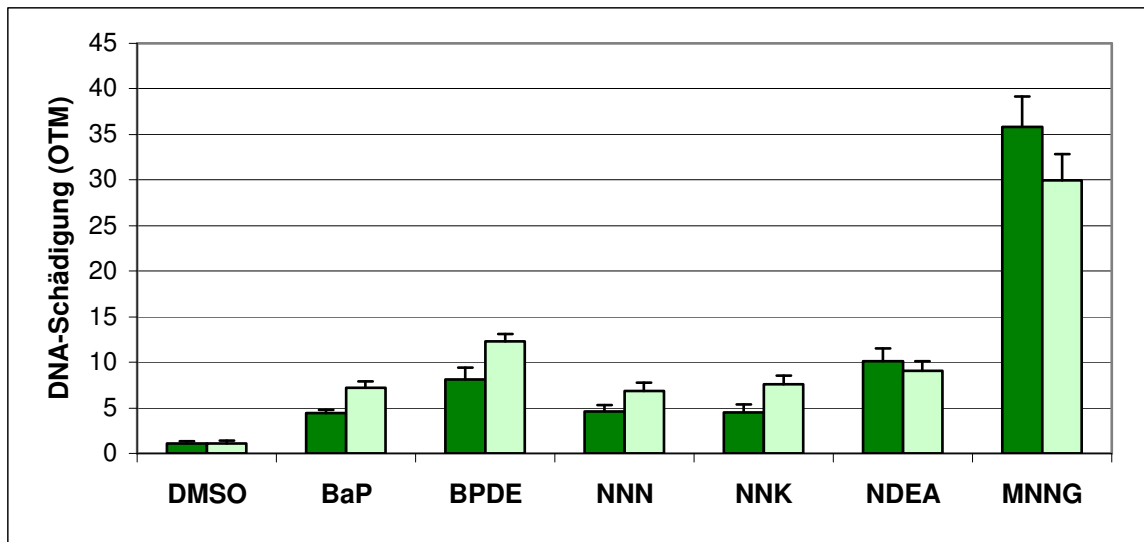


Abb. 9a:

Vergleichende Darstellung aller getesteter Xenobiotika an Schleimhautzellen (dunkelgrün) und Lymphozyten (hellgrün). DMSO als Negativ- und MNNG als Positivkontrolle.

Tumorfreie Spender

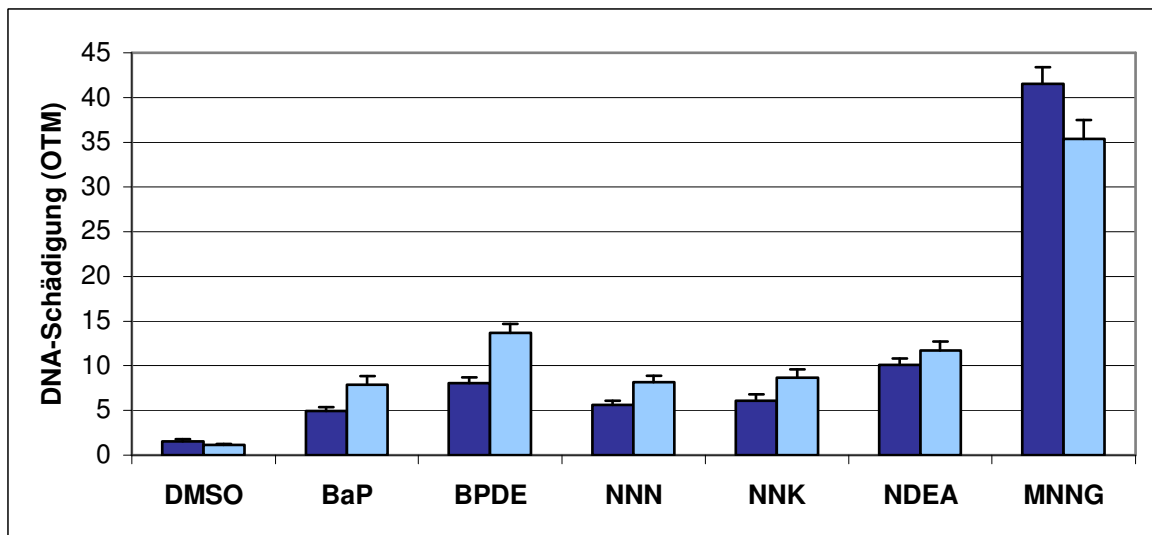


Abb. 9b:

Vergleichende Darstellung aller Xenobiotika an Schleimhautzellen (dunkelblau) und Lymphozyten (hellblau). DMSO als Negativ- und MNNG als Positivkontrolle.

3.1.1 Genotoxische Wirkung von DMSO (Negativkontrolle) und N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin MNNG (Positivkontrolle) auf oropharyngeale Schleimhautzellen und Lymphozyten

Genotoxische Schäden unter DMSO wurden weder bei Zellen von Tumor- noch bei tumorfreien Spendern nachgewiesen. Bei Tumorpatienten betrug der OTM-Medianwert von Schleimhautzellen 1,2 und bei Lymphozyten 1,4 (Abb. 10a).

Die OTM-Medianwerte der tumorfreien Spender lagen für die Schleimhautzellen bei 1,3 und für die Lymphozyten bei 1,1 (Abb.10b).

Das als Positivkontrolle verwendete MNNG wies starke genotoxische Auswirkungen an Schleimhautzellen und Lymphozyten auf. Der p-Wert im Vergleich zur Negativkontrolle war für alle Versuche und Zellarten signifikant $<0,001$.

Für Oropharynxkarzinompatienten lagen die OTM-Medianwerte für Schleimhautzellen bei 42,1, für Lymphozyten bei 33,4 (Abb. 11a). Die DNA der Schleimhautzellen war signifikant stärker geschädigt als die DNA der Lymphozyten mit $p \leq 0,01$.

Abbildung 11b stellt die OTM-Medianwerte für tumorfreie Spender gegenüber (Schleimhautzelle 39,5, Lymphozyten 35,6).

Genotoxische Wirkung von DMSO:

a) Tumorpatienten

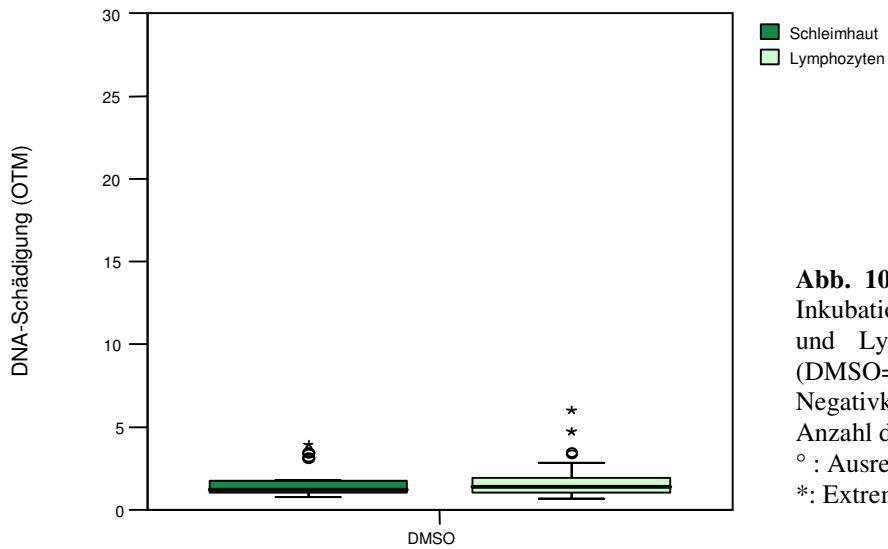


Abb. 10a: DMSO

Inkubation der Schleimhautzellen und Lymphozyten in Medium (DMSO=Dimethylsulfoxid) als Negativkontrolle.

Anzahl der Versuche je 23

◦ : Ausreißer;

*: Extremwerte.

b) Tumorfreie Spender

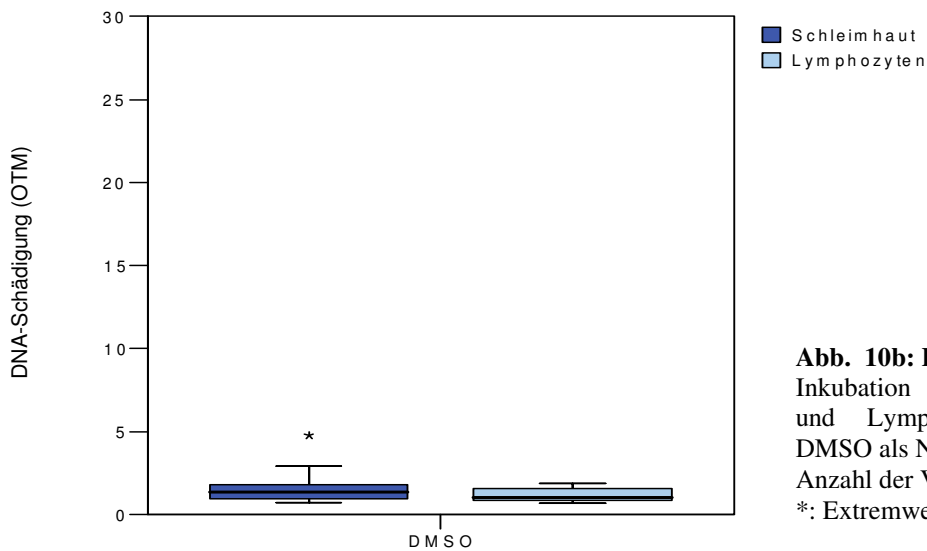


Abb. 10b: DMSO

Inkubation der Schleimhautzellen und Lymphozyten in Medium DMSO als Negativkontrolle.

Anzahl der Versuche je 23

*: Extremwert.

Genotoxische Wirkung von MNNG:

a) Tumorpatienten

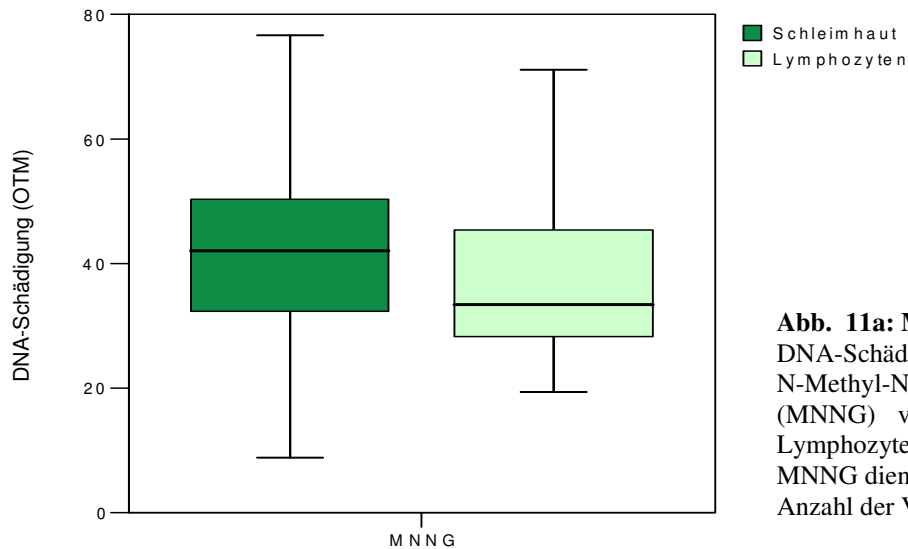


Abb. 11a: MNNG

DNA-Schädigung durch Inkubation mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) von Schleimhautzellen und Lymphozyten.

MNNG diente als Positivkontrolle.
Anzahl der Versuche je 22

b) Tumorfreihe Spender

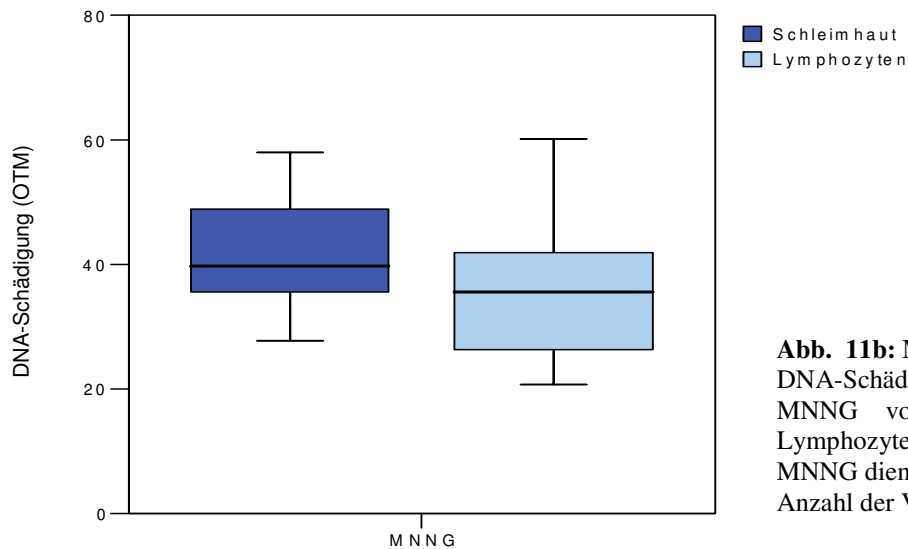


Abb. 11b: MNNG

DNA-Schädigung durch Inkubation mit MNNG von Schleimhautzellen und Lymphozyten.

MNNG diente als Positivkontrolle.
Anzahl der Versuche je 23

3.1.2 Genotoxische Wirkung der Testsubstanzen B[a]P, BPDE, NNN und NNK auf oropharyngeale Schleimhautzellen und Lymphozyten

Oropharynxschleimhautzellen und Lymphozyten von Tumor- und Kontrollpatienten konnten mit B[a]P signifikant gegenüber der Negativkontrolle mit DMSO geschädigt werden ($p < 0,001$). Für die Tumorgruppe (Abb. 12a) zeigt sich eine signifikant stärkere genotoxische Auswirkungen auf Lymphozyten (OTM 8,1) versus Schleimhautzellen (OTM 5,1) mit $p \leq 0,001$. Auch für tumorfreie Spender (Abb. 12b) wird die signifikant stärkere DNA-Schädigung von B[a]P auf Lymphozyten mit $p \leq 0,031$ deutlich. Der OTM-Medianwert für Lymphozyten betrug 6,8, der OTM-Median der Schleimhautzellen 4,5.

Oropharynxschleimhautzellen und Lymphozyten konnten mit Benzo[a]pyren-diol-epoxid (BPDE) signifikant gegenüber der Negativkontrolle mit DMSO geschädigt werden ($p < 0,001$). Die Inkubation mit BPDE zeigte bei Tumorpatienten stärkere genotoxische Auswirkungen auf Lymphozyten (OTM 13,4) gegenüber Schleimhautzellen (OTM 9,9), jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,101$, Abb. 13a).

Bei tumorfreien Spendern (Abb. 13b) waren Lymphozyten (OTM 13,6) verglichen mit Oropharynxschleimhautzellen (OTM 8,0) signifikant stärker genotoxisch geschädigt ($p \leq 0,001$).

Das Nitrosamin NNN zeigte bei beiden Zellarten signifikante genotoxische Auswirkungen im Vergleich zur Negativkontrolle mit einem p-Wert $< 0,001$. Außerdem verursachte NNN bei Oropharynxkarzinompatienten (Abb. 14a) signifikant höhere DNA-Schädigungen an Lymphozyten (OTM 9,0) verglichen mit Schleimhautzellen (OTM 6,0) ($p \leq 0,023$). Für die tumorfreien Spender (Abb. 14b) lagen die OTM-Medianwerte bei 5,4 für Schleimhautzellen und bei 8,2 für Lymphozyten ($p \leq 0,009$).

Das Nitrosamin NNK konnte im Vergleich zur Negativkontrolle signifikante DNA-Schäden verursachen ($p < 0,001$). Anhand des Wilcoxon-Tests errechnete sich eine signifikant stärkere Lymphozytenschädigung mit einem p-Wert von $\leq 0,039$ für Tumorpatienten und von $p \leq 0,02$ für tumorfreie Spender. Die OTM-Medianwerte für Tumorpatienten lagen für Schleimhautzellen bei 5,8 und für Lymphozyten bei 8,8 (Abb. 15a).

Für tumorfreie Spender (Abb. 15b) lagen die OTM-Medianwerte für Schleimhautzellen bei 5,3, für Lymphozyten bei 7,4.

Genotoxische Wirkung von B[a]P:

a) Tumorpatienten

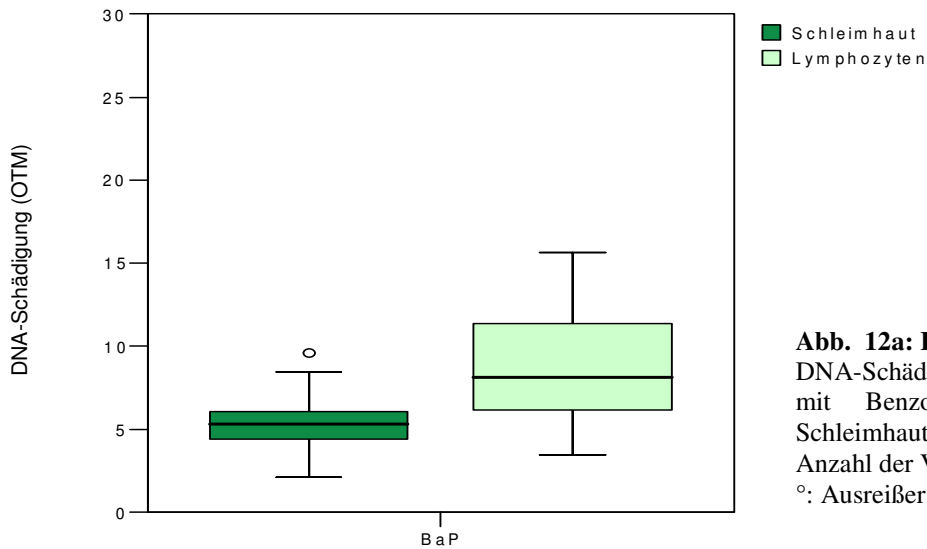


Abb. 12a: B[a]P

DNA-Schädigung durch Inkubation mit Benzo[a]pyren (B[a]P) von Schleimhautzellen und Lymphozyten. Anzahl der Versuche je 23
°: Ausreißer.

b) Tumorfremie Spender

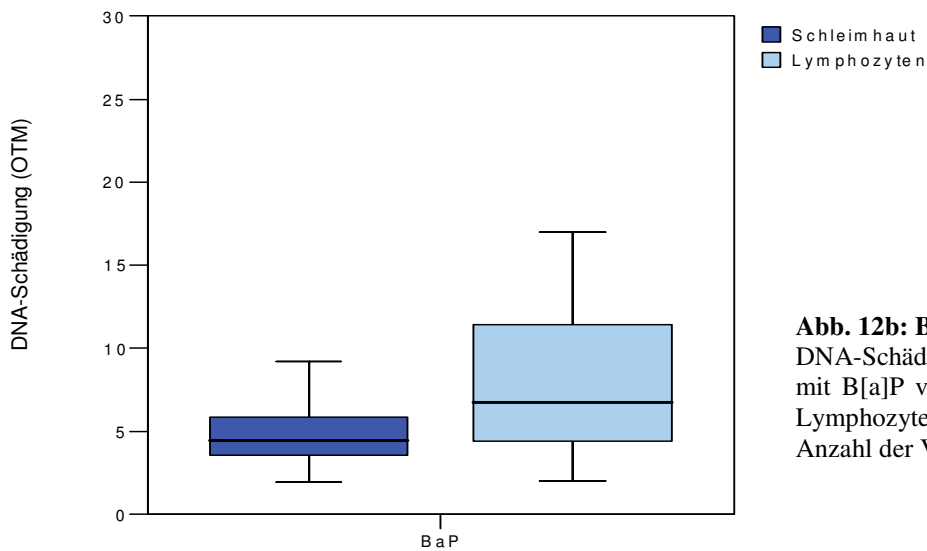


Abb. 12b: B[a]P

DNA-Schädigung durch Inkubation mit B[a]P von Schleimhautzellen und Lymphozyten. Anzahl der Versuche: 23 Schleimhaut
22 Lymphozyten

Genotoxische Wirkung von BPDE:

a) Tumorpatienten

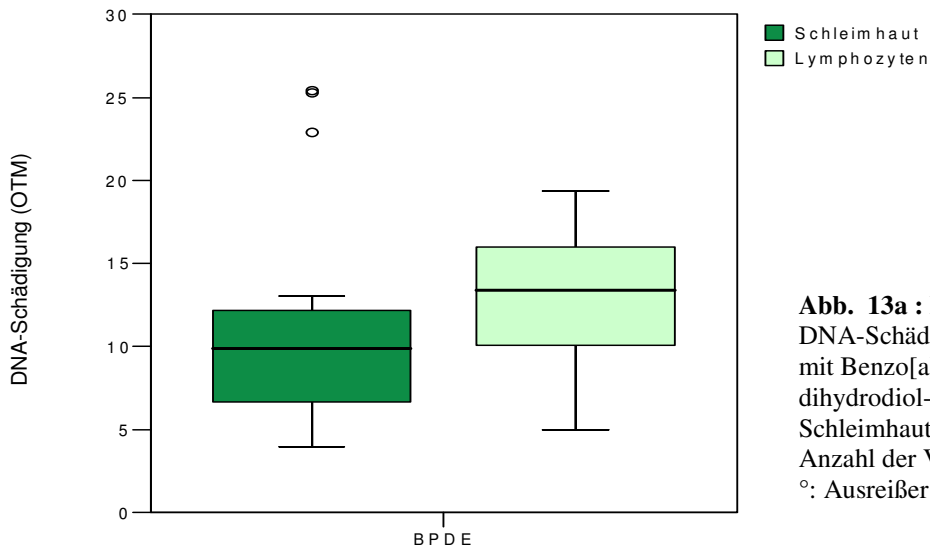


Abb. 13a : BPDE

DNA-Schädigung durch Inkubation mit Benzo[a]pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxid (BPDE) von Schleimhautzellen und Lymphozyten. Anzahl der Versuche je 23
°: Ausreißer.

b) Tumorfreie Spender

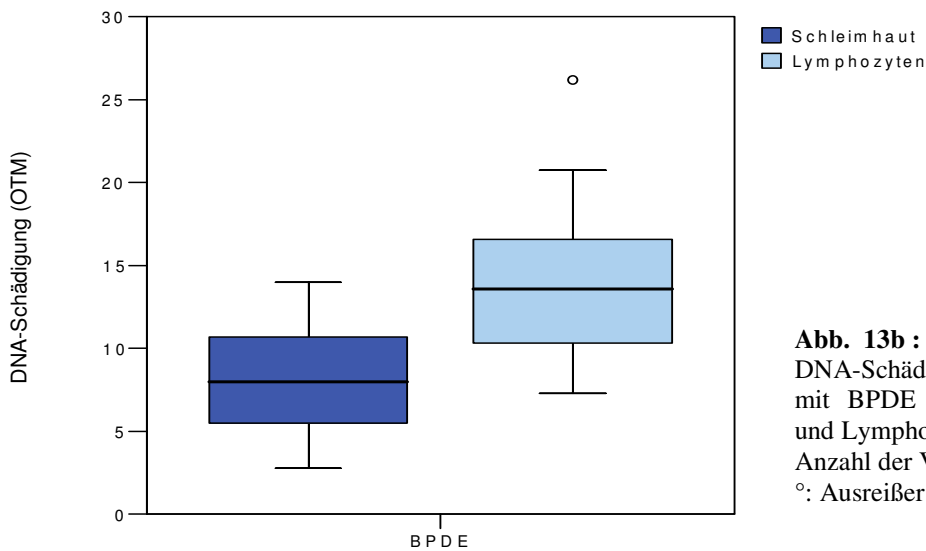


Abb. 13b : BPDE

DNA-Schädigung nach Inkubation mit BPDE von Schleimhautzellen und Lymphozyten. Anzahl der Versuche je 23
°: Ausreißer.

Genotoxische Wirkung von NNN:

a) Tumorpatienten

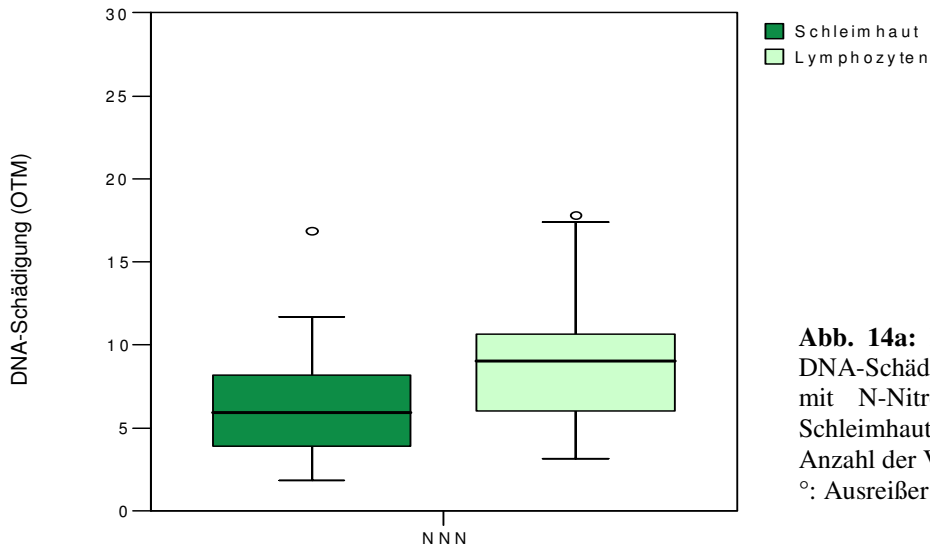


Abb. 14a: NNN

DNA-Schädigung durch Inkubation mit N-Nitrosornicotin (NNN) von Schleimhautzellen und Lymphozyten. Anzahl der Versuche je 23
°: Ausreißer.

b) Tumorfremie Spender

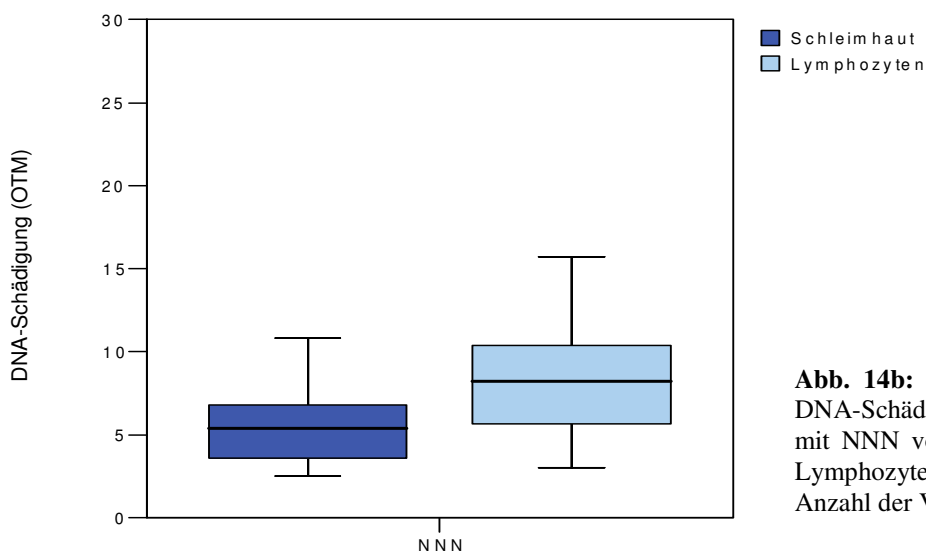


Abb. 14b: NNN

DNA-Schädigung durch Inkubation mit NNN von Schleimhautzellen und Lymphozyten. Anzahl der Versuche je 23

Genotoxische Wirkung von NNK:

a) Tumorpatienten

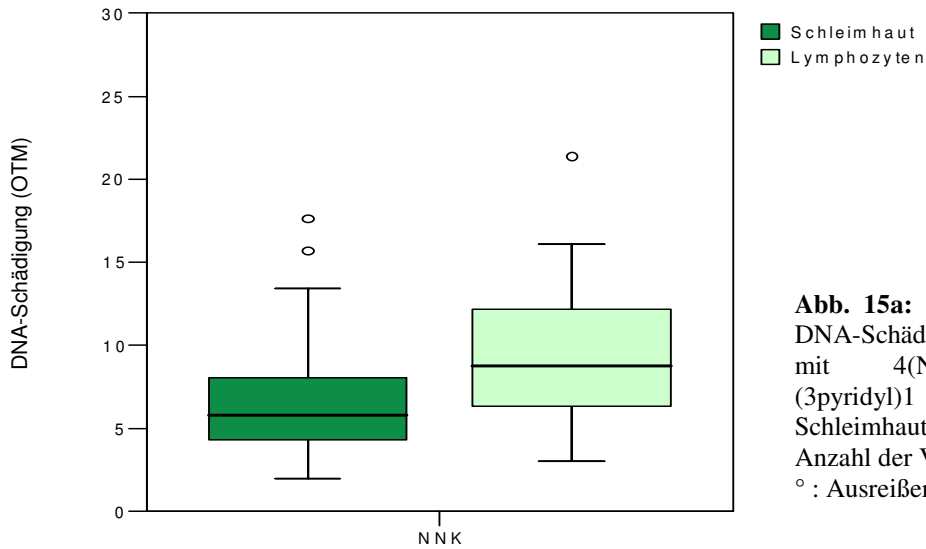


Abb. 15a: NNK

DNA-Schädigung durch Inkubation mit 4(N-Methyl-N-nitrosamin)-1-(3pyridyl)1 butanone (NNK) von Schleimhautzellen und Lymphozyten. Anzahl der Versuche je 23
 ° : Ausreißer.

b) Tumorfrie Spender

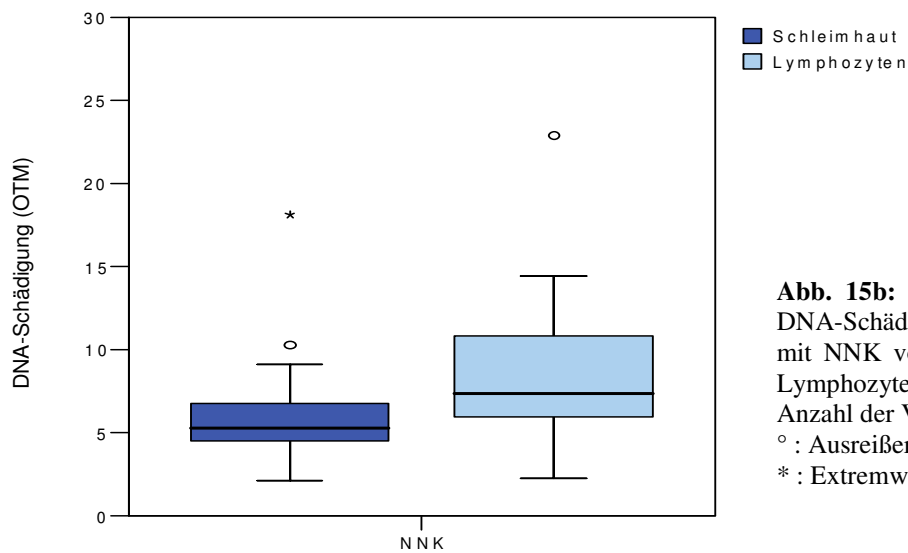


Abb. 15b: NNK

DNA-Schädigung durch Inkubation mit NNK von Schleimhautzellen und Lymphozyten. Anzahl der Versuche je 23
 ° : Ausreißer.
 * : Extremwerte.

3.2 Messung endogener Risikomarker an humanen Schleimhautzellen des Oropharynx und Lymphozyten

3.2.1 Mutagensensitivität

Die Mutagensensitivität wird stellvertretend für alle getesteten Inhaltsstoffe von Tabakrauch durch die Empfindlichkeit der oropharyngealen Epithelien und Lymphozyten der Spender ohne und mit Oropharynxkarzinom gegenüber N-Nitrosodiethylamin (NDEA) [50mM] dargestellt.

3.2.1.1 Mutagensensitivität von Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom an Schleimhautzellen und Lymphozyten

Nach 60min. Inkubation der Schleimhautzellen der Tumorpatienten mit NDEA konnte im Mittel eine DNA-Schädigung von OTM 10,5 hervorgerufen werden. Die Lymphozyten der Tumorpatienten wurden mit OTM 10,7 geschädigt. Der statistische Vergleich ergab keinen Unterschied in der Mutagensensitivität der beiden Gruppen ($p \leq 0,28$; Abb. 16a).

Die OTM-Medianwerte für Schleimhautzellen in der Kontrollgruppe lagen bei 9,66 und für Lymphozyten bei 10,45, ($p \leq 0,15$, Abb. 16b). Die Genotoxizität war bei NDEA signifikant erhöht gegenüber der Negativkontrolle für Schleimhautzellen und Lymphozyten ($p < 0,001$).

a) Tumorpazienten

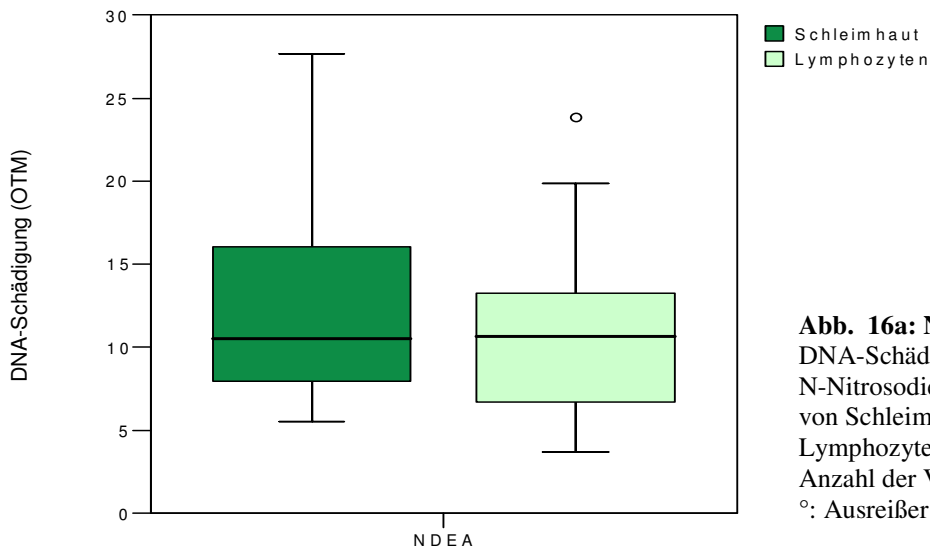


Abb. 16a: NDEA
DNA-Schädigung durch
N-Nitrosodiethylamin (NDEA)
von Schleimhautzellen versus
Lymphozyten.
Anzahl der Versuche je 23
°: Ausreißer.

b) Tumorfrie Spender

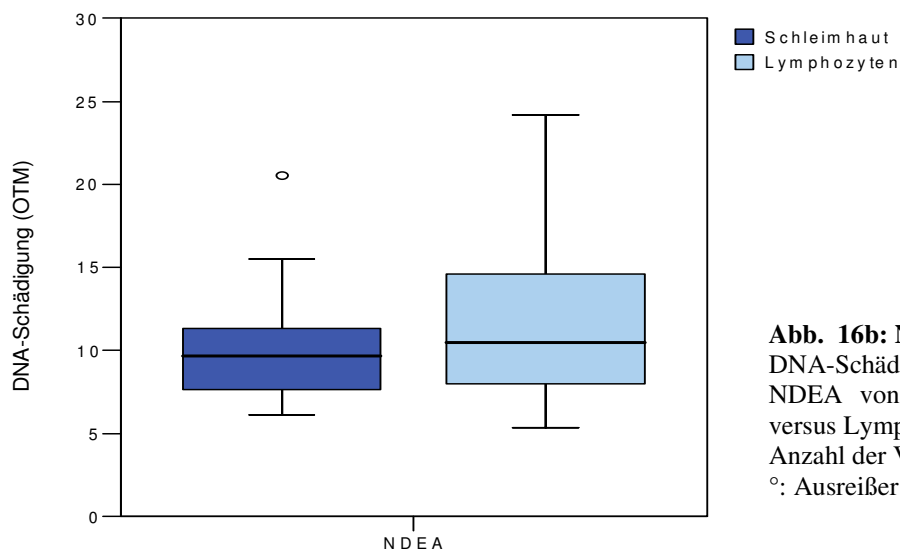


Abb. 16b: NDEA
DNA-Schädigung durch
NDEA von Schleimhautzellen
versus Lymphozyten.
Anzahl der Versuche je 23
°: Ausreißer.

3.2.2 DNA-Reparatur

Nach Inkubation mit den Fremdstoffen wurden alle Zellen auf ihre DNA-Reparatur bzw. Reparaturkapazität hin untersucht. Schleimhautzellen wurden nach 15 und 30 Minuten Reparaturzeit, Lymphozyten nach 15, 30 und 60 Minuten dem Comet Assay zugeführt.

3.2.3 DNA-Reparaturkapazität

Die DNA-Reparaturkapazität wurde an Schleimhautzellen des Oropharynx für Reparaturintervalle von 15 und 30 Minuten sowie an Lymphozyten für Reparaturintervalle von 15, 30 und 60 Minuten bestimmt. Exemplarisch wird die Reparaturkapazität anhand des Nitrosamins NDEA dargestellt.

3.2.3.1 DNA-Reparaturkapazität von Patienten mit und ohne Karzinom an oropharyngealen Schleimhautzellen

Nach einer DNA-Schädigung durch NDEA kam es zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Reparaturkapazität lediglich bei Schleimhautzellen tumorfreier Spender mit $p \leq 0,002$.

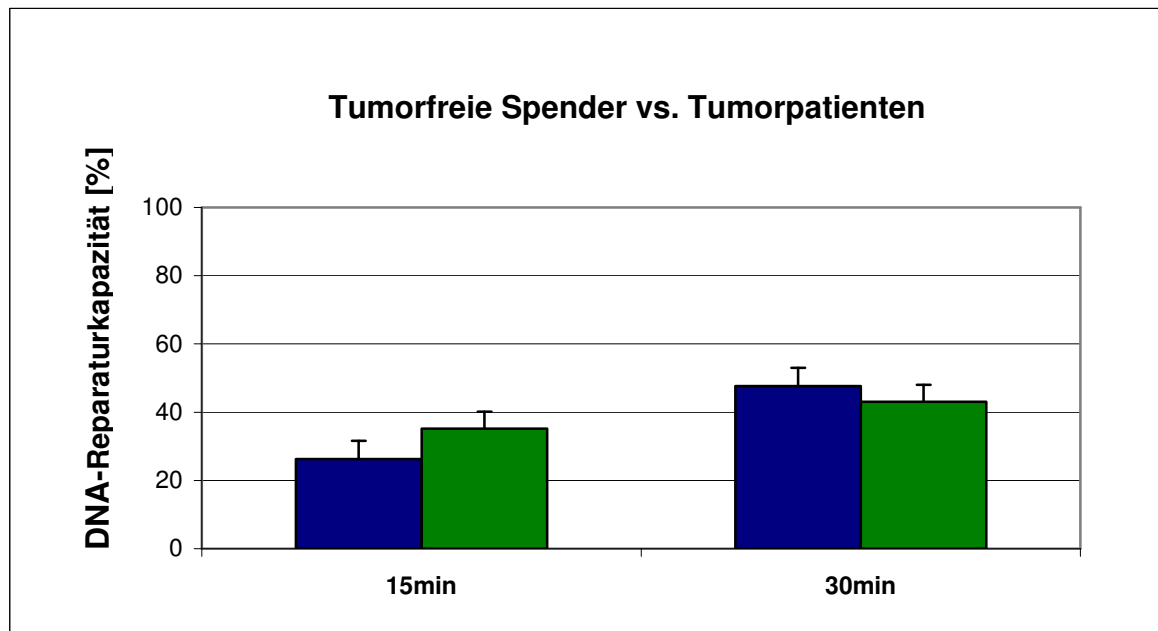


Abb. 17: Die DNA-Reparaturkapazität in oropharyngealen Schleimhautzellen ist in prozentualen Mittelwerten und Standardfehlern in den dunkelblauen (Kontrollgruppe) bzw. dunkelgrünen (Tumorgruppe) Balken dargestellt.

Reparaturkapazität in %	nach 15 Minuten	nach 30 Minuten
Tumorfrie Spender	26,3%	47,7%
Oropharynxkarzinompat.	35,2%	43,1%

3.2.3.2 DNA-Reparaturkapazität von Tumorpatienten

Nach einer Schädigung der Schleimhautzellen und Lymphozyten von Tumorpatienten durch NDEA wurde nach 15min. und nach 30min. Reparatur unten genannte Reparaturkapazitäten ermittelt. Der statistische Vergleich offenbart keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Zellarten (Abb. 18).

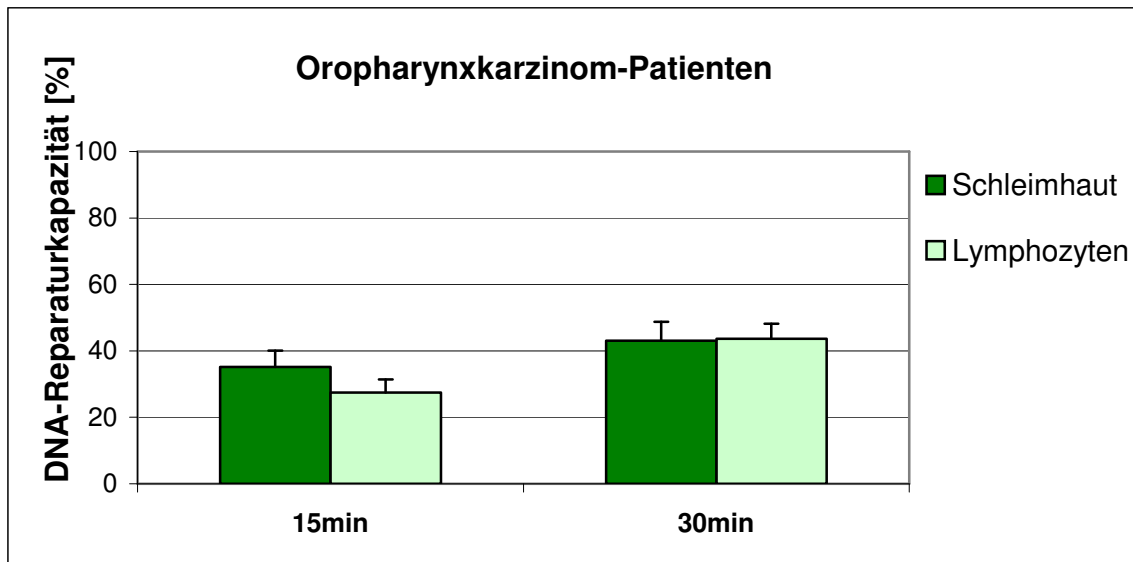


Abb. 18: Die DNA-Reparaturkapazität von Oropharynxkarzinompat. ist in prozentualen Mittelwerten und Standardfehlern in den dunkelgrünen (Schleimhautzellen) bzw. hellgrünen (Lymphozyten) Balken dargestellt.

Reparaturkapazität in %	nach 15 Minuten	nach 30 Minuten
Schleimhautzellen	35,2%	43,1%
Lymphozyten	27,5%	43,6%

3.2.3.3 DNA-Reparaturkapazität von tumorfreien Spendern

Nach einer Schädigung der Schleimhautzellen und Lymphozyten der tumorfreien Spender durch NDEA wurde nach 15min. und 30min. Reparaturzeit unten genannte DNA-Reparaturkapazitäten ermittelt. Im statistischen Vergleich zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zellarten trotz deutlich besserer Reparaturkapazität der Schleimhautzellen (Abb. 19).

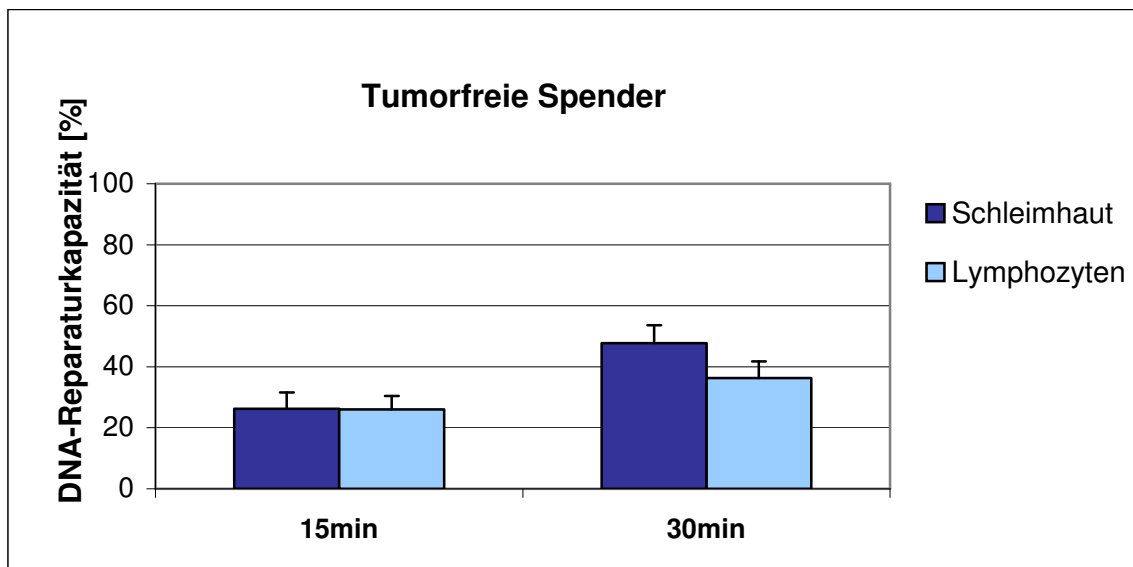


Abb. 19: Die DNA-Reparaturkapazität von tumorfreien Spendern ist in prozentualen Mittelwerten und Standardfehlern in den dunkelblauen (Schleimhautzellen) bzw. hellblauen (Lymphozyten) Balken dargestellt.

Reparaturkapazität in %	nach 15 Minuten	nach 30 Minuten
Schleimhautzellen	26,3%	47,7%
Lymphozyten	26,1%	36,3%

3.2.3.4 DNA-Reparaturkapazität von Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom an Lymphozyten

Die DNA-Reparaturkapazität der Lymphozyten nach 15, 30 und 60 Minuten ist zwischen der Tumor- und Kontrollgruppe im Gesamtkollektiv vergleichbar. Der statistische Vergleich offenbart keine signifikanten Unterschiede an Lymphozyten der beiden Spendergruppen. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse bietet Abb. 20.

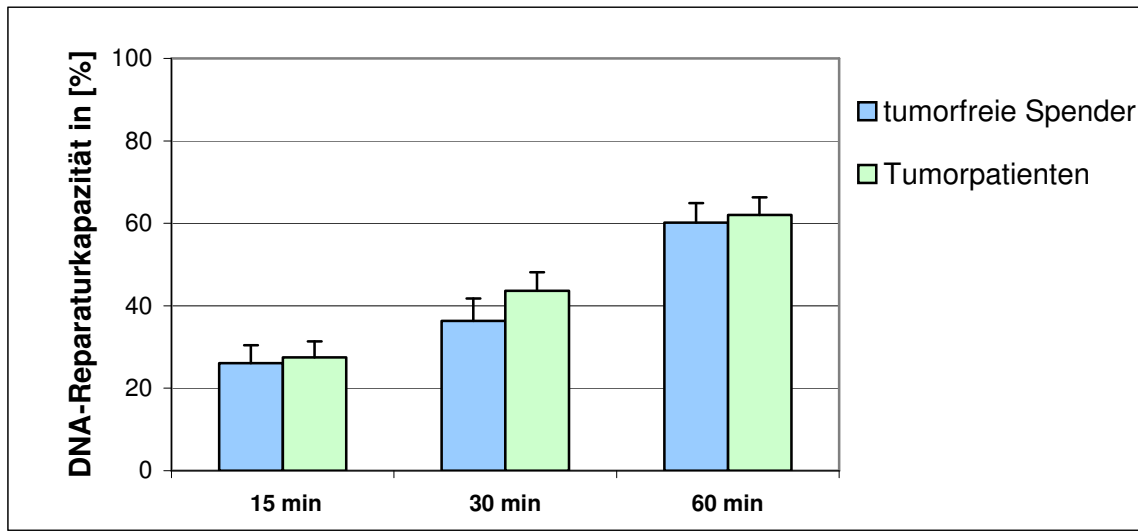


Abb. 20: Die DNA-Reparaturkapazität von Lymphozyten ist in prozentualen Mittelwerten und Standardfehlern in den hellblauen (tumorfrei Spender) bzw. hellgrünen (Tumorpatienten) Balken dargestellt.

Reparaturkapazität in %	nach 15min	nach 30min	nach 60min
Tumorfrie Spender	26,1%	36,3%	60,2%
Oropharynxkarzinompat.	27,5%	43,6%	62,1%

3.2.3.5 DNA-Reparaturkapazität der Schleimhautzellen von Tumorpatienten bei Konsum von <63g bzw. >63g Alkohol/d

Nach Inkubation der Schleimhautzellen mit NDEA wird nach 15 und 30 Minuten die DNA-Reparaturkapazität gemessen. Verglichen wurden zwei Untergruppen welche anamnestisch ≤ 63 g Alkohol/d bzw. >63 g Alkohol/d konsumierten. Nach 30 Minuten Reparatur zeigte sich im Wilcoxon-Test mit $p \leq 0,029$ ein signifikanter Unterschied der beiden Kollektive.

Bei Tumorpatienten mit ≤ 63 g Alkoholkonsum pro Tag stieg die DNA-Reparaturkapazität von 35,4% nach 15 Minuten auf 55,6% nach 30 Minuten an.

Nahmen die Patienten dagegen >63 g/d Alkohol zu sich, sank die DNA-Reparaturkapazität von 30,5% nach 15 Minuten auf 24,6% nach 30 Minuten ab.

Graphische Veranschaulichung siehe Abb. 21 und 22.

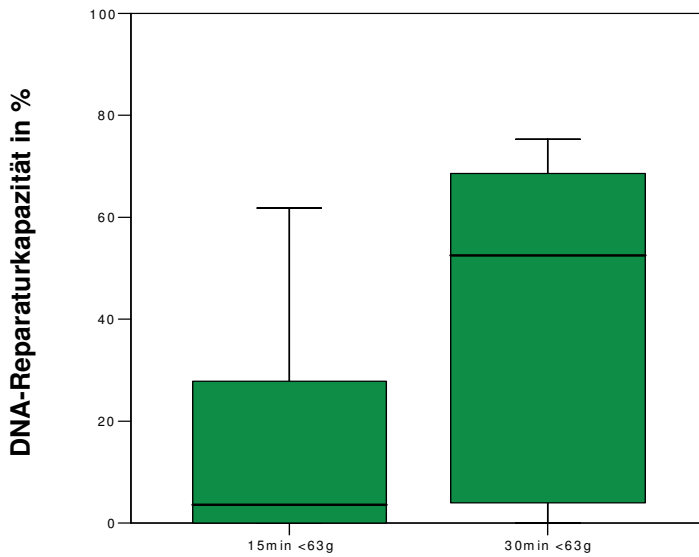
Reparaturkapazität von Schleimhautzellen abhängig vom Alkoholkonsum:

Abb. 21: Darstellung der Reparaturkapazitäten in %, nach 15min und nach 30min. Anhand von Schleimhautzellen von Tumorpatienten. Alkoholkonsum < 63g/d. Anzahl der Versuche 8.

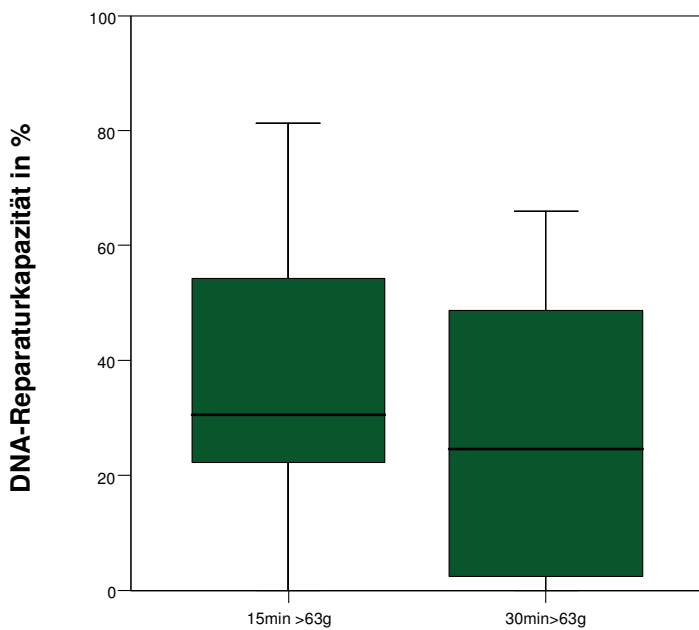


Abb. 22: Darstellung der Reparaturkapazitäten in %, nach 15min und nach 30min. Anhand von Schleimhautzellen von Tumorpatienten. Alkoholkonsum > 63g/d. Anzahl der Versuche 14.

4. Diskussion

Die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit lagen bei der Testung der Mutagensensitivität, sowie der DNA-Reparaturkapazität von Epithelzellen des Oropharynx und von peripheren Lymphozyten des Menschen. Des weiteren wurden erstmalig Messungen genotoxischer Auswirkungen zahlreicher Tabakinhaltstoffe an diesen Zellen durchgeführt. Mit der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese, dem Comet Assay, konnte die individuelle Mutagensensitivität nach Inkubation mit Fremdstoffen sowie die DNA-Reparaturkapazität der jeweiligen Zellen untersucht werden.

4.1 Auswahl des Spenderkollektivs

Das Patientengut für die vorliegende Arbeit entstammt der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München. Zur Vermeidung kofaktorieller Einflüsse auf die Untersuchungsergebnisse wurde Gewebe von solchen Patienten gewonnen, die neben der zur Operation führenden Grunderkrankung keine weiteren chronischen Infektions- oder Systemerkrankungen aufwiesen. Die ausschließlich männlichen Patienten in der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie waren bezüglich Alter, Rauch- und Alkoholkonsumgewohnheiten gematcht.

4.1.1 Patienten mit Oropharynxkarzinom als Spender von Schleimhautzellen des Oropharynx

Patienten mit oropharyngealem Karzinom, die als Spender von Schleimhautzellen für die Arbeit zur Verfügung standen wiesen unterschiedliche Schweregrade und Stadien der Erkrankung auf. Die Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München stellt ein Zentrum zur Behandlung derartiger Erkrankungen dar. Die Patienten waren erstdiagnostizierte Fälle ohne vorangegangene Strahlen- und/oder Chemotherapie. Die Probengewinnung eines schmalen Schleimhautrandstreifens erfolgte im Rahmen der Tumoroperation nach Sicherstellung einer Resektion im Gesunden. Die histopathologische Begutachtung der angrenzenden Resektionsränder im Anschluss an die Operation ergab keinen Hinweis für schwergradige Epitheldysplasien oder invasives Tumorwachstum.

Im Oropharynx befindet sich die Kreuzungsstelle von Luft- und Speiseweg, er stellt eine primäre Filterstation für potentielle Karzinogene und Umweltstoffe dar. Schleimhautzellen

dieser Lokalisation sind daher besonders geeignet, DNA-schädigende Auswirkungen inhalativ und ingestiv aufgenommener Xenobiotika zu evaluieren [Harréus et al., 2001, Kleinsasser et al., 2000].

Dem Anstieg der Mortalität von Kopf-Hals-Tumoren in den vergangenen 20 Jahren auf das ca. Dreifache liegt insbesondere das Auftreten von Oropharynxkarzinomen zugrunde. Es sind besonders Männer, die an einem Oropharynxkarzinom erkranken; im Verhältnis Männer zu Frauen 3,8:1 [Schlesinger-Raab et al., 2003]. Hautverantwortlich für den Anstieg an Inzidenz und Mortalität sind in erster Linie der anhaltende Konsum von Tabak und Alkohol [Lagiou et al., 2005, Levi, 1999]. In der Vergangenheit wurden zusätzlich endogen und exogen Risikofaktoren mit der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen in Verbindung gebracht [Maier et al., 1994, Cloos et al., 2000].

4.1.2 Patienten als tumorfreie Spender von Schleimhautzellen des Oropharynx

Mukosazellen des Oropharynx wurden aus schmalen Schleimhautstreifen gewonnen, die nach Entfernung der Gaumenmandeln operationsbedingt randständig anliegen. Die Tonsillektomien wurden aufgrund rezidivierender Infektionen der Mandeln bzw. im Zusammenhang mit Hyperplasie der Tonsillen bei obstruktiver Schlafapnoe durchgeführt. Einerseits können entzündungsbedingte Veränderungen des Gewebes nicht vollständig vermieden werden, andererseits werden derartige Eingriffe nur im möglichst infektfreien Intervall durchgeführt. Diese Einflüsse sind jedoch in der Ergebnisbeurteilung zu berücksichtigen.

Die Lebenszeit einer Plattenepithelzelle beträgt in etwa 200 Stunden. Da Zellkerne in unverhorntem, mehrschichtigem Plattenepithel bis in die obersten Schichten gut erhalten sind, kann dieses Epithel für Genotoxizitätsuntersuchungen herangezogen werden. Es wird angenommen, dass Xenobiotika aktiv und passiv die oberste Zellschicht passieren können. Außerdem erfolgte die Probenentnahme aus allen Teilen des Oropharynx, sodass ein breites Spektrum an Zellen und Zellzyklen, entsprechend der *in vivo* Gegebenheiten, untersucht wurde.

4.1.3 Spender der Lymphozyten

Die untersuchten Lymphozyten entstammen peripherem Vollblut, der unter 4.1.1 und 4.1.2 genannten Spender. In der vorliegenden Arbeit wird weder zwischen kleinen, mittleren noch großen Lymphozyten unterschieden. Lymphozyten sind anerkannte Testzellen im Zusammenhang mit molekularbiologischen und toxikologischen Untersuchungen [Spitz et al., 2003]. In der Vergangenheit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Ergebnisse genotoxischer Effekte an Lymphozyten nicht mit den Resultaten, die an Schleimhautzellen derselben Spender gemessen wurden, korrelierten [Kleinsasser et al., 2000]. Lymphozyten scheinen somit keinen idealen Prädiktor zur Evaluierung genotoxischer Effekte an direkt betroffener Schleimhaut darzustellen. Lymphozyten fanden in der vorliegenden Arbeit dennoch Verwendung, einerseits zur Beurteilung des allgemeinen genotoxischen und zytotoxischen Potentials der gemessenen Substanzen an humanem Gewebe, andererseits um Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität von Schleimhautzellen und Lymphozyten eines Spenders vergleichen zu können und dadurch Studien, die nicht am Zielzellen der Karzinogene durchgeführt werden, zu hinterfragen.

Zur Frage nach der Abhängigkeit der Ergebnisse des Comet Assays vom Zellzyklus konnten Olive und Banath [1993] subtile Differenzen der Schweiflänge nach Bestrahlung und Reparatur der untersuchten Zellen feststellen. Zellen, die sich in der S-Phase befanden, benötigten die längste Zeit für die DNA-Reparatur. Da in den vorliegenden Untersuchungen die Zellen aus einem breiten Spektrum des Zellzyklus stammen kommt dies der *in vivo* Situation möglichst nahe. Zusätzlich wurde am Objektträger eine mäanderförmige Auswahl getroffen welche zur Randomisierung beitrug.

Die Dauer der Kryokonservierung der Lymphozyten in der vorliegenden Arbeit betrug maximal 4 Monate. Schmezer et al. zeigten 2001, dass die Kryokonservierung bis 12 Monate die Sensitivität der Lymphozyten nicht beeinträchtigt. Ebenso war die Reproduzierbarkeit mit dem Comet Assay möglich.

4.2 Diskussion der Methodik

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit ist die alkalische Mikrogelelektrophorese [Singh et al., 1988], auch Comet Assay genannt. Sie ist ein etabliertes Verfahren zur Detektion von Einzelstrangbrüchen der DNA, von alkalilabilen Stellen, DNA-Crosslinks sowie zur Messung von DNA-Reparatur [Tice et al., 2000]. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei 1 Strangbruch pro 10^{10} Dalton. Die alkalische Mikrogelelektrophorese weist viele Vorteile

gegenüber anderen Genotoxizitätsmessungen, wie z.B. dem Ames-Test oder dem Mikrokerntest, auf. Dazu zählen die geringe Anzahl benötigter Zellen (<10000), die kurze Testdauer, die einfache Durchführung, die gute Visualisierung und ihre Vielseitigkeit in der Testung eukaryonter und prokaryonter Zellen, welche nicht aus einer proliferativen Population stammen müssen [Kleinsasser et al., 2000, Harréus et al., 2002, Aoyama et al., 2003].

4.3 Genotoxizität von Umweltstoffen als exogene Risikofaktoren

4.3.1 Genotoxizität polyzyklisch aromatischer Kohlenwasserstoffe

Polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) sind anerkannte Umweltschadstoffe, die mutagen und kanzerogen wirken können. Ihr Hauptvertreter Benzo[a]pyren (B[a]P) wird in die Klasse 2A [IARC, 2001, Smith et al., 2000] der Kanzerogene eingeteilt und ist somit „wahrscheinlich krebserzeugend bei Menschen“. Um in der Zelle wirken zu können, muss B[a]P mittels Cytochrom P450 abhängiger Peroxidasen zu dem eigentlichen, die DNA-schädigenden Benzo[a]pyren-7,8-diol,-9,10-epoxid (BPDE) metabolisiert werden [Xie et al., 2003, Liang et al., 2003]. Als ultimatives Karzinogen verursacht BPDE Adduktbildungen mit möglichen Mutationen während der DNA-Replikation sowie eine Induktion von Strangbrüchen der DNA [Liang et al., 2003, Xie et al., 2003, Zhu et al. 2002]. Wie lange diese Metabolisierung bei Menschen dauert, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Lediglich *in vivo* Untersuchungen an Fischen zeigten zwei Tage nach Exposition mit B[a]P an Albumin gebundenes BPDE [Padros und Pelletier, 2000].

PAH sind in der Luft überwiegend an Feinstaubpartikel gebunden und gelangen über Inhalation und Ingestion in den Körper und passieren auf diesem Wege den Oropharynx. B[a]P kommt in Tabakrauch [Smith et al., 2000, Martin et al., 2003], in fossilen Brennstoffen (Kohle und Erdöl) sowie deren Produkten (Steinkohleteer, Bitumen, Asphalt, Otto- und Dieselkraftstoffe bzw. Heizöl) vor und bildet sich bei der unvollständigen Verbrennung organischen Materials. B[a]P führt bei exponierten Personen zu einer erhöhten Inzidenz von Malignomen des oberen Aerodigestivtraktes [Maier et al., 1999 und 1994]. In epidemiologischen Studien zeigte sich ebenso ein klarer Zusammenhang zwischen hohem Konsum PAH-haltiger, geräucherter Lebensmittel und dem Anstieg maligner Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes [Fritz und Soos, 1980, Alexandrov et al., 1996]. Miller [2000] konnte anhand von Versuchen an Mäusen die mutagenen Eigenschaften von B[a]P und

BPDE nachweisen. Diese DNA-Schäden können über Nukleotid- oder Basenexzisionsreparatur entfernt werden [Braithwaite et al., 1998].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten mit B[a]P jeweils geringere DNA-Fragmentierungen als mit BPDE. Aufgrund der relativ kurzen Einwirkzeit von B[a]P von einer Stunde kann es vermutlich nicht komplett zu BPDE umgewandelt werden, was wahrscheinlich für die Diskrepanz der vorliegenden Untersuchungen und einigen Studien mit deutlich kanzerogenerem Effekt von B[a]P verantwortlich ist.

Bei Lymphozyten führte sowohl B[a]P als auch BPDE zu einer stärkeren DNA-Fragmentierung. Speit konnte 2003 eine erhöhte Mutagensensitivität der Erbsubstanz von Lymphozyten gegenüber polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen nachweisen, auch in der vorliegenden Arbeit wurde dies, verglichen mit Schleimhautzellen deutlich.

Lymphozyten stellen somit keinen geeigneten Prädiktor für eine DNA-Schädigung an direkt exponierten Schleimhautzellen dar. In der Auswahl der Testzellen sollte dies künftig Berücksichtigung finden.

4.3.2 Genotoxizität von Nitrosaminen

Nitrosamine sind als potentiell karzinogene Verbindungen von der International Agency for Research on Cancer [IARC] anerkannt. Ein Hauptvertreter, das N-Nitrosodiethylamin (NDEA), wird als Kanzerogen der Gruppe 2A eingestuft. Substanzen dieser Gruppe sind definiert als „wahrscheinlich karzinogen bei Menschen“. Die in der vorliegenden Studie untersuchten Nicotinderivate N-Nitrosornicotin (NNN) und 4(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3pyridyl)1-butanone (NNK) stellen tabakspezifische Nitrosamine der Klasse 2B dar und sie sind somit „möglicherweise karzinogen bei Menschen“ [IARC 1987]. NNK stellte sich im Tierversuch als stärker kanzerogen als NNN heraus [Koppang et al., 1997].

Nitrosamine sind Präkarzinogene, d.h. sie müssen eine metabolische Aktivierung durchlaufen, um mutagen wirken zu können. Dies geschieht über α -Hydroxilierung durch die Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase. Die im Anschluss stark elektrophilen Diazohydroxide können mit der DNA stabile Addukte bilden und somit genotoxische Effekte auslösen. Einige Studien zeigten, dass die Metabolisierung von NNK über drei Wege verlaufen kann, Carbonyl-Reduktion, Pyridin-N-Oxidation und α -Hydroxylierung. Diese Bioaktivierung führt zu Pyridyloxobutyl- oder Methyl-DNA Addukten [Hecht et al., 1999]. Nitrosamine werden als leicht flüchtige Stoffe vorwiegend über die Atemwege aufgenommen. Da sie aber auch in Nahrungsmitteln, z.B. in gepökelten Waren, vorhanden sind [Knekt et al., 1999, Zou et al., 1994], stellt die Ingestion einen weiteren Aufnahmeweg

dar. Hauptquelle für die Nitrosaminbelastung stellt im Alltag der Tabakrauch dar [Abdel-Rahman et al., 2000], eine zusätzliche Belastung kann durch berufliche Exposition, z.B. in der Sprengstoff-, Leder-, Gummi- und Metallindustrie, hervorgerufen werden [Brown, 1999, Monarca et al., 2001, Sullivan et al., 1998]. Epidemiologische Studien an Arbeitern in der Gummiindustrie konnten eine Assoziation zwischen hoher Exposition gegenüber Nitrosaminen und einer erhöhten Mortalität an Ösophagus-, Mundhöhlen- und Pharynxkarzinomen zeigen [Straif et al., 2000]. Neben den epidemiologischen Studien konnte tierexperimentell Teratogenität [Park et al., 1992] und Mutagenität [Aiub et al., 2003, Brendler et al., 1992] nachgewiesen werden. Untersuchungen an Nagern zeigten die Kanzerogenität von NDEA, abhängig von der jeweiligen Expression der CYP-Enzyme [Pinto et al., 2001]. Für die im Tierversuch als kanzerogen getesteten tabakspezifischen Nitrosamine NNN und NNK [IARC 1998] gibt es Untersuchungen von Stoffwechselprodukten [Stepanov et al., 2005] aber noch wenige direkt an menschlichen Zellen.

In der vorliegenden Studie konnte die Genotoxizität von NDEA, NNN und NNK sowohl an humanen Lymphozyten als auch an Schleimhautzellen verifiziert werden. Auch hier zeigte sich die Lymphozyten-DNA als signifikant empfindlicher und somit nicht geeignet als Prädiktor für die DNA-Schädigung von Schleimhautzellen.

In vivo Untersuchungen an Miniorgankulturen durch Kleinsasser et al. [2001] bestätigten die Genotoxizität dieser Noxen an humanen nasalen Schleimhautzellen. Andere Untersuchungen konnten an Schleimhautzellen der Nase und der Tonsillen keine nennenswerte Genotoxizität von NDEA nachweisen. Allerdings wurde hier eine signifikante DNA-schädigende Wirkung der Epithelien der Mundhöhle und des Rachens, insbesondere von Patienten mit Karzinomerkrankung des oberen Aerodigestivtraktes und hohem chronischen Alkoholkonsum beobachtet [Harréus et al., 1999].

Da Nitrosamine inhalativ und ingestiv aufgenommen werden, ist es von besonderer Bedeutung, die Genotoxizität dieser Substanzen, sowie die lokale Reparaturkapazität am primären Kontaktorgan, dem Oropharynx, zu untersuchen. Die hier evaluierten genotoxischen Effekte an humaner Schleimhaut des Rachenraumes, konnten das kanzerogene Potential dieser Substanzgruppe bestätigen.

4.4 Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität als endogener Risikofaktor

4.4.1 Mutagensensitivität

Ein wichtiger Biomarker für die Entstehung von malignen Erkrankungen ist die Mutagensensitivität [Cloos et al., 1996, Yu et al., 1999]. Die Mutagensensitivität ist sehr individuell, je nach Aktivitätsrate der metabolisch aktivierten Karzinogene [Degawa et al., 1994] oder der Effizienz der Detoxifikation der oxidativen Radikale [Ray et al., 2002, Cerutti, 1994]. Die Mutagensensitivität ist altersunabhängig [Li et al., 2001]. Auch in den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich keine Abhängigkeit vom Alter der Patienten. Eine frühere Untersuchung an Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen wies auf erhöhte Mutagensensitivitäten für Patienten mit Malignom im Vergleich zu einer tumorfreien Kontrollgruppe hin und war Anlass für die vorliegende Studie [Harréus et al., 2000]. Zahlreiche vorangegangene Studien zur Mutagensensitivität wurden bisher an peripheren Lymphozyten durchgeführt [Rajae-Behbahani et al., 2001, Cheng et al., 1998, Sasiadek et al., 2002, Palyvoda et al., 2002, Choos et al., 1996]. Li beschrieb 2001 in einer Fall-Kontrollstudie mit Tumor- und Kontrollpatienten, dass die Menge an DNA-Addukten nach Inkubation von Lymphozyten mit BPDE als unabhängiger Risikofaktor für Kopf-Hals Tumore gelten könne. Auch die Arbeitsgruppe um Wu [2002] konnte eine erhöhte Mutagensensitivität als endogenen Risikomarker für prä maligne Läsionen des Kopf-Hals-Bereichs benennen, nachdem sie Lymphozyten mit BPDE und Bleomycin geschädigt hatten. Aus diesem Grund wurden von jedem Schleimhautspender auch Lymphozyten gewonnen, um die erzielten Resultate mit den Ergebnissen an Schleimhautzellen vergleichen zu können. Darüber hinaus existieren wenige Vergleichsstudien über die Mutagensensitivität von Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes mit peripheren Lymphozyten. Entgegen der Erwartung konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied der Mutagensensitivität gemessen an Schleimhautzellen und Lymphozyten von Patienten mit und Patienten ohne oropharyngeales Karzinom festgestellt werden. Es bleibt darauf hinzuweisen, dass Lymphozyten gegenüber PAH und N-Nitrosoverbindungen generell eine erhöhte Empfindlichkeit zeigen verglichen mit Schleimhautzellen.

Bei der Beurteilung dieser divergierenden Ergebnisse müssen die Unterschiede in Bezug auf Patientengruppen und untersuchte Zellen berücksichtigt werden. Dennoch erbrachte die Gegenüberstellung der Mutagensensitivität von Patienten mit Karzinom des oberen Aerodigestivtraktes und der von tumorfreien Kontrollpatienten keine signifikanten

Unterschiede, nachdem die jeweiligen Patientengruppen in Bezug auf Alter, Geschlecht, Alkohol- und Tabakkonsum abgeglichen wurden. Es scheint, dass die Mutagensensitivität auch abhängig ist vom eingesetzten Testverfahren, der gewählten Patientenpopulation sowie von den zu untersuchenden Zellen, um zu aussagekräftigeren Ergebnissen zu kommen.

4.5 DNA-Reparatur

Effektive DNA-Reparatur ist die Grundlage genetischer Integrität. Beim gesunden Individuum erfolgt die Beseitigung eines DNA-Schadens in der Regel uneingeschränkt, wenn dieser sich auf einen der beiden Einzelstränge der Doppelhelix beschränkt. Vorausgesetzt wird das Vorhandensein von intakten Enzymaktivitäten für die Exzision des beschädigten Nukleotids sowie für das Auffüllen und Schließen der Lücke in der DNA. Doppelstrangbrüche führen meist zum Zelltod. Zellen besitzen zwei Möglichkeiten dies zu verhindern. Entweder durch nicht homologes Verbinden der beiden Enden, unter Verlust mehrerer Nukleotide oder unter Verbindung homologer Enden aus der Kopie der zweiten Matrize in diploiden Zellen [Chan et al., 2006]. Folglich sind die individuellen Reparaturraten entscheidende Faktoren für die Möglichkeit einer Krebsentstehung [Berwick et al., 2000].

Für die Reparaturuntersuchungen an Schleimhautzellen und Lymphozyten wurde als Testsubstanz das bewährte Nitrosamin NDEA gewählt [Harréus et al., 2001]. Reparaturversuche mit Nitrosaminen, in der Konstellation mit gematchten Gruppen von Tumor- und tumorfreien Spender an humanen Schleimhautzellen und Lymphozyten existieren bisher nicht. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass NDEA reproduzierbare und vergleichbare DNA-Schäden an Lymphozyten und Schleimhautzellen verursacht, unabhängig davon ob diese von Tumor- oder tumorfreien Spendern stammen. Dies macht es zum geeigneten Kanzerogen für vergleichende DNA-Reparaturuntersuchungen dieser beiden Zellpopulationen.

Einige frühere Untersuchungen berichten über Unterschiede in der DNA-Reparatur nach metabolischer Stimulierung der Lymphozyten [Leroy et al., 1995]. Die Lymphozyten der vorliegenden Untersuchungen waren nicht stimuliert. Eine mögliche Erklärung für die divergierenden Ergebnisse ist die erhöhte Empfindlichkeit stimulierter Lymphozyten die sich zum größten Teil in einer Zellzyklusphase befinden [Olive et al., 1993]. Einige Genotoxizitätsuntersuchungen an Lymphozyten von Tumor- und tumorfreien Spendern des oberen Aerodigestivtraktes konnten vermehrt Strangbrüche und reduzierte DNA-Reparatur

bei Tumorpatienten nachweisen [Wu et al., 1998, Li et al., 2001], dies konnte allerdings durch vorliegende Untersuchungen nicht eindeutig bestätigt werden.

4.6 DNA-Reparaturkapazität

Während die Mutagensensitivität wider Erwarten kein Risikofaktor für die Entstehung maligner Läsionen im hier verwendeten Testsystem war, wurde die DNA-Reparatur als ein weiterer möglicher endogener Marker in der Kopf-Hals-Karzinogenese untersucht. Einen bedeutenden Faktor zur Risikoabschätzung des individuellen Krebsrisikos stellt die DNA-Reparaturkapazität dar. Die DNA-Reparaturkapazität beschreibt den Anteil reparierter DNA nach einer definierten Fremdstoffschädigung innerhalb eines festgelegten Zeitraums. Ein Vergleich von DNA-Reparaturkapazitäten von Lymphozyten und Oropharynxepithelzellen von Tumor- und tumorfreien Spendern wurde so bislang noch nie durchgeführt und bildete die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

4.6.1 DNA-Reparaturkapazität von Schleimhautzellen

Die Reparaturkapazität der Mukosazellen von Tumorpatienten war nach 30 minütiger Reparaturdauer deutlich geringer als bei Kontrollpatienten. Diese Ergebnisse sollten in größeren Kollektiven überprüft werden, um diesen Trend zu bestätigen. Anhand dieser Ergebnisse kann man vermuten, dass ein Abfall der Reparaturkapazität in den Zielzellen des Kopf-Hals-Bereichs einen endogenen Risikofaktor für die Entstehung von Malignomen des oberen Aerodigestivtraktes darstellt. Des Weiteren wird immer häufiger eine Chemoprävention mit schützenden Agenzien beschrieben um das Risiko, ein Kopf-Hals-Karzinoms zu entwickeln, reduzieren zu können [Glover KY et al., 2003, Papadimitrakopoulou, 2002, Tsao et al., 2004]. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen ist, abhängig vom verwendeten Testsystem, der Einsatz von Zielzellen für die Untersuchung der DNA-Reparaturkapazität als endogener Risikofaktor in der Karzinogenese des oberen Aerodigestivtraktes zu empfehlen.

4.6.2 DNA-Reparaturkapazität von Lymphozyten

Über den angenommenen Rückgang der DNA-Reparaturkapazität bei Krebspatienten gibt es viele Studien und Erklärungsversuche [Berwick et al., 2000, Shi et al., 2004, Kovacs et al., 1991]. Anhand dieser Ergebnisse sollten krebgefährdete Menschen frühzeitig erkannt werden. Cheng et al. berichtete 1998, dass eine verminderte DNA-Reparaturkapazität, gemessen an Lymphozyten, als unabhängiger Risikofaktor für Kopf-Hals-Tumore zu werten sei. In der Vergangenheit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Reparatur an Lymphozyten nicht mit den Resultaten, die an Schleimhautzellen derselben Spender gemessen wurden, korrelierten [Dhillon et al., 2004, Harréus et al., 2001]. Auch die vorliegende Ergebnisse mit dem Comet Assay zeigten keine Unterschiede in der Reparaturkapazität der Lymphozyten in beiden Spendergruppen. Lymphozyten sind somit nicht als geeigneter Prädiktor der individuellen DNA-Reparaturkapazität zu werten, Untersuchungen sollte direkt an den Zellen der Karzinogenexposition durchgeführt werden.

4.6.1.1 Reparaturkapazität und Alkohol- und Tabakkonsum

Exogene Risikofaktoren wie Alkohol- und Tabakkonsum spielen eine bedeutende Rolle für die individuelle Reparaturkapazität und Mutagensensitivität [Lagiou et al., 2005, Levi, 1999]. Die IARC hat im Rahmen der Neubewertung der Folgen des Konsums alkoholischer Getränke auf den Menschen im Februar 2007 pauschal „Ethanol in alkoholischen Getränken“ als karzinogen für den Menschen, d.h. in die Gruppe 1 eingestuft. Es fand sich ein kausaler Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum des Menschen und Krebserkrankungen der Mundhöhle, des Pharynx, des Larynx und andere Organe [Boffetta et al., 2006]. Gegenüber der früheren Bewertung aus dem Jahre 1988 sah es die IARC als gesichert an, dass Ethanol und nicht andere Bestandteile oder Kontaminationen für die Karzinogenität von alkoholischen Getränken verantwortlich sind.

Chronischer Alkoholkonsum nimmt Einfluss auf die Reparaturkapazität, abhängig von der Genetik und den weiteren Umwelteinflüssen des Individuums [Rossit et al., 2002, Asakage et al. 2007]. Ursächlich ist an eine Zellschädigung durch Alkohol und seine Abbauprodukte, wie seinen Hauptmetabolit Acetaldehyd sowie durch Sauerstoffradikale zu denken. Bewiesen ist eine Enzyminduktion von Cytochrom P450 2E1 durch chronischen Alkoholkonsum [Lucas et al., 2001]. Hieraus folgt die vermehrte Toxifizierung der Xenobiotika welche zu höheren Mutationsraten, sowie vermehrten DNA-Addukten führt. Des weiteren erhöht

Ethanol die Zellpermeabilität für Umweltstoffe [Kishikawa et al., 2005]. Dies sind einige Erklärungen der Kokarzinogenität von Alkohol und Tabakkonsum.

Das Krebsrisiko steigt mit der aufgenommenen Alkoholmenge. Ein Zusammenhang mit der Art des aufgenommenen Alkohols konnte nicht hergestellt werden. Schon frühere Untersuchungen zeigten bei chronisch hohem Alkoholkonsum (>40g/Tag) relevant erhöhte DNA-Strangbruchraten in Schleimhautzellen verglichen mit niedrigem Alkoholkonsum [Harréus at al., 1999]. In der vorliegenden Studie konnte außerdem eine signifikant verminderte DNA-Reparaturkapazität bei chronisch hohem Alkoholkonsum (>63mg/d) nachweisen werden. Die beste Prävention wäre somit den Alkoholkonsum zu minimieren, da regelmäßiger Konsum selbst kleinster Mengen alkoholischer Getränke Studien zufolge das generelle Krebsrisiko erhöht.

5. Zusammenfassung

Die Inzidenz und Mortalität bösartiger Tumore des oberen Luft- und Verdauungstraktes sind ungeachtet verbesserter diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten in den letzten Jahren weitgehend konstant geblieben. Dies beruht einerseits auf dem anhaltenden Konsum bekannter Risikofaktoren wie Tabakrauch und Alkohol, andererseits auch auf der Exposition gegenüber zahlreichen Umwelt- und Arbeitsstoffen, deren krebserregende Wirkung bislang wenig bekannt ist.

Neben derartigen exogenen Risikofaktoren tritt die Bedeutung endogener, genetischer Voraussetzungen für die Entstehung von Malignomen im oberen Aerodigestivtrakt zunehmend in den Vordergrund. Da potentiell krebserregende Substanzen unterschiedliche Auswirkungen auf die jeweils exponierten Personen haben können, ist die Evaluierung genetischer Empfindlichkeit (sog. Suszeptibilität) von besonderer Bedeutung. Dazu zählt die Sensibilität der DNA gegenüber Fremdstoffen und die Fähigkeit derartige DNA-Schäden zu reparieren. Entsteht ein Ungleichgewicht mit eingeschränkter DNA-Reparatur, kann es zu Mutationen mit nachfolgendem Tumorwachstum kommen.

Als exogener Risikofaktor wurde die Genotoxizität ausgewählter Stoffe an Schleimhautzellen und Lymphozyten getestet. Als endogene Risikofaktoren wurden die individuelle Mutagensensitivität, d.h. die individuelle Empfindlichkeit gegenüber einem Fremdstoff, sowie die Reparaturkapazität in dieser gematchten Fall-Kontrollstudie mit männlichen Oropharynxkarzinompatienten und männlichen tumorfreien Kontrollpatienten anhand von Tabakinhaltsstoffen (polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen und N-Nitrosoverbindungen) untersucht.

Die alkalische Version der Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) ist ein Kurzzeittestverfahren und dient dem Nachweis von DNA-Schäden (Genotoxizität) in Einzelzellen nach Exposition gegenüber einer möglicherweise krebserregenden Verbindung. Genotoxische Substanzen rufen u.a. DNA-Strangbrüche hervor, die sich im elektrischen Spannungsfeld der Elektrophorese in einem kometenähnlichen Muster darstellen. Mit Hilfe dieser Methode konnte an humanen Zellen des Oropharynx, sowie an Lymphozyten die DNA-schädigende Wirkung von polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen (B[a]P und BPDE) sowie der Nitrosamine (NDEA, NNN und NNK) untersucht werden. Diese Tabakinhaltsstoffe zeigten signifikante Schäden sowohl an humanen Lymphozyten als auch an Schleimhautzellen des Rachens von Patienten mit und ohne Karzinom des Oropharynx.

Bezüglich der Mutagensensitivität konnte weder an Schleimhautzellen noch an Lymphozyten ein Unterschied der beiden Spendergruppen nachgewiesen werden. Der Widerspruch zu früheren Studien könnte mit dem in dieser Arbeit durchgeführten Matching der Patientengruppen unter Berücksichtigung des individuellen Alkohol- und Tabakkonsums sowie des Alters und des Geschlechts zusammenhängen.

Als zweiten endogenen Marker wurde die DNA-Reparaturkapazität untersucht. Hiermit wird die Fähigkeit einer Zelle beschrieben, eine DNA-Schädigung in einem festgelegten Zeitraum zu beheben. Mithilfe des Tabakkarzinogens NDEA wurde die DNA-Reparaturkapazität als prozentualer Anteil reparierter DNA 15, 30, und 60 Minuten nach Schädigung an Lymphozyten gemessen und 15 und 30 Minuten nach Schädigung an Schleimhautzellen. Die DNA-Reparaturkapazität war bei Lymphozyten der Oropharynxkarzinompatienten vergleichbar mit jener der tumorfreien Probanden. Im Gegensatz dazu kam es bei oropharyngealen Schleimhautzellen der Tumorpatienten zu einem Abfall der Reparaturkapazität verglichen mit den Schleimhautzellen tumorfreier Spender. An Zielzellen der Krebsentstehung des oberen Aerodigestivtraktes, den Schleimhautzellen, konnte somit erstmals eine verringerte DNA-Reparaturkapazität als möglicher genetischer Risikofaktor nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse erfordern die genaue Evaluierung der genetischen Ursachen für die reduzierte DNA-Reparatur von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen. Neben der Reduktion einer Exposition gegenüber den getesteten Noxen sollten darüber hinaus künftig weitere Arbeits- und Umweltschadstoffe an den Zielzellen der humanen Karzinogenese getestet werden.

6. Literatur

- Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.* 2000 Oct 16;159(1):63-71.
- Agirre X, Novo FJ, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Lahortiga I, Valganon M, Garcia-Delgado M, Vizmanos JL. TP 53 is frequently altered by methylation, mutation, and/or deletion in acute lymphoblastic leukaemia. *Mol Carcinog.* 2003 Dez;38(4):201-8.
- Aiub CA, Pinto LF, Flezenswalb I. N-Nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. *Toxicol Lett.* 2003 Nov 1;145(1):36-45.
- Alexandrov K, Rojas M, Kadlubar FF, Lang NP, Bartsch H. Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. *Carcinogenesis.* 1996 Sep;17(9):2081-3.
- Anderson D, Yu TW, McGregor DB. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis* 1998 Nov; 13(6):539-55. Review.
- Aoyama K, Iwahori K, Miyata N. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. *Mutat Res.* 2003 Jul 8;538(1-2):155-62.
- Asakage T, Yokoyama A, Haneda T, Yamazaki M, Muto M, Yokoyama T, Kato H, Igaki H, Tsujinaka T, Kumagai Y, Yokoyama M, Omori T, Watanabe H. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases, and drinking, smoking and diet in Japanese men with oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2007 Apr; 28(4):865-74. Epub 2006 Oct 27.
- Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Browne MA. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of the tail length and moment. *Mutagenesis.* 1995 Mar;10(2):85-90.
- Auperin A, Hill C. Epidemiology of head and neck carcinomas. *Cancer Radioth.* 2005 Feb;9(1):1-7. Epub 2005 Jan 18.
- Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Res.* 1998 Jul 31;415(3):167-84.
- Berwick M, Vineis P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jun 7;92(11):874-97.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988 Jun 1;48(11):3282-7.
- Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006 Feb;7(2):149-56.

- Bohr VA. DNA damage and its processing relation to human disease. *J Inherit Metab Dis.* 2002 May;25(3):215-22.
- Born IA, Zoller J, Weidauer H, Maier H. Effects of chronic alcohol drinking on mouth mucosa. A morphometric study. *Laryngorhinootologie.* 1996 Dec;75(12):754-8.
- Bosch FX, Cardis E. Black tobacco and cancer: introducing an epidemiological review. *Eur J Cancer.* 1991 ;27(11):1345-8.
- Boyle P, Macfarlane GJ, Blot WJ, Chiesa F, Lefebvre JL, Azul AM, de Vries N, Scully C. European School of Oncology Advisory report to the European Commission for the Europe Against Cancer Programme: oral carcinogenesis in Europe. *Eur J Cancer Oral Oncol.* 1995 Mar;31B(2):75-85. Review.
- Braithwaite E, Wu X, Wang Z. Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis.* 1998 Jul;19(7):1239-46.
- Brendler SY, Tompa A, Hutter KF, Preussmann R, Pool-Zobel BL. In vivo and in vitro genotoxicity of several N-nitrosamines in extrahepatic tissues of the rat. *Carcinogenesis.* 1992 Dec;13(12):2435-41.
- Brown JL. N-Nitrosamines. *Occup Med* 1999;14(4): 839-48.
- Bundesministerium für Arbeit und Sozialordnung im Bundesarbeitsblatt BArbBl. 10/89 S. 58 TRK-Wert für BaP. www.umwelt-online.de
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003 Apr 24;348(17):1625-38.
- Cerutti P.A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet.* 1994 Sep 24;344(8926):862-3.
- Chan KK, Zhang QM, Dianov GL. Base excision repair fidelity in normal and cancer cells. *Mutagenesis.* 2006 Apr 13;
- Cheng L, Eicher SA, Guo Z, Hong WK, Spitz MR, Wei Q. Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Jun;7(6):465-8.
- Clements C, Ralph S, Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ Mol Mutagen.* 1997;29(3):277-88.
- Cloos J, Spitz MR, Schantz SP, Hsu TC, Zhang ZF, Tobi H, Braakhuis BJ, Snow GB. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *J Nat Cancer Inst.* 1996 Apr 17; 88(8):530-5.
- Coutelle C, Ward PJ, Fleury B, Quattrocchi P, Chambrin H, Iron A, Couzigou P, Cassaigne A. Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms. *Hum Genet.* 1997 Mar; 99(3):319-25.

- Degawa M, Stern SJ, Martin MV, Guengerich FP, Fu PP, Ilett KF, Kaderlik RK, Kadlubar FF. Metabolic activation and carcinogen-DNA adduct detection in human larynx. *Cancer Res.* 1994 Sep 15;54(18):4915-9.
- Devi KD, Banu BS, Mahboob M, Jamil K, Grover P. In vivo genotoxic effect of cadmium chloride in mice leukocytes using comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2001;21(5):325-33.
- Dhillon VS, Thomas P, Fenech M. Comparison of DNA damage and repair following radiation challenge in buccal cells and lymphocytes using single-cell gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol.* 2004 Jul;80(7):517-28.
- Dietz A, Maier H. Syncarcinogenesis. Occupation and cancer of the head-neck area. *HNO.* 1999 Aug;47:684-7.
- Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med.* 2000 Feb;29(2):80-5.
- Eisenbrand G, Blankart M, Sommer H, Weber B. N-nitrosoalkanolamines in cosmetics. *IARC Sci Publ.* 1991;(105):238-41.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KH. The comet assay: a comprehensive review. *Mut Res.* 1995 Feb;339(1):37-59.
- Franceschi S, Dal Maso L, Levi F, Conti E, Talamini R, La Vecchia C. Leanness as early marker of cancer of the oral cavity and pharynx. *Ann Oncol.* 2001 Mar;12(3):331-6.
- Frei E, Kuchenmeister F, Gliniorz R, Breuer A, Schmezer P. N-nitrosodimethylamine is activated in microsomes from hepatocytes to reactive metabolites which damage DNA of non-parenchymal cells in rat liver. *Toxicol Lett.* 2001 Sep 15;123(2-3):227-34.
- Fritz W, Soos K. Smoked food and cancer. *Bibl Nutr Dieta.* 1980;(29):57-64.
- Gravel S, Jackson SP. Increased genome instability in aging yeast. *Cell* 2003 Oct 3;115(1):1-2.
- Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 May;128(5):674-80.
- Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WN, Ramaekers FC, Hopman AH, Manni JJ. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer.* 2003 Nov 10;107(3):394-400.
- Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J, Creson N, Lindholm J, Ye W, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer.* 2006 Dec 1;119(11):2620-3.

- Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G. A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res.* 1997 Apr 24;390(1-2):179-88.
- Harréus UA, Kastenbauer ER, Wallner BC, Kleinsasser NH. The single cell microgelelectrophoresis technique in ecogenotoxicology. *Laryngorhinootologie.* 2002 Jul;81(7):528-33.
- Harréus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER, Kleinsasser NH. DNA repair in mucous membrane cells and lymphocytes with the comet assay. *Laryngorhinootologie.* 2001 Jan;80(1):23-6.
- Harréus UA, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H. Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract. *Laryngorhinootologie.* 1999 Apr;78(4):176-81.
- Hecht SS, Hoffmann D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis.* 1988 Jun; 9(6):875-84.
- Hecht SS. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res.* 1999 Mar 8;424(1-2):127-42. Review.
- Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sirdhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijder PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S; IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Dec 3;95 (23):1772- 83.
- Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct 15;66(8):1527-35.
- Hong JY, Yang CS. Genetic polymorphism of cytochrom P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity. *Environ Health Perspect.* 1997 Jun;105 Suppl 4:759- 62.
- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG, Hewer A, Phillips DH, Ryberg D, Haugen A, Harris CC. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res.* 2001 Sep 1;61(17):6350-5.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Tobacco smoking and tobacco smoke (Group1) 5. Summary of Data Reported and Evaluation. *Monographs Vol. 83 (2002), Vol.17(1978) p. 83.*
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Benzo[a]pyren. *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. IARC (1983b) 32: 211-237*
- International Agency for Research on Cancer (IARC). N-Nitrosodiethylamine (NDEA). *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC (1978): 83-124.*

- International Agency for Research on Cancer (IARC). N'-Nitrosornicotine (NNN). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC (1985a) 37: 241-261.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC (1985b): 209-223.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Overall evaluations of carcinogenicity to humans. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC (1987) 32 (Suppl. 7).
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Consumption of alcoholic beverages. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC (1988/2007) 44 and 96.
- Jaloszynski P, Jaruga P, Olinski R, Biczysko W, Szyfter W, Nagy E, Moller L, Szyfter K. Oxidative DNA base modifications and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts in squamous cell carcinoma of larynx. *Free Radic Res.* 2003 Mar;37(3):231-40.
- Kabat GC, Chang CJ, Wynder EL. The role of tobacco, alcohol use, and body mass index in oral and pharyngeal cancer. *Int J Epidemiol.* 1994 Dec;23(6):1137-44.
- Kazerouni N, Sinha R, Hsu CH, Greenberg A, Rothman N. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol.* 2002 Jan;40(1):133.
- Kishikawa H, Miura S, Nishida J, Nakano M, Hirano E, Sudo N, Morishita T, Ishii H. Ethanol-induced CXC-chemokine synthesis and barrier dysfunction in intestinal epithelial cells.
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK, Harréus UA. Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutat Res.* 2000 Apr 13;467(1):21-30.
- Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harréus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER, Huber RM. Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2001 May-Jun;63(3):141-7.
- Knudsen LE, Lost SH, Auturp H. Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutat Res.* 2001 Oct 1;482(1-2):83-8.
- Knekt P, Jarvinen R, Dich J, Hakulinen T. Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int J Cancer.* 1999 Mar 15;80(6):852-6.

- Koppang N, Rivenson A, Dahle HK, Hoffmann D. A study of tobacco carcinogenesis, LIII: carcinogenicity of N'-nitrosonornicotine (NNN) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in mink (*Mustela vison*). *Cancer Lett.* 1997 Jan 1;111(1-2):167-71.
- Kovacs E, Langenmann H. Differences in the kinetics of DNA repair in cancer patients and healthy controls. *Oncology.* 1991;48(4):312-6.
- Kuchenmeister F. Die MGE: eine schnelle und sensitive Methode zum Nachweis von DNA-Schäden in Einzellzellen. Diplomarbeit, vorgelegt der Fakultät für Biologie der Rupprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 1991.
- Lagiou P, Adami HO, Trichopoulos D. Causality in cancer epidemiology. *Eur J Epidemiol.* 2005;20(7):565-74.
- Lamarche F, Gonthier B, Signorini N, Eysseric H, Barret L. Acute exposure of cultured neurones to ethanol results in reversible DNA single-strand breaks; whereas chronic exposure causes loss of cell viability. *Alcohol Alcohol.* 2003 Nov-Dec;38(6):550-8.
- Lang M, Pelkonen O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Sci Publ.* 1999;(148):13-22.
- Leroy T, Lison D, Lauwerys R. Preliminary in vitro investigation into the use of alkaline elution assay for the biomonitoring of humans exposed to genotoxic agents. *Hum Exp Toxicol.* 1995 Jan;14(1):61-8.
- Levi F. Cancer prevention: epidemiology and perspectives. *Eur J Cancer.* 1999 Dec ;35(14):1912-24.
- Liang Z, Lippman SM, Kawabe A, Shimada Y, Xu XC. Identifikation of benzo[a]pyrene diol epoxide-binding DNA fragments using DNA immunoprecipitation technique. *Cancer Res.* 2003 Apr. 1;63(7):1470-4.
- Lieber CS. The microsomal ethanol oxidizing system: its role in ethanol and xenobiotic metabolism. *Biochem Soc Trans.* 1988 Jun;16(3):232-9.
- Li D, Firozi PF, Chang P, Wang LE, Xiong P, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Hong WK, Wei Q. In vitro BPDE-induced DNA adducts in peripheral lymphocytes as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer.* 2001 Aug 1;93(3):436-40.
- Lucas D, Ferrara R, Gonzales E, Albores A, Manno M, Berthou F. Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. *Toxicol Lett.* 2001 Oct 15;124(1-3):71-81.
- Martin LA, Byrd SK, Milofsky RE. Rapid communication: effects of tobacco processing on the quantity of benzo[a]pyrene in mainstream smoke. *J Toxicol Environ Health A.* 2003 Jul 25;66(14):1283-6.
- Miyazaki M, Ohno S, Futatsugi M, Saeki H, Ohga T, Watanabe M. The relation of alcohol consumption and cigarette smoking to the multiple occurrence of oesophageal dysplasia and squamous cell carcinoma. *Surgery.* 2002 Jan;131(1 Suppl):S7-S13.

- Maier, Sennewald E. Plattenepithelkarzinome. Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich-Ergebnisse der Heidelberger Fallkontrollstudie. Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG), Sankt Augustin 1994.
- Maier H, Tisch M, Beruf und Krebs im Kopf-Hals-Bereich. HNO (1999)47:1025-1037.
- Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. Clin Investig. 1992 Mar-Apr;70(3-4):320-7.
- Mayer C, Popanda O, Zelezny O, von Brevern MC, Bach A, Bartsch H, Schmezer P. DNA repair capacity after gamma-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes. DNA Repair (Amst). 2002 Mar 28;1(3):237-50.
- Meskar A, Plee-Gautier E, Amet Y, Berthou F, Lucas D. Alcohol-xenobiotic interactions. Role of cytochrome P450 2E1 Pathol Biol. 2001 Nov;49(9):696-702.
- Miller ML, Vasunia K, Talaska G, Andringa A, de Boer J, Dixon K. The tumor promoter TPA enhances benzo[a]pyren and benzo[a]pyren diol epoxide mutagenesis in Big Blue mouse skin. Environ Mol Mutagen. 2000;35(4):319-27.
- Monarca S, Feretti D, Zanardini A, Moretti M, Villarini M, Spiegelhalder B, Zerbini I, Gelatti U, Lebbolo E. Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses. Mutat Res. 2001 Feb 20;490(2):159-69.
- Nieto A, Sanchez MJ, Martinez C, Castellsague X, Quintana MJ, Bosch X, Conde M, Munoz N, Herrero R, Franceschi S. Lifetime body mass index and risk of oral cavity and oropharyngeal cancer by smoking and drinking habits. Br J Cancer. 2003 Nov 3; 89(9):1667-71.
- Olive PL, Banath JP. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. Mutat Res. 1993 Oct;294(3):275-83.
- Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banath JP. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. Exp Cell Res. 1992 Feb;198(2):259-67.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA-damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communication. 1984 Vol. 123, p.291-298.
- Palyvoda O, Mukalov I, Polanska J, Wygoda A, Drobot L, Widel M, Rzeszowska-Wolny J. Radiation-induced DNA damage and its repair in lymphocytes of patients with head and neck cancer and healthy donors. Anticancer Res. 2002 22:1721-1725.
- Park EH, Kim DS, Chang HH. Teratogenic effects of N-nitrosodiethylamine in embryos of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. Teratog Carcinog Mutagen. 1992;12(3):129-33.

- Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P.
Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002 Oct 21;21(48):7435-51.
- Padros J, Pelletier E. In vivo formation of (+)-anti-benzo[a]pyrene diol-epoxid-plasma albumin adducts in fish. *Mar Environ Res*. 2000 Jul-Dec;50(1-5):347-51.
- Phillips HJ. Dye exclusion test for all viability. In Kruse PF et al.,(Hrsg.):Tissue culture, Academic Press, New York; 1973:407-408.
- Pinto LF, Moraes E, Albano RM, Silva MC, Godoy W, Glisovic T, Lang MA.
Rat oesophageal cytochrome P450 (CYP) monooxygenase system: comparison to the liver and relevance in N-nitrosodiethylamine carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2001 Nov;22(11):1877-83.
- Pool-Zobel B.L., Klein R.G., Liegibel U.M., Kuchenmeister F., Weber S., Schmezer P.
Systemic genotoxic effects of tobacco-related nitrosamines following oral and inhalational administration to Sprague-Dawley rats. *Clin. Invest*. 1992 70: 299-306.
- Puisieux A, Lim S, Groopman J, Ozturk M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res*. 1991 Nov 15;51(22):6185-9.
- Ptacek O, Stavreva DA, Kim JK, Gichner T. Induction and repair of DNA damage as measured by the Comet assay and the yield of somatic mutations in gamma-irradiated tobacco seedlings. *Mutat Res*. 2001 Apr 5;491(1-2):17-23.
- Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol*.2002 Nov;40(11):1213-32.
- Riedel F, Goessler U, Hormann K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003 Aug;17(4):543-55.
- Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swed Dent J Suppl*.2005;(179):1-66.
- Rossit AR, Cabral IR, Hackel C, da Silva R, Froes ND, Abdel-Rahman SZ.
Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. *Cancer Lett*. 2002 Jun 28;180(2):173-82.
- Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA-strand breaks in single mammalian cells. In: DNA repair mechanisms. Hanawald, P.C. Friedberg, E.C. Fox, C.F. (Hrsg.), Academic Press, London, 1978:465-468.
- Sasiadek M, Schlade-Bartusiak K, Zych M, Noga L, Czemarmazowicz H. Opposite responses in two DNA repair capacity tests in lymphocytes of head and neck cancer patients. *J Appl Genet*. 2002 43:525-534.
- Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*. 2003 Nov;544(2-3):99-106.

- Schmezer P, Rupprecht T, Tisch M, Maier H, Bartsch H. Laryngeal mucosa of head and neck cancer patients shows increased DNA damage as detected by single cell microgel electrophoresis. *Toxicology*. 2000 Apr 3;144(1-3):149-54.
- Schlesinger-Raab A, Lang S, Steuer-Vogt MK, Hölzel D. Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Malignome. In: *Manual Kopf-Hals-Malignome* (2003), Tumorzentrum München: 3-14.
- Schmezer P, Rajaei-Behbahani N, Risch A, Thiel S, Rittgen W, Drings P, Dienenmann H, Kayser KW, Schulz V, Bartsch H. Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2001 Jan;16(1):25-30.
- Schmitt M, Doffoel M, Diebold-Simoni P, Toussaint JL, Kempf J. Reduced benzo-a-pyrene activation potential in lymphocytes from chronic alcoholics. *Alcohol*. 1990 Mar-Apr;7(2):137-43.
- Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA. Alcohol and cancer. *Recent Dev Alcohol*. 1998; 14:67-95. Review.
- Shi Q, Wang LE, Bondy ML, Brewster A, Singletary SE, Wei Q. Reduced DNA repair of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced adducts and common XPD polymorphisms in breast cancer patients. *Carcinogenesis*. 2004 Sep;25(9):1695-700.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 175:184-191.
- Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgeman A, Doolittle DJ. "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol*. 2000 Apr;38(4):371-83.
- Speit G, Witton-Davies T, Heepchantree W, Trenz K, Hoffmann H. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat Res*. 2003 Dec 9;542(1-2):33-42.
- Spitz MR, Wie Q, Dong Q, Amos CI, Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 12:689-698.
- Stepanov I, Hess SS. Tobacco-specific nitrosamines and their pyridine-N-glucuronides in the urine of smokers and smokeless tobacco users. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Apr; 14(4):885-91
- Straif K, Weiland SK, Bungers M, Holthenrich D, Taeger D, Yi S, Keil U. Exposure to high concentrations of nitrosamines and cancer mortality among a cohort of rubber workers. *Occup Environ Med*. 2000 Mar;57(3):180-7.
- Sullivan PA, Eisen EA, Woskie SR, Kriebel D, Wegman DH, Hallock MF, Hammond SK, Tolbert PE, Smith TJ, Monson RR. Mortality studies of metalworking fluid exposure in the automobile industry: VI. A case-control study of esophageal cancer. *Am J Ind Med*. 1998 Jul;34(1):36-48.

- Szekely G, Remenar E, Kasler M, Gundy S. Mutagen sensitivity of patients with cancer at different sites of the head and neck. *Mutagenesis*. 2005 Aug 16.
- Terris DJ, Ho EY, Ibrahim HZ, Dorie MJ, Kovacs MS, Le QT, Koong AC, Pinto HA, Brown JM. Estimating DNA repair by sequential evaluation of head and neck tumor radiative sensitivity using the comet assay. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg*. 2002 Jun;128(6):698-702.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35(3):206-21.
- Trichopoulos D, Li FP, Hunter DJ. What causes cancer? Review. *Sci Am*. 1996 Sep;275(3):80-7.
- La Vecchia C, Boyle P. Trends in the tobacco-related cancer epidemic in Europe. *Cancer Detect and Prev*. 1993;17(4-5):495-506.
- Vlajinac HD, Marinkovic JM, Sipetic SB, Andrejic DM, Adanja BJ, Stosic-Divjak SL. Case-control study of oropharyngeal cancer. *Cancer Detect Prev*. 2006;30(2):152-7. Epub 2006 Apr 27.
- Vilenchik MM, Knudson AG. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 28;100(22):12871-6. Epub 2003 Oct 17.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical Carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2004 Dec;14(6):473-86.
- Wu X, Gu J, Hong WK, Lee JJ, Amos CI, Jiang H, Winn RJ, Fu KK, Cooper J, Spitz MR. Benzo[a]pyrene diol epoxide and bleomycin sensitivity and susceptibility to cancer of upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Aug 4;91(15):1334-6.
- Xie Z, Braithwaite E, Guo D, Zhao B, Geacintov NE, Wang Z. Mutagenesis of benzo[a]pyrene diol epoxide in yeast: requirement for DNA polymerase zeta and involvement for DNA polymerase eta. *Biochemistry*. 2003 Sep 30;42(38):11253-62.
- Yu D, Berlin JA, Penning TM, Field J. Reactive oxygen species generated by PAH o-quinones cause change-in-function mutations in p53. *Chem Res Toxicol*. 2002 Jun;15(6):832-42.
- Yu GP, Zhang ZF, Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP. Family history of cancer, mutagen sensitivity, and increased risk of head and neck cancer. *Cancer Lett*. 1999 Nov. 1;146(1):93-101.
- Zhang LF, Hemminki K, Szyfter K, Szyfter W, Soderkvist P. p53 mutations in larynx cancer. *Carcinogenesis*. 1994 Dec;15(12):2949-51.
- Zhu Y, Spitz MR, Zheng YL, Hong WK, Wu X. BPDE-induced lymphocytic 3p21.3 aberration may predict head and neck carcinoma risk. *Cancer* 2002 Aug 1;95(3):563-8.

Zou XN, Lu SH, Liu B. Volatile N-nitrosamines and their precursors in Chinese salted fish-a possible etological factor for NPC in china. *Int J Cancer*. 1994 Oct 15;59(2):155-8.

7. Anhang

7.1 Anamnesen der Probenspender

Tabelle 3: Kontrollpatienten, Anamnesen der Spender oropharyngealer Schleimhaut und Blut für die Lymphozytenuntersuchung.

Nr.	Alter	BMI	Diagnose	Zig/d	PY	Alkohol g/d	Berufsnoxen	Beruf/Tätigkeit
7	36	25	Peritonsillarabszeß li.	30	21	4 g	Lösungsmittel	Kommunikationselektroniker
8	33	25	chron. Tonsillitis	30	10	25 g	-	Lagerarbeiter
13	40	24	chron. Tonsillitis	15	20	1 g	-	Einzelhandelskaufmann
15	50	27	Peritonsillarabszeß	10	k.A.	C ₂ Abusus	-	Elektromechaniker
16	61	33	Gaumenpapillom	50-60	80	100 g	Chemie	Selbstständig
28	32	21	Peritonsillarabszeß re.	60	k.A.	41 g	-	i.v.Drogenabusus
29	36	28	chron. Tonsillitis	3	k.A.	12,5 g	-	Angestellter im Büro
52	58	29	UPPP/TE	20	20	(30 a) 25 g	Zement-/Glas-/Pulverstaub	Glaser/ Farbenhersteller
62	51	24	UPPP/TE	20	35	12,5 g	-	Kaufmann
65	52	33	chron. Tonsillitis	3 Pfeifen	>20	25 g	Kohlestaub	Kohlenhändler/ Beamter
67	47	27	Peritonsillarabszeß	8 Pfeifen	k.A.	25 g	-	EDV Arbeiter
68	42	29	Schlafapnoe-Syndrom	40	50	1 g	-	Personalreferent
69	54	22	chron. Tonsillitis	25	38	25 g	Metalle	Angestellter bei Audi
76	63	27	UPPP/TE	40	k.A.	50 g	-	k.A.
79	54	31	chron. Tonsillitis	k.A.	60	25 g	Salmiak	Vermessungsamt/Büro
80	53	26	laterale Halszyste	40	50	41 g	Abgase/Benzin	Krafffahrer
82	61	27	chron. Tonsillitis	25	53	250 g	Lacke	Maler/Lackierer
83	48	22	Schlafapnoe-Syndrom	30	23	64 g	-	Croupier
87	39	27	chron. Tonsillitis	20	k.A.	25 g	-	k.A.
92	56	29	Peritonsillarabszeß li.	40	k.A.	75 g	-	k.A.
94	39	36	chron. Tonsillitis	5	1	12,5 g	Lacke/Abgase	Landmaschinenmechaniker
96	46	28	Schlafapnoe-Syndrom	50	36	125 g	Lacke/Säuren	Automechaniker/Schlosser
97	62	29	Schlafapnoe-Syndrom	20	12	25 g	Kunststoffe	Schweißer

Tabelle 4: Oropharynxkarzinompatienten, Anamnesen der Spender oropharyngealer Schleimhaut und Blut für die Lymphozytenuntersuchung.

Nr.	Alter	BMI	Diagnose	TNM	Histo.	Zig./d	PY	Alkohol g/d	Berufsnoxen	Beruf/Tätigkeit
1	50	25	Oroph. Ca.	T4 N3 M0	G3	50	75	(22a) 246 g-		Büro/Geschäftsführer
3	50	32	Oroph. Ca.	T2 N3 M0	G2	50	k.A.	900 g-		Lagerist
4	40	22	Oroph. Ca.	pT3 pN2 pMx	G3	20	13	175 g-		k.A.
5	59	25	Oroph. Ca.	pT1 pN0 pM0	G2	20	k.A.	255 g-		Fliesenleger
6	47	24	Oroph. Ca.	pT2 pN2b M0	G2	20-30	40	100 g-		k.A.
9	53	24	Oroph. Ca.	pT2 pN1 pMx	G3	30	50	(17a) 125 g-	Kerosin (14a)	Modulmanger
12	48	23	Uvula Ca.	pT3 pNx pMx	G3	20	k.A.	100 g-		Küchenhilfe
14	57	25	Oroph. Ca.	pT4 pN0 M0	G3	35	20	205 g-	PVC	Lagerist
56	59	28	Oroph. Ca.	T4	G2	40	k.A.	50 g-		Gastwirt
58	60	29	Oroph. Ca.	k.A.	k.A.	20	k.A.	25 g-	Vanadium/Asbest/PER	Fahrer bei Bayer
59	60	25	Oroph. Ca.	T1	k.A.	3	5	25 g-		Lehrer
60	47	19	Zungengrund Ca.	T4 N1 M0	G3	20	20	900 g-		Gastwirt
63	56	23	Tonsillen-Ca. li.	pT2 N3 M0	G3	20	80	(40a) 61,5 g-	Kunststoffe	Teppichweber/Stanzer bei BMW
66	58	22	Oroph. Ca.	T3-4 N2 Mx	G2	20	44	125 g-	Zement	Elektriker
70	50	27	Zungenrand Ca.	pT1 pN2 pMx	G1	20	34	(30a) 123 g-		Elektrotechniker
72	58	17	Oroph. Ca.	T3	G2	20	43	25 g-	Holzstaub	Kaufmann
77	51	24	Tonsillen-Ca. re	pT1 pN2b pMx	G3	30-40	k.A.	144 g-		Autoklavierer
78	59	24	Uvula Ca.	pT2 N0 M0	G2	25	51	200 g-	Zement	Bauarbeiter
89	50	29	Oroph. Ca.	pT2 pN0 pMx	G2-3	20-30	23	100 g-		Verwaltungsangestellter
90	43	24	Tonsillen-Ca.	k.A.	G2	25	k.A.	(30a) 205 g-		Kaufmann
93	56	25	Tonsillen-Ca. re.	T3 N2b M0	G3	30	72	63 g-	Lsg.mittel/Säuren	Chemielaborant
95	48	33	Oroph. Ca	pT1 pN2b pM0	G2	20	32	(30a) 63 g-		Krautfahrer
98	52	32	Tonsillen-Ca. re.	pT2 N2b Mx	G2	30	25	8 g-	Titantetrachlorid	Abteilungsleiter Glasfabrik

Tabelle 5: Abkürzungen zu den Anamnesen

a: Jahre
BMI: Body Mass Index = Körpergewicht in kg/(Größe in m) ²
k.A.: keine Angaben
PY: Menge des Tabakkonsums in Packungsjahren (20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr)
UPPP: Uvulo-Palato-Pharyngoplastik
TE: Tonsillektomie
-: keine Exposition gegenüber Noxen in der Arbeitswelt angegeben
TNM-System: Beschreibung der anatomischen Ausdehnung der Erkrankung anhand dreier Komponenten:
T: Ausdehnung des Primärtumors T1,T2,T3,T4.
N: Fehlen oder Vorhandensein und Ausdehnung von regionären Lymphknotenmetastasen: N0,N1,N2,N3.
M: Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen M0, M1.
p: pathologische Klassifikation.
X: kann nicht bestimmt werden.
Grading: Bezeichnung für die histopath. Differenzierung maligner Tumoren nach den Richtlinien der UICC (Union Internationale Contre le Cancer).
G1: gut differenziert.
G2: mäßig differenziert.
G3: schlecht differenziert.
G4: undifferenziert.
GX: Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden.

7.2 Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
B[a]P	Benzo[a]pyren
BMI	Body Mass Index
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celcius
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
HNO	Hals-Nasen-Ohren
IARC	International Agency for Research on Cancer
k.A.	keine Angaben
M	molar
MGE	Mikrogelelektrophorese
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
N	Anzahl
NDEA	N-Nitrosodiethylamin
NNN	N'Nitrosonornicotin
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
OTM	Olive Tailmoment
p	statistische Wahrscheinlichkeit
PAH	polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate Buffered Saline
PY	pack years (=20 Zigaretten/Tag, 365 Tage/Jahr)
RNA	Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
u.v.m.	und viele mehr

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mehrstufenhypothese der Krebsentstehung

Abb. 2: Krebsentstehung anhand der genetischen Disposition und Umweltfaktoren

Abb. 3: Darstellung des Pharynx

Abb. 4: Isolierung von Lymphozyten

Abb. 5: Übersicht des Versuchsaufbaus

Abb. 6: DNA einer Zelle ohne Fragmentierung

Abb. 7: DNA einer Zelle mit mittelgradiger Schädigung

Abb. 8: DNA einer Zelle mit starker Schädigung

Abb. 9a: Tumorpatienten

Abb. 9b: Tumorfremde Spender

Abb. 10a: Tumorpatienten DMSO

Abb. 10b: Tumorfremde Spender DMSO

Abb. 11a: Tumorpatienten MNNG

Abb. 11b: Tumorfremde Spender MNNG

Abb. 12a: Tumorpatienten BaP

Abb. 12b: Tumorfremde Spender BaP

Abb. 13a: Tumorpatienten BPDE

Abb. 13b: Tumorfremde Spender BPDE

Abb. 14a: Tumorpatienten NNN

Abb. 14b: Tumorfremde Spender NNN

Abb. 15a: Tumorpatienten NNK

Abb. 15b: Tumorfremde Spender NNK

Abb. 16a: Tumorpatienten NDEA

Abb. 16b: Tumorfremde Spender NDEA

Abb. 17: DNA Reparaturkapazität

Abb. 18: DNA Reparaturkapazität von Tumorpatienten

Abb. 19: DNA Reparaturkapazität von tumorfreien Spendern

Abb. 20: DNA Reparaturkapazität von Lymphozyten

Abb. 21: DNA Reparaturkapazität geringer Alkoholkonsum

Abb. 22: DNA Reparaturkapazität hoher Alkoholkonsum

7.4 Fragebogen für Patienten



Name und Geburtsdatum des Patienten:

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bitte beantworten Sie nachfolgende Fragen über Fremdstoffbelastungen. Sie helfen dadurch, Einflüsse auf die Gesundheit durch die Umwelt und die Arbeitswelt genauer zu beurteilen. Alle Angaben unterliegen dem Datenschutz und werden anonym und vertraulich behandelt.

Dr. med. U. Harréus

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der Ludwig-Maximilians-Universität München

Welchen **Beruf** üben Sie aus, bzw. haben Sie ausgeübt?

1. _____ von _____ bis _____

2. _____ von _____ bis _____

3. _____ von _____ bis _____

4. _____ von _____ bis _____

Mit welchen **Fremdstoffen** hatten Sie hierbei Kontakt?
(z.B. Holzstaub/Holzbearbeitung, Kühlschmierstoffe,
Farben und Lacke, Zement, Insektizide/Pestizide,
Strahlenbelastung, Metallstaub, Steinkohle und
Teerprodukte oder andere)

1. _____ von _____ bis _____

2. _____ von _____ bis _____

3. _____ von _____ bis _____

4. _____ von _____ bis _____

Rauchen Sie, bzw. haben Sie geraucht?

Menge von bis
Zigaretten: _____

Zigarren: _____

Zigarillos: _____

Waren Sie, bzw. sind Sie **passiv Tabakrauch** ausgesetzt?
Bitte geben Sie eine genauere Beschreibung!

1. _____ von _____ bis _____

2. _____ von _____ bis _____

3. _____ von _____ bis _____

4. _____ von _____ bis _____

Trinken Sie, bzw. haben Sie **alkoholische Getränke** getrunken? Bitte geben Sie Art und Menge an!

Menge _____ von _____ bis _____
Bier: _____

Wein: _____

Andere: _____

Wie **groß** sind Sie?cm.

Wie **schwer** sind Sie?kg.

Möchten Sie **zusätzliche Angaben** machen ?

Vielen Dank für Ihre Mithilfe!

7.5 Lebenslauf

Sonja Christine Jaiser

Geburtsdatum: 07. August 1975

Geburtsort: Stuttgart

Schulbildung:

1982-1990 Waldorfschule, Stuttgart

1990-1996 Königin-Katharina Stift, Gymnasium, Stuttgart

Universitätsausbildung:

1996-1997 Französisch und Geschichte, Universität Stuttgart

1997-2003 Humanmedizinstudium an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

März 1999 Ärztliche Vorprüfung

März 2000 1. Staatsexamen

September 2002 2. Staatsexamen

Oktober 2003 3. Staatsexamen

Dissertation in der Arbeitsgruppe:

Klinisch experimentelle Onkologie, Klinik und
Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

Facharztausbildung:

Ab Mai 2004 zunächst ÄIP, dann Assistenzärztin
im Kinderkrankenhaus Josefinum, Augsburg
Seit Januar 2006 Assistenzärztin in der Kinderklinik
Dritter Orden, Passau

7.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn **Prof. Dr. med. A. Berghaus**, Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Ermöglichung der vorliegenden Promotion durch die Bereitstellung der Forschungsstätte und der hierfür notwendigen Mittel.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Priv. Doz. Dr. med. U. Harréus**, für die ständige Diskussionsbereitschaft bei auftretenden Fragen und die gute wissenschaftliche Betreuung sowie Herrn **Prof. Dr. med. Ch. Matthias** für die freundliche Unterstützung als Mitbetreuer dieser Arbeit.

Danken möchte ich Herrn **Prof. Dr. med. N. Kleinsasser**, welcher als Mitinitiator dieser Studie stets für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit Zeit fand.

Dem Team der klinisch experimentellen Onkologie, Labor der Klinik und Poliklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität München. Hier besonders zu nennen **Frau Dr. rer. hum. biol. B. Wallner**, für die Einführung in die Methodik des Comet Assays, **Frau MTA S. Zieger** und **Frau MTA T. Baluschko**, für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Den **OP-Teams** aus den Kliniken Innenstadt und Großhadern, ohne deren Hilfsbereitschaft und Kooperation die Versuch nicht hätte stattfinden können.

Herzlichen Dank der großen Anzahl freiwilliger **Probenspender** für Ihre Unterstützung. Ohne die Bereitstellung der in der Arbeit verwendeten Schleimhaut- und Blutproben hätte keine der Untersuchungen durchgeführt werden können.

Abschließend möchte ich noch **meiner Familie** meinen herzlichen Dank aussprechen, welche mir die Unterstützung und die Möglichkeit gaben, das Studium der Medizin und diese Promotion durchzuführen.