

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- und Ohrenkrankheiten
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)



In-vitro-Untersuchungen von Speichelproben auf zyto- und gentoxische Wirkung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dirk-Ullrich Stephan
geboren am 30.12.1968 in Schleiz

Gutachter:
Prof. Dr. med. H. Maier, OTA
Prof. Dr. J. Dunst
Prof. Dr. med. A. Berghaus

verteidigt
am 13.11.2000

Referat und bibliographische Angaben

Tumorerkrankungen sind in den westlichen Industrieländern nach den Herz- und Kreislaufstörungen die zweithäufigste Todesursache. Sechs Prozent aller Krebsleiden sind Karzinome des Pharynx und der Mundhöhle. Sie nehmen seit Mitte der 60iger Jahre zu und liegen heute an 6. Stelle aller malignen Neubildungen. Da epidemiologische Untersuchungen und Tierversuche zum Auffinden von Krebsursachen z.T. sehr aufwendig sind, werden bereits seit einigen Jahren zeit- und kostengünstige Alternativen entwickelt. Mit In-vitro-Kurzzeittests wurden und werden erfolgreich kanzerogene und gentoxische Aktivitäten von Einzelsubstanzen, in komplexen Umweltgemischen und Körperflüssigkeiten ermittelt. Dies hat zu einer Verminderung der Schadstoffexposition, zur Substitution einiger gentoxischer Noxen und zu Präventivmaßnahmen geführt. In der Arbeit wird versucht, mit der 'plating efficiency' in der Säugerzellkultur und dem Salmonella/Mikrosomen-Test Risikoindikatoren und Risikofaktoren der Krebsentstehung im Mund-Rachen-Raum nachzuweisen. Für Speichel als Untersuchungsmatrix im biologischen Monitoring spricht, daß die orale Aufnahme einen wichtigen Expositionspfad für Schadstoffe darstellt und Speichelproben leicht zu gewinnen sind. Von 131 männlichen Probanden wird der Speichel auf Zyto- und Gentoxizität untersucht. Die zytotoxische Wirkung des Speichels hängt vom Rauchverhalten der Probanden ab; sie ist in den Proben von Rauchern gegenüber den Nichtrauchern signifikant erhöht. Ein vergleichbarer Zusammenhang läßt sich auch zwischen Gentoxizität der Speichelproben und Raucherstatus der Probanden herstellen. Die Abhängigkeit der biologischen Wirkung des Speichels vom Alkoholkonsum ist weniger ausgeprägt. Die Kombination Rauchen und Alkoholkonsum führt zu einer weiteren Zunahme der Zyto- und Gentoxizität in den Speichelproben. Eine Abhängigkeit der Zyto- und Gentoxizität im Speichel vom Lebensalter der Probanden besteht nicht. Veränderungen an genetischen Endpunkten bedeuten ein erhöhtes kanzerogenes Risiko. Die Zyto- und Gentoxizität im Speichel der Raucher und Alkoholkonsumenten sind ein Hinweis auf eine kanzerogene Belastung an der Mundschleimhaut. Das biologische Monitoring kann keine Aussagen liefern, ob und wann es zu einer Krebsentartung kommt. Biologisches Monitoring wird daher bei Krebsverdacht nicht die ärztliche Vorsorgeuntersuchung ersetzen können, sollte aber in Vorsorgeprogrammen für bekannte Risikogruppen zunehmend eingesetzt werden. Für das Screening und die Früherkennung der Mundhöhlentumore bestehen günstige Voraussetzungen, da die betroffenen Regionen für die Probengewinnung und lokale Begutachtung leicht zugänglich sind. Zur frühzeitigen Erfassung eines Oropharynxtumorisikos könnte die zyto- und gentoxikologische Speicheluntersuchung als vorgeschaltete Routineprüfung auf erste Anzeichen eines kanzerogenen Gefährdungspotentials im Mund-Rachen-Raum herangezogen werden.

Stephan, Dirk-Ullrich: In-vitro-Untersuchungen von Speichelproben auf zyto- und gentoxische Wirkung.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 60 Seiten, 1999

Inhaltverzeichnis

		Seite
	Tabellen und Abbildungen	
1	Einleitung	1
1.1	Mehrstufenmodell der Tumorentstehung	1
1.2	Kanzerogene Noxen	6
1.3	Epidemiologie der malignen Tumore im Mund-Rachen-Raum	8
1.4	Risikofaktoren zur Entwicklung von malignen Mund-Rachen-Tumoren	9
2	Problemstellung	10
3	Material und Methoden	12
3.1	Auswahl der Probanden	12
3.2	Gewinnung der Speichelproben	12
3.3	Biologische Testverfahren	12
3.3.1	Bestimmung der Zytotoxizität in der Säugerzellkultur	13
3.3.1.1	Säugerzellkultur	13
3.3.1.2	Wachstums- und Kulturbedingungen	13
3.3.1.3	Bestimmung der 'plating efficiency'	13
3.3.2	Salmonella/Mikrosomen-Test	15
3.4.2.1	Bakterienstämme	15
3.4.2.2	Stoffwechselsystem (S9-Fraktion)	16
3.4.2.3	Testprotokoll	16
3.4.2.4	Statistische Bewertung	17
4	Ergebnisse	20
4.1	Probandencharakterisierung	20
4.2	Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung	25
4.3	Ergebnisse der Gentoxizitätstestung	32
4.4	Vergleich von zytotoxischer und gentoxischer Aktivität in den Speichelproben	45
5	Diskussion	46
6	Zusammenfassung	53
7	Literatur	56
	Eidesstattliche Erklärung	
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Thesen	

Tabellen und Abbildungen		Seite
Tab. 1	Biologische Merkmale der drei Kanzerogenesestufen Initiation, Promotion und Progression	5
Tab. 2	Zusammensetzung des S9-Mixes	17
Tab. 3	Nährmedien und Lösungen für den Salmonella/Mikrosomen-Test	18
Tab. 4	Referenzsubstanzen im Salmonella/Mikrosomen-Test	18
Tab. 5	Charakterisierung der Studienteilnehmer nach Alter, beruflichen Belastungen und Lebensgewohnheiten (in Anlehnung an den Fragebogen für das Populationsmonitoring von Carrano und Natarajan - <i>Zusammenfassung</i>)	21
Tab. 6	Charakterisierung der Studienteilnehmer nach Alter, beruflichen Belastungen und Lebensgewohnheiten (in Anlehnung an den Fragebogen für das Populationsmonitoring von Carrano und Natarajan) - <i>Einzeldaten</i>	21
Tab. 7	Abhängigkeit der zytotoxischen Aktivität der Speichelproben von den Rauchgewohnheiten der Probanden	27
Tab. 8	Abhängigkeit der zytotoxischen Aktivität der Speichelproben vom Alkoholkonsum der Probanden	28
Tab. 9	Zytotoxisches Potential von 131 Speichelproben männlicher Probanden in der Säugerzellkultur	29
Tab. 10	Abhängigkeit der gentoxischen Aktivität der Speichelproben von den Rauchgewohnheiten der Probanden	34
Tab. 11	Abhängigkeit der gentoxischen Aktivität der Speichelproben vom Alkoholkonsum der Probanden	34
Tab. 12	Gentoxische Wirkung der Speichelproben von Rauchern mit regelmäßigem/gelegentlichem Alkoholkonsum und Nichtrauchern ohne/mit gelegentlichem Alkoholkonsum	35
Tab. 13	Gentoxisches Potential von 131 Speichelproben männlicher Probanden im Salmonella/Mikrosomen-Test (Teststamm TA 98)	37
Tab. 14	Gentoxisches Potential von 131 Speichelproben männlicher Probanden im Salmonella/Mikrosomen-Test (Teststamm TA 100)	41
Tab. 15	Zytotoxische und gentoxische Wirkung der 131 Speichelproben	45
Abb. 1	Mehrstufiger Kanzerogenese-prozeß in menschlichen Epithelgeweben und -zellen	3
Abb. 2	Modell genetischer Progression bei Tumoren im Kopf-Nacken-Bereich	4
Abb. 3	Rolle der Reparatur- und Immunmechanismen im Prozeß der Kanzerogenese	6
Abb. 4	Testprinzip der 'plating efficiency' zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung in den Speichelproben	14
Abb. 5	Salmonella/Mikrosomen-Test	19
Abb. 6	Zytotoxische Wirkung der 131 Speichelproben männlicher Studienteilnehmer in der Säugerzellkultur	26
Abb. 7	Zytotoxische Wirkung der Speichelproben und der Raucherstatus der Probanden (im Vergleich zum Raucherstatus der Gesamtpopulation)	27
Abb. 8	Einfluß des Rauchens der Probanden auf die zytotoxische Wirkung der Speichelproben	27
Abb. 9	Lebensalter der Probanden und 'plating efficiency' der Speichelproben	28
Abb. 10	Gentoxische Aktivität der 131 Speichelproben im Salmonella/Mikrosomen-Test mit den Stämmen Salmonella typhimurium TA 98 und TA 100	32
Abb. 11	Gentoxische Wirkung der Speichelproben und der Raucherstatus der Probanden (im Vergleich zum Raucherstatus der Gesamtpopulation)	33
Abb. 12	Einfluß des Rauchens auf die gentoxische Wirkung der Speichelproben	33
Abb. 13	Einfluß von Rauchen und Alkohol auf die gentoxische Aktivität der Speichelproben	36
Abb. 14	Lebensalter der Probanden und Induktionsfaktor als Maß der gentoxischen Wirkung der Speichelproben	36
Abb. 15	Zyto- und gentoxische Aktivität der Speichelproben der 131 Studienteilnehmer	45

1. Einleitung

1.1. Mehrstufenmodell der Tumorentstehung

Tumorerkrankungen sind in den westlichen Industrieländern nach den Herz- und Kreislaufstörungen die zweithäufigste Todesursache. Aus klinischer Sicht stellt sich Krebs als eine große Gruppe mit bis zu 100 oder mehr Krankheitsbildern dar. Sie variieren im Zeitpunkt ihres ersten Auftretens, in der Geschwindigkeit ihres Fortschreitens, in der zellulären Differenzierung, in ihrer Neigung zur Metastasenbildung, in ihrer Therapierbarkeit und damit nicht zuletzt in ihrer Prognose. Gleichzeitig lassen sich diese zahlreichen Neoplasien aufgrund ihrer Ätiologie in fünf Gruppen einteilen (zit. nach Anders et al. 1991):

- a. eine große Gruppe, deren alleinige Verursachung durch viele kleine karzinogenbedingte somatische Mutationsschritte oft als bewiesen gilt (z.B. Lungenkrebs durch Zigarettenrauch und Industrieabgase, Larynx-, Oro-Hypopharynx-Karzinome, Basalzell-Karzinome und Melanome durch Sonnenbäder),
- b. eine ebenfalls größere Gruppe, deren Verursachung nicht von somatischen Mutationen abhängt, sondern mit ganz allmählich verlaufenden, sehr schwer faßbaren ernährungsphysiologisch und endokrin bedingten Promotionsvorgängen in Verbindung gebracht wird (z.B. Colon-, Brust und Prostatakrebs mit der Aufnahme tierischer Fette, aber auch mit Steroidhormonen),
- c. eine kleine Gruppe von Tumoren, die zwar erblich aber ohne definierbaren Erbgang ist und in der Generationenfolge von Familien in unregelmäßigem Wechsel 'spontan' auftritt oder ausbleibt (z.B. Melanomtypen, ein früh auftretender Colonkrebs),
- d. eine kleine Gruppe erblicher Neoplasien mit definiertem Mendelschen Erbgang, die durch Keimbahnmutationen verursacht ist (z.B. Xeroderma pigmentosum, Meningiom, bestimmte Melanom- und Retinoblastomtypen) und
- e. eine ebenfalls kleine Gruppe von Neoplasien, die durch Tumoviren verursacht wird (z.B. Genitaltumoren, Leukämien).

Aus zell- und molekularbiologischer Sicht kann Krebs als eine relativ kleine Gruppe von Krankheiten gesehen werden, deren Ursache sich auf bestimmte gemeinsame Veränderungen am genetischen Apparat zurückführen läßt.

Bereits 1914 formulierte Boveri seine Theorie der somatischen Mutationen als Ursache für die Krebsbildung. Danach entstehen Krebszellen infolge fälschlich zusammengefügtter Chromosomenabschnitte, und dies führt dann zu einer abnormen Proliferation der Krebszellen. Spätestens seit Boveri (1914) und Bauer (1928) wird Krebs auch als genetische Krankheit gesehen.

Krebs ist aber auch unser stammesgeschichtlich altes Erbe des vielzelligen Lebens, das bei allen taxonomischen Gruppen der Eumetazoa (Gewebstieren) vorkommt: beim Menschen, bei den Invertebraten und Vertebraten bis zu den Hohltieren (Huxley 1958, Krieg 1973, Kaiser 1981). Krebs ist also prinzipiell keine Kreation der menschlichen Zivilisation (Weiss 1972). Seine biologische Basis steht in enger Beziehung zu dem Grundphänomen der Unterordnung der Zellen unter das Differenzierungs- und Funktionsgefüge des gewebsspezifischen Organismus.

Krebs kann ohne äußeren Einfluß spontan entstehen; kann aber auch durch chemische, physikalische und biologische Umwelteinflüsse induziert werden. Die Folge sind neoplastische Zellen, die stereotyp eine unvollkommene Differenzierung zeigen und sich ungehemmt teilen. Nach heutigem Wissen wird die maligne Transformation vor allem durch Defekte in den Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen ausgelöst (Weinberg 1996). In der normalen Zelle ist ihr Zusammenspiel ausgewogen: In Abhängigkeit vom Ort und von der Zeit kodieren sie Proteine, die Zellwachstum und -teilung unterstützen bzw. unterdrücken. Die Onko- und Suppressorgene sind die stammesgeschichtliche und genetische Basis des Krebsrisikos, auf die die äußeren und inneren Faktoren einwirken. Dies macht gleichzeitig den dualistischen Charakter der Krebsrisikofaktoren deutlich: auf der einen Seite die endogene, onkogen- und regulatorgenabhängige Empfindlichkeit des Individuums zur Krebsbildung, auf der anderen Seite die exogen, mutations- und promotionsbedingenden Kanzerogene der Umwelt (Anders 1989, Anders et al. 1991). So wird Krebs zum Ergebnis eines (mehrstufigen) Prozesses von genetischen Fehlern und Veränderungen, deren Akkumulation in der Zelle zu ihrer Entartung führen kann (Cohen und Ellwin 1991). Krebs ist letztlich eine Krankheit der abnormalen Genexpression (Ruddon 1996).

Die genaue Anzahl der Ereignisse, die zur Bildung eines malignen Tumors erforderlich sind, ist noch ungeklärt, die Untergliederung in die Schritte Initiation, Promotion und Progression wird heute allgemein akzeptiert, da diese Schritte experimentell gut belegt sind (Marks 1989). Das Mehrstufenmodell mit Initiation und Promotion wurde Anfang der 40er Jahre entwickelt (Sall und Shear 1940, Berenblum 1941, Friedwald und Rous 1944). Zunächst im Tierversuch für Hautkrebs erarbeitet, ließ es sich später auch auf andere Gewebe anwenden. In der Initiation, dem ersten Schritt der Karzinogenese, entstehen potentielle Tumorzellen, die sich phänotypisch nicht von den umliegenden normalen Zellen unterscheiden. Die Initiation beruht auf der irreversiblen Veränderung (Schädigung) des genetischen Materials. Die Wirksamkeit der Initiation scheint zeitlich von der DNA-

Replikation und Zellteilung abzuhängen (Ying et al. 1982); die DNA-Synthese wird damit zu einem entscheidenden Faktor für die Fixierung des DNA-Schadens und so für die Irreversibilität der Initiation. Im zweiten Schritt, der Promotion, werden die initiierten Zellen in morphologisch erkennbare, präneoplastische Zellen überführt, aus ihnen können sich dann in weiteren Schritten benigne und maligne Tumore entwickeln (Abbildung 1).

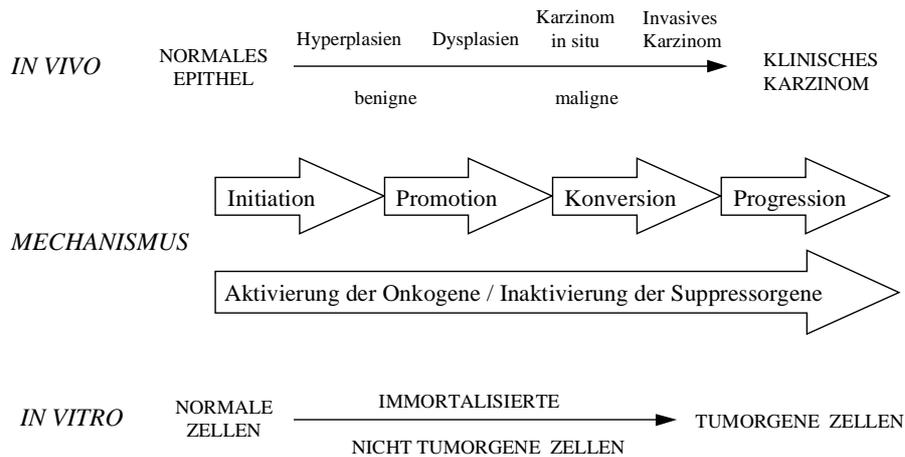


Abbildung 1:

Mehrstufiger Kanzerogeneseprozess in menschlichen Epithelgeweben und -zellen. Das Konzept der stufenweisen Auslösung von geno- und phänotypischen Veränderungen läßt sich sowohl in vivo als auch in vitro beobachten (nach Grafström et al. 1996).

Im Unterschied zu Initiation und Progression ist die Promotion reversibel. Der genaue Mechanismus der Umkehrbarkeit ist noch unklar, vermutlich besteht ein Zusammenhang zum individuellen Zelltod (Bursch 1984). Heute wird angenommen, daß Veränderungen der Genexpression das molekulare Prinzip promovierender Einflüsse sind. Für die nachfolgende, experimentell abgrenzbare Stufe der Progression sind irreversible aneuploide bösartige Neoplasien charakteristisch (Schulte-Hermann 1985, Pitot 1989). Damit einhergehen sichtbare Veränderungen in der Genomstruktur der neoplastischen Zellen, eine gesteigerte Wachstumsrate und Invasionsfähigkeit, Metastasenbildung sowie biochemische Veränderungen (Sargent et al. 1989). Auch chemische Noxen, die man als Progressoren bezeichnet hat, können den Übergang vom Stadium der Promotion in das der

Progression auslösen und fördern. Bis heute kennt man zahlreiche, auch experimentell bestätigte Details der Tumorentstehung (Abbildung 2).

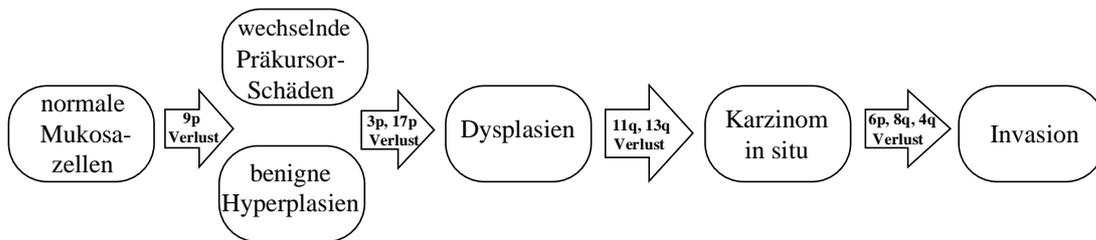


Abbildung 2:

Modell von genetischer Progression bei Tumoren im Kopf-Nacken-Bereich. Dem histopathologischen Fortschreiten gehen genetische Veränderungen voraus: der Verlust chromosomaler Abschnitte in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Die Progression wird durch die Akkumulation genetischer Änderungen bestimmt (nach Califano et al. 1996).

Ein lückenlos zusammenhängendes Bild der Kanzerogenese steht noch aus, aber die zahlreichen pathologischen und epidemiologischen Befunde der letzten drei Jahrzehnte beweisen, daß Krebs auch beim Menschen ein mehrstufiger Vorgang ist (Armitage und Doll 1954, Foulds 1965, Peto 1977, Whittemore 1977, Moolgavkar 1978, 1983, 1986, Knudson 1986, Freedman und Navidi 1989, Weinberg 1996). In Tabelle 1 sind die heute bekannten, wesentlichen biologischen Charakteristika von Initiation, Promotion und Progression einander gegenübergestellt.

Ob ein Schaden an der DNA gesetzt wird und dieser Schaden dann letztlich zu einer malignen Transformation und zum Tumor führt, hängt wesentlich von den zahlreichen Abwehr- und Reparaturmöglichkeiten auf der Zell- und Gewebeebene ab. Hierzu zählen u.a. die Aufnahme- und Stoffwechselbarrieren gegen kanzerogene Stoffe, die Immunabwehr und eine Reihe von DNA-Reparaturmechanismen (siehe Abbildung 3). Allein aufgrund der Tatsache, daß das DNA-Molekül ein instabiles Riesenmolekül ist, liegt nach unterschiedlichen Schätzungen die Zahl der DNA-Modifikationen pro Zelle und Tag zwischen 20.000 und 100.000 Veränderungen, die nahezu vollständig eliminiert und ausgeglichen werden (Sauls und Ames 1986). In Hinblick auf diese Instabilität der DNA war die Entwicklung von Reparaturmechanismen in der Phylogenese unausweichlich; anders hätte die chemische Intaktheit des DNA-Moleküls über einen längeren Zeitraum nicht bewahrt werden können. Wirken zusätzlich kanzerogene Umwelttoxine ein, nimmt die DNA- und Zellschädigung in ihrem Ausmaß wie auch in der chemischen Vielfältigkeit

zu; im gleichen Maße steigen Umfang und Komplexität der Reparatur- und Abwehrmechanismen an. Im normalen Lebenszyklus der Zelle besteht zwischen Schadenssetzung und -reparatur ein Gleichgewicht. Die spontanen und die induzierten Mutationen, wie sie im Niedrigdosis-Bereich auftreten können, werden in den meisten Fällen effizient repariert. Ein Konzentrationsanstieg der Umwelttoxine, eine Exposition über einen langen Zeitraum und die Schädigung und Alterung der zellulären und geweblichen Abwehr können dieses Gleichgewicht stören; die Mechanismen der Belastungsverarbeitung werden 'übertannt' (vgl. Lindahl 1982, Simic et al. 1986, Lindahl und Sedgwick 1988, Rüdiger 1990, Friedberg et al. 1995).

Tabelle 1: Biologische Merkmale der drei Kanzerogenesestufen Initiation, Promotion und Progression (nach Pitot 1996)

Initiation	Promotion	Progression
Irreversibel, mit konstantem „Stammzell“-Potential	Reversibler Anstieg von Zellteilung und -wachstum von initiierten Zellpopulationen	Irreversibel. Meßbare und/oder morphologisch unterscheidbare Veränderungen in zellulärer Genomstruktur
Sensitiv gegenüber xenobiotischen und anderen chemischen Faktoren	Reversible Veränderungen der Genexpression	In früher Phase nimmt die Sensitivität gegenüber Umweltfaktoren zu.
Spontanes Auftreten initiiertes Zellen nachweisbar	Bestand promovierter Zellpopulationen hängt von ständiger Anwesenheit des promovierenden Agens ab.	Charakteristisches Auftreten von benignen und/oder malignen Neoplasien
Zur „Fixierung“ Zellteilung erforderlich	Sensitiv gegenüber Nahrungseinflüssen und hormonellen Faktoren	„Progressor“-Agens bewirkt Fortschreiten promovierter Zellen; auf dieser Stufe ohne Initiatorwirkung.
Dosis-Wirkung-Beziehung zeigt keine meßbare Schwellendosis.	Dosis-Wirkung-Beziehung zeigt meßbare Schwellendosis; max. Wirkung hängt von Dosis des initiierten Agens ab.	Spontane Progression nachweisbar
Relative Wirksamkeit der Initiatoren hängt vom Ausmaß an vorrangigen Läsionen ab, die sich in nachfolgender Promotion ausprägen.	Relative Wirksamkeit der Promotoren hängt von ihrer Fähigkeit ab, durch eine konstante Exposition die Ausweitung der initiierten Zellpopulation zu bedingen.	

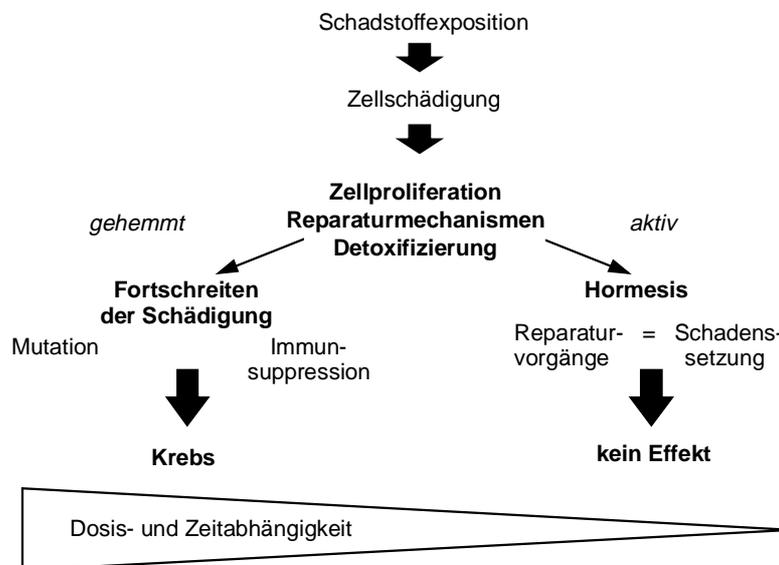


Abbildung 3:

Rolle der Reparatur- und Immunmechanismen im Prozeß der Kanzerogenese

1.2. Kanzerogene Noxen

Bei der Mehrzahl der chemischen Krebsrisikofaktoren aus der Umwelt handelt es sich um organische Substanzen, z.B. aromatische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine, Nitrosamine oder pflanzliche und mikrobielle Produkte. Nur wenige der strukturell sehr unterschiedlichen Verbindungen wirken unmittelbar, per se, kanzerogen. Die meisten Kanzerogene müssen im Organismus zu reaktionsfähigen Produkten umgewandelt werden. Auf einem solchen, meist enzymatischen Wege entsteht aus dem Prä- oder Prokanzerogen die eigentliche Wirkform, das (elektrophile) ultimale Kanzerogen, das dann in der Lage ist, mit DNA, RNA und Proteinen zu reagieren (Miller und Miller 1981). Die Struktur der Ausgangsverbindung muß also durchaus nicht identisch sein mit der Struktur der Wirkform. Auf der anderen Seite können solche metabolischen Wandlungen an Präkanzerogenen auch zu dessen Inaktivierung führen, bevor sie den Zielort, z.B. die DNA, erreichen (Anders 1985, Guengerich 1985, Cooper 1990).

Zusammenhänge zwischen Umwelteinflüssen und Krebsentstehung kennt man seit der Pharaonenzeit. Das geradezu klassische Beispiel für Krebs durch Umweltfaktoren stammt von Percival Pott: Er erkannte im Jahre 1775 Ruß als auslösendes Agens des Skrotialkarzinoms bei englischen Schornsteinfegern. Hundert Jahre nach Pott konnte der Hallenser Chirurg Volkmann nachweisen, daß dem Teer kanzerogen wirkende

Eigenschaften zukommen (Volkman 1875). Später gelang es, an Kaninchen und Maus durch Aufpinseln von Steinkohlenteer und Teerpräparaten Hautkrebs zu erzeugen (Yamagiwa und Ichikawa 1915a und 1915b, Tsutsui 1918, Passey 1922) und die im Teer eigentlich krebserzeugenden Substanzen zu identifizieren.

Die am längsten bekannte, chemisch genau definierte Substanz mit krebsauslösenden Eigenschaften ist das Arsen. Bereits 1820 wurde der sogenannte Arsenkrebs bei Arbeitern englischer Arsengruben beschrieben. Unter Weinbauern kennt man schon seit Jahrzehnten den 'Winzerkrebs', einen durch arsenhaltige Spritzmittel ausgelösten Haut-, Leber- und Lungenkrebs. 1895 beobachtete Rehn unter Anilinarbeitern das gehäufte Vorkommen von Blasenkrebs, als dessen Verursacher später die Anilinderivate β -Naphthalin, Benzidin und Diphenylamin ausgemacht wurden (Rehn 1895, Gibel et al. 1976).

Die aktuelle Liste der IARC (International Agency for Research on Cancer) umfaßt 66 Chemikalien, komplexe Gemische, biologische und kulturbedingte Einflüsse, die beim Menschen Krebs auslösen können bzw. als Krebsfaktoren bekannt sind (IARC 1981-1992). Unter ihnen finden sich ganze industrielle Prozesse, Umweltchemikalien, Arzneimittel, UV-Strahlung und nicht zuletzt Alkohol und Tabakrauch. Die meisten der bekannten und verdächtigen Kanzerogene sind Chemikalien, denen der Mensch erst in den letzten 150 Jahren ausgesetzt wurde. Ab Mitte des vorigen Jahrhunderts wird er mit rasant zunehmenden Mengen an „selbstgemachten“ Chemikalien in der Um-, Wohn- und Arbeitswelt konfrontiert. Kulturelle Gewohnheiten, die zu einem beachtlichen Anstieg des Krebsrisikos führen, haben sich ausgeweitet. Über 4 Mio. organische und anorganische Verbindungen hat der CAS (Chemical Abstracts Service) registriert, wöchentlich kommen 6000 hinzu. Ca. 63.000 der registrierten Chemikalien sind im Verkehr (Maugh 1978), und nur für eine Minderheit der genutzten chemischen Stoffe liegen Angaben zur akuten und chronischen Toxizität vor. Es ist daher leicht vorstellbar, daß sich unter den Tausenden von Chemikalien neben den bereits bekannten Karzinogenen noch zahlreiche weitere mit einem genotoxischen und kanzerogenen Potential befinden (Tomatis 1979).

Konsens besteht, daß die Wechselbeziehungen „Gen - Umwelt“ (Harris 1989) sehr entscheidende Komponenten des Krebsrisikos sind. Weil im Unterschied zu den endogenen Faktoren auf die äußeren Faktoren der Kanzerogenese offenbar viel leichter und gezielter Einfluß genommen werden kann, sind in der bisherigen Tumorprävention das Vermindern oder Ausschließen der kanzerogenen Exposition von primärer Bedeutung.

1.3. Epidemiologie der malignen Tumore im Mund-Rachen-Raum

Maligne Tumore verursachten 1985 weltweit über 7 Mio. Todesfälle. Auf die Industrieländer entfielen 48 %, 52 % auf die Entwicklungsländer, die zu dieser Zeit bereits zwei Drittel der Weltbevölkerung ausmachten. 6 % aller Krebserkrankungen sind Karzinome des Pharynx und der Mundhöhle, sie liegen mit jährlich über 400.000 Neuerkrankungen (International Classification of Disease, 9. Revision, ICD-9 140-149) an 6. Stelle aller malignen Neubildungen (Parkin et al. 1992, 1993). Für Tumore im Mund-Rachen-Raum ergeben sich deutliche geographische Unterschiede; die regionale Variation übertrifft das 20fache (Blot et al. 1994). 18 % aller Krebsneuerkrankungen in Asien sind Mundhöhlen- und Pharynxtumore, in den USA haben sie einen Anteil von unter 3 % der Krebsdiagnosen. In Europa liegt die Neuerkrankungsrate bei 2 bis 4 %: die meisten Inzidenzen im europäischen Raum weisen die Männer im französischen Calvados und entlang der deutsch-französischen Grenze auf (Blot et al. 1994). Für Deutschland schätzte das Statistische Bundesamt die Inzidenzen von Oropharynxtumoren auf etwa 5000 Fälle im Jahre 1993 (Statistisches Bundesamt 1995). Weltweit erkranken Männer meist 2- bis 6mal häufiger an Krebs im Mund-Rachen-Raum als Frauen. Höhere Erkrankungsraten unter Frauen wurden von den Philippinen, aus Indien und Island gemeldet (Muir et al. 1987). Zudem besteht für Oropharynxtumore ein deutlicher Stadt-Land-Gradient: In städtischen Gebieten sterben nahezu doppelt so viele Menschen an diesem Krebs wie auf dem Lande (Blot und Fraumeni 1982). Die Tumore im Mund-Rachen-Raum zeigen eine ausgeprägte Altersabhängigkeit mit einem progressiven Anstieg in den oberen Lebensjahren. In den 70iger Jahren betrug das mediane Alter 63 Jahre bei der Diagnose und 65 Jahre im Todesfall (Young et al. 1981).

Seit Mitte der 70iger Jahre ist in vielen europäischen Ländern die Mortalitätsrate der Karzinome im Mund-Rachen-Raum angestiegen (Haas et al. 1986, Blot et al. 1994, Boyle et al. 1995). Insbesondere jüngere Personen sind davon betroffen. 1993 starben in Deutschland 2364 Personen an einem Oropharynxtumor, 1994 waren es 2513 Todesfälle (Statistisches Bundesamt 1995). Viele Patienten stammen aus sozial benachteiligten Schichten. In Großbritannien z.B. ist in der untersten sozialen Bevölkerungsgruppe* für beide Geschlechter die Mortalitätsrate um 60 % erhöht.

Maligne Tumore im Mund-Rachen-Raum sind in der überwiegenden Zahl Plattenepithelkarzinome (Rudert 1992). Die Mehrzahl der Tumore werden in den beiden fortgeschrittenen Stadien III und IV diagnostiziert. Nur 7 % der Erstdiagnosen erfolgen im

* nach den Kategorien des British Office of Census and Population Surveys

Stadium I, 17 % im Stadium II (Mak-Kregar et al. 1995, Vokes et al. 1993). Die Frühstadien sind mit ausgezeichneten Heilungschancen therapierbar, ausgedehnte Tumore verlangen aber nahezu immer eine aggressive Kombinationstherapie, die meist zu einer stark eingeschränkten Lebensqualität führt.

1.4. Risikofaktoren zur Entwicklung von malignen Mund-Rachen-Tumoren

Wie die meisten Plattenepithelkarzinome sind auch Oropharynxtumore in ihrer Ätiologie in weitem Maße von exogenen Faktoren abhängig. In den letzten Jahrzehnten in zahlreichen Studien belegt und heute unbestritten, sind Rauchen, Tabakkauen und Alkoholkonsum die Hauptrisikofaktoren (vgl. IARC 1986, 1988, Spitz 1994). In den USA z.B. werden 75 % aller Karzinome im Mund-Rachen-Raum auf das Rauchen und Trinken alkoholischer Getränke zurückgeführt (Blot 1988). In Indien und Teilen von Südostasien ist es der Betelkautabak, auch Betelkissen genannt, der überwiegend aus Arecanuß (*Areca catechu*) und Betelblättern (Betelpfeffer, *Chavica betle*), z.T. auch aus Tabak, besteht und dessen weitverbreiteter Genuß maßgeblich die hohen Indizenzraten verursacht (IARC 1985). Mit steigendem Tabak- und Alkoholgenuß nimmt das relative Risiko für einen Oropharynxtumor extrem zu: starke Raucher mit einem übermäßigen Alkoholkonsum haben ein bis zu 38mal höheres relatives Risiko als abstinente Nichtraucher. Tabakrauch und Alkohol zeigen dabei einen synergistischen Effekt (vgl. Blot 1988). Mangelnde Mundhygiene und unzureichende Ernährung, u.a. Vitamin-A-Mangel, ergeben weitere Risikofaktoren. Auch sind bestimmte Berufsgruppen, die mit Asbest und Zementstaub, Farben, Lacken und Lösungsmitteln in Kontakt kommen, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für diese Erkrankungen belastet (Maier et al. 1994, 1997). Nach heutigem Wissen ist die Genese der Karzinome im Mund-Rachen-Raum ohne eine exogene Belastung durch kanzerogene Noxen sehr selten; mehr als 90 % der Patienten weisen die beschriebenen Risiken auf (Rudert 1992). Hierin liegt natürlich auch die Chance einer erfolversprechenden Tumorprävention: die gezielte Intervention der überwiegend vermeidbaren Belastungen und die Identifikation von Risikogruppen. Als ein Instrument individueller Tumorprävention dienen Biomonitoring-Programme, mit denen wertvolle Aussagen zur Belastungs- und Gefährdungssituation von Einzelpersonen getroffen werden können.

2. Problemstellung

Über lange Zeit blieben für die Erkundung der Krebsursachen nur zwei methodische Ansätze mit ausreichender Validität: die epidemiologische Untersuchung und der Tierversuch. Weil diese Untersuchungen z.T. sehr aufwendig sind, besteht unter Toxikologen schon lange der Wunsch, schnelle (und kostengünstige) Alternativverfahren zur Verfügung zu haben. Da krebsinduzierende Noxen gleichsam auch mutagen wirken, sollte es im Idealfall gelingen, Stoffe im Mutagenitätskurzzeitest in kanzerogen und nichtkanzerogen einzuteilen. Diese meist mikrobiellen und zellbiologischen Kurzzeitests erfassen drei wesentlich verschiedene Kategorien an genetischen Endpunkten: Induktion von DNA-Schäden und -Reparatur, Genmutationen und zytogenetische Veränderungen sowie In-vitro-Transformationsvorgänge kultivierter Säugerzellen (Tomatis et al. 1996). Besonders in den letzten zwei Jahrzehnten sind diese Kurzzeitests einzeln oder in Kombination zum Screening auf potentielle kanzerogene und gentoxische Aktivitäten von Einzelsubstanzen, komplexen Umweltgemischen und Körperflüssigkeiten entwickelt und erfolgreich eingesetzt worden. Positive Testergebnisse haben nicht selten zu einer Verminderung der Exposition, zur Substitution der gentoxischen Noxe und zu Präventivmaßnahmen geführt.

In diesem Kontext wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, durch den Einsatz relevanter und etablierter (gen)toxikologischer Prüfverfahren einen methodischen Ansatz zur Erfassung und Bewertung von Risikoindikatoren und Risikofaktoren der Krebsentstehung im Mund-Rachen-Raum zu finden. Da zyto- und gentoxische Wirkmechanismen die Kanzerogenese entscheidend beeinflussen, wurden mit der 'plating efficiency' in der Säugerzellkultur und dem Salmonella/Mikrosomen-Test zwei gut validierte In-vitro-Testverfahren zum Nachweis eines zytotoxischen bzw. gentoxischen Potentials in Speichelproben eingesetzt. Derartige Untersuchungen sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Vergleichbare Arbeiten beschränken sich auf die chemische oder zytogenetische Analyse der Speichelproben von Betelnußkauern (z.B. Stich und Stich 1982, Stich et al. 1986)

Für die Überlegung, Speichelproben als Untersuchungsmatrix im Biomonitoring zu verwenden, sprechen zwei Gründe:

Erstens, die orale Aufnahme stellt einen wichtigen Belastungspfad bei der Exposition gegenüber Schadstoffen dar. Speichel ist aufgrund seiner Physiologie wesentlich an der Stoffaufnahme und metabolischen Umwandlung, am Stofftransport und an der Verweilauer aktiver Metabolite im Mund-Rachen-Raum beteiligt. Zweitens, für ein breit

angelegtes Screening sollte die Entnahme des Probenmaterials für die Studienteilnehmer zumutbar sein. Eine nichtinvasive Probengewinnung ist hierbei immer von Vorteil.

Das Untersuchungsprogramm für die hier vorgelegte Arbeit umfaßte folgende Teilschritte:

1. Probandengespräche, in denen über die Ziele der Untersuchungen informiert und um Teilnahme gebeten wurde
2. Interviews mit den Studienteilnehmern nach einem standardisierten Fragebogen zur Erfassung möglicher Belastungsquellen, der Lebens- und Ernährungsgewohnheiten
3. Gewinnung der Speichelproben in der ärztlichen Praxis und Transport der Proben in das Labor
4. Untersuchungen der Speichelproben auf Zytotoxizität in der Säugerzellkultur und auf Gentoxizität im Salmonella/Mikrosomen-Test
5. Auswertung der Fragebögen und experimentellen Untersuchungsergebnisse für die Zusammenführung der Einzeldaten
6. Diskussion der Daten hinsichtlich einer Korrelation zwischen den im Interview ermittelten Einflußfaktoren und dem im In-vitro-Testsystem gemessenen biologischen Effekt
7. Information der Studienteilnehmer über die Untersuchungsergebnisse

Auf der Grundlage dieses Meßprogramms sollen Zusammenhänge zwischen Risikofaktoren, wie persönliche Lebensgewohnheiten und Umwelt, und der gentoxischen Wirkung der Speichelproben aufgezeigt werden. Gleichzeitig ist die Frage zu beantworten, inwieweit der methodische Ansatz, Speichelproben in das Biomonitoring einzubeziehen, ein wissenschaftlich tragfähiges Konzept bei der Krebsprävention im Mund-Rachen-Raum darstellt.

3. Material und Methoden

3.1. Auswahl der Probanden

An der Untersuchung haben 131 freiwillige, männliche Personen aus dem Einzugsgebiet des oberen Vogtland teilgenommen. Zur epidemiologischen Charakterisierung der Gruppe und zur Erfassung möglicher Einflußfaktoren wurde jeder Proband auf der Grundlage des im zytogenetischen Populationsmonitoring angewandten Fragebogens (Carrano und Natarajan 1988) zu Alter, Beruf, Lebensgewohnheiten und Gesundheitszustand interviewt. Die dabei von den Teilnehmern gemachten Einzelangaben sind unter 4.1. in Tabelle 6 zusammengefaßt. Bei der Auswahl der Personen ist eine Ausgewogenheit in der Altersstruktur und im Raucherstatus angestrebt worden. Die Auswahl der Probanden erfolgte nicht nach beruflicher Tätigkeit. Nicht in die Untersuchungsgruppe aufgenommen wurden jedoch Personen mit beruflicher Belastung gegenüber bekannten genotoxischen Substanzen und Strahlung sowie Personen, die sich einer Behandlung mit Immunsuppressiva oder Antineoplastika hatten unterziehen müssen.

3.2. Gewinnung der Speichelproben

Die Speichelproben wurden in der Frühsprechstunde durch einen ortsansässigen HNO-Facharzt gewonnen. Die Probanden sollten vor der Speichelnahme weder essen noch Alkohol trinken und die übliche Zahn- und Mundpflege beibehalten. Für die Untersuchungen wurde die Entnahme 'unstimulierten' Speichels gewählt. Der Proband saß dabei in einer aufrechten Position mit leicht nach vorn geneigtem Kopf. Die erforderliche Speichelmenge von 6 ml wurde durch wiederholtes Ausspucken in ein skaliertes Meßröhrchen aus Polyethylen gesammelt. Die Dauer zur Gewinnung der einzelnen Speichelprobe variierte in Abhängigkeit von der Speichelsekretionsrate des Probanden. Da bei Speichelproben grundsätzlich von einer starken mikrobiologischen Kontamination ausgegangen werden muß, sind alle Speichelproben über einen 0,2 µ Polycarbonatfilter (der Fa. Schleicher und Schuell) steril filtriert worden. Danach lagerten die Proben bis zur biologischen Testung bei - 20 °C.

3.3. Biologische Testverfahren

Den Schwerpunkt zur biologischen Charakterisierung des Probenmaterials bildeten in der vorgelegten Arbeit Untersuchungen zur zytotoxischen und genotoxischen Aktivität in den Speichelproben. Mit der Bestimmung der 'plating efficiency' in der Säugerzellkultur und

dem Salmonella/Mikrosomen-Test wurden dafür zwei Basistests der Gentoxikologie herangezogen.

3.3.1. Bestimmung der Zytotoxizität in der Säugerzellkultur

3.3.1.1. Säugerzellkultur

Testobjekt für die In-vitro-Zytotoxizitätsuntersuchungen der Speichelproben war die permanente Zelllinie V 79 (Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters, *Cricetulus griseus*). Diese Zelllinie wird seit 1981 in der heutigen Forschungsstelle Bad Elster des Umweltbundesamtes in der Gentoxizitätsprüfung eingesetzt. Als permanente Zelllinie zeichnet sie sich durch ein schnelles Wachstum und einen stabilen Karyotyp aus (Bradley et al. 1981).

3.3.1.2. Wachstums- und Kulturbedingungen

Die V79-Zellen wurden in 25-cm²-Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Als Kulturmedium diente Dulbecco's modified Eagle's Medium, dem unmittelbar vor Kulturansatz auf einen Liter Kulturmedium 0,584 g L-Glutamin, (aus einer 1000fach konzentrierten Antibiotikallösung) 10 Einheiten Penicillin, 10 µg Streptomycin und 25 pg Amphotericin B sowie fetales Kälberserum in einer Endkonzentration von 10 % zugesetzt wurde.

Für die permanente Stammhaltung wurden die Monolayerkulturen durch trypsinieren (0,25 %ige Trypsinlösung) passagiert.

Die eingesetzten Nährmedien und Substanzen sind von der Firma Sigma bezogen worden.

3.3.1.3. Bestimmung der 'plating efficiency'

Für die Bestimmung der 'plating efficiency' (Abbildung 4, S. 15) wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase einer Stammkultur von der Oberfläche der Kulturgefäße abtrypsinieren, gewaschen, in einem definierten Volumen aufgenommen und mit Trypanblau die Vitalität der Zellen bestimmt. Im Testansatz sollte die Vitalität nicht weniger als 80 Prozent betragen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in niedriger Zelldichte in die Kulturgefäße eingesät. Das verhindert bzw. vermindert den Kontakt der Zellen untereinander, so daß die Zellen leichter Kolonien ausbilden können. Für die Untersuchung der Speichelproben wurden ca. 100 Zellen pro Kulturflasche eingesät. Nach dem Anhaften der Zellen (ca. 2-3 Stunden) wurde zur Bestimmung der

‘plating efficiency’ 1 ml der Speichelprobe pro Ansatz in 3 Wiederholungen hinzugegeben. Aqua dest. diente als Negativkontrolle. Die Kultur- und Wachstumsbedingungen entsprachen denen der Stammhaltung (vgl. 3.3.1.2.); die Inkubationszeiten lagen zwischen 7 und 10 Tagen. Während der gesamten Inkubationszeit blieben die Zellen in Kontakt mit der Speichelprobe. Der genaue Zeitpunkt für die Auswertung wurde durch Beobachten der Zellen im Umkehrmikroskop festgelegt. Bei entsprechender Größe und Morphologie der Kolonien wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgegossen, die Zellkolonien mit einem Methanol-Eisessig-Gemisch (3:1) fixiert und danach mit Puffersaline gespült. Vor der manuellen Auszählung der Kolonien wurden die Zellen ca. 30 Minuten mit Giemsalösung angefärbt. Ergab die Auszählung eine Reduktion in der Anzahl der Zellkolonien von mindestens 50 Prozent im Vergleich zur Kontrolle, wurde die Probe als zytotoxisch eingestuft.

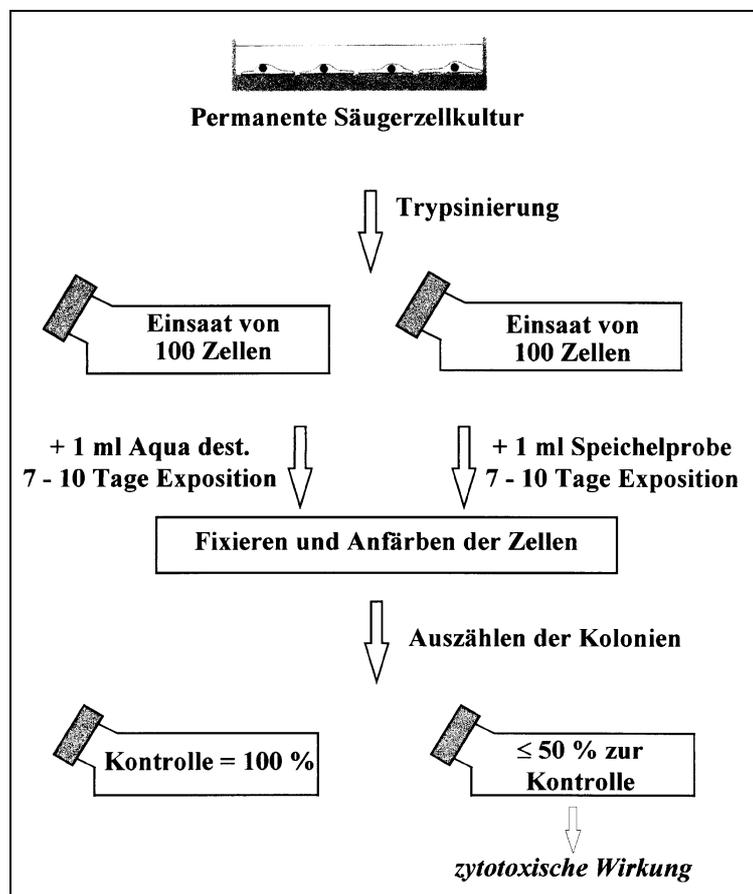


Abbildung 4:

Testprinzip der ‘plating efficiency’ zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung in den Speichelproben
Ca. 100 Zellen wurden eingesät und nach Anhaftung an der Gefäßoberfläche zusammen mit der Probe über 7 -10 Tage inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellkolonien ausgezählt.

3.3.2. Salmonella/Mikrosomen-Test

3.3.2.1. Bakterienstämme

Im Salmonella/Mikrosomen-Test wurden die histidindefizienten Mutantenstämme *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 eingesetzt.

Diese Stämme sind, im Gegensatz zum Wildtyp, aufgrund einer genetischen Veränderung nicht mehr in der Lage, Histidin selbst zu synthetisieren und daher von der Zugabe des Histidins ins Nährmedium abhängig. Unter dem Einfluß einer genotoxischen Substanz mutieren die Zellen dieser histidinauxotrophen Bakterienstämme zur Histidinprototrophie zurück, werden wieder fähig, Histidin zu synthetisieren, und können somit auf selektiven Nährmedium (histidinfreier Minimal-Glucose-Agar) wachsen. Dabei bilden sich makroskopisch sichtbare Kolonien, die jeweils aus einer rückmutierten Bakterienzelle (einer Revertanten) entstehen. Mit dem Teststamm *Salmonella typhimurium* TA 98 lassen sich Frameshift-Mutationen (his D 3052), mit *Salmonella typhimurium* TA 100 Basenpaar-substitutionen (his G 46) nachweisen. Beiden Stämmen gemeinsam sind neben der Histidinauxotrophie noch weitere genetische Veränderungen, die ihre Sensitivität gegenüber genotoxischen Substanzen erhöhen. Die Ampicillinresistenz wird durch das Plasmid pKM 101 vermittelt, dadurch erhalten die Bakterien ein besonders fehleranfälliges Reparaturenzym (SOS-Repair). Des Weiteren ist die DNA-Reparaturkapazität durch eine Mutation (uvrB) reduziert. Der teilweise Verlust der Liposaccharidhülle durch eine 'deep rough mutation' führt zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran, so daß der Schadstoffeintritt in die Zelle auch für höhermolekulare und stark vernetzte Verbindungen möglich wird. Die Teststämme sind von Bruce Ames (Universität Berkeley, CA, USA) bezogen worden. Die Stammhaltung und die Überprüfung des Genotyps erfolgte nach Maron und Ames (1983). Die für den Test notwendige Bakterienkultur (aus der logarithmischen Wachstumsphase) wurde nach Abimpfen aus der Stammkultur in Nährbouillon über 24 Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad angezogen, der Keimgehalt in der Wachstumskultur am Versuchstag auf Vollmedium-Platten bestimmt. Die Bakteriendichte sollte im Test $\geq 1 \times 10^8$ pro Platte liegen.

3.3.2.2. Stoffwechselsystem (S9-Fraktion)

Zur Simulation des Säugerstoffwechsels wurde der Bakterienkultur eine Fraktion aus Rattenleberenzymen (9000 x g Überstand des Leberhomogenates, auch S9-Fraktion genannt) zugesetzt. Aus der S9-Fraktion wurde unter Zugabe von Kofaktoren unmittelbar vor Testbeginn das metabolisierende System, der S9-Mix, bereitet (Tabelle 2).

3.3.2.3. Testprotokoll

In Abbildung 5 ist der Ablauf des Salmonella/Mikrosomen-Tests schematisch dargestellt.

Die verwendeten Medien und die eingesetzten Referenzsubstanzen für die Positiv- und Negativkontrolle sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengestellt.

Für eine Platte wurden zu 2 ml Topagar in der Reihenfolge hinzugegeben:

0,1 ml	Speichelprobe
0,1 ml	Bakterienkultur
0,5 ml	S9-Mix oder Pufferlösung

(Bei den Ansätzen ohne metabolisierendes System wurde der S9-Mix durch das gleiche Volumen an Pufferlösung substituiert.)

Nach dem Durchmischen wurde der Topagar auf Vogel-Bonner-Medium ausplattiert. Getestet wurden die Proben in je drei Wiederholungen mit und ohne Zugabe des metabolisierenden Systems; bei jedem Versuchsansatz wurden die Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt. Nach einer 48- bis 72stündigen Inkubation bei 37 °C im Dunkeln folgte die Auszählung der Kolonien. Ein möglicher zytotoxischer Effekt der Probe konnte an der Beeinflussung des Hintergrundwachstums und an der Abnahme der spontanen Revertanzahlen beurteilt werden.

Für jeden Prüfansatz wurden aus drei Wiederholungen der arithmetische Mittelwert und Induktionsfaktor errechnet.

Ein verbindliches, einheitliches Vorgehen bei der statistischen Bewertung der Ergebnisse im Salmonella/Mikrosomen-Test ist bisher nicht erreicht worden und findet daher zum jetzigen Zeitpunkt auch keinen Eingang in aktuelle Richtlinien der Gentoxizitätsprüfung.

In der Einzelsubstanztestung und Chemikalienbewertung wird eine Probe dann als gentoxisch eingestuft, wenn eine reproduzierbare Verdopplung der spontanen Revertanzahl (Negativ-/Lösungsmittelkontrolle) auftritt und/oder eine Konzentration-Wirkung-Beziehung (einschließlich im Negativbereich) induziert wird.

In der vorliegenden Arbeit basiert die Datenauswertung auf Ergebnissen eines vom BMBF geförderten Verbundvorhabens zum Thema 'Gentoxizität in Oberflächenwasser'. Im Vorhaben wird die Aussagefähigkeit einer Reihe gentoxischer Testverfahren, u.a. des Salmonella/Mikrosomen-Tests, untersucht und biometrisch ausgewertet. Danach kann im Salmonella/Mikrosomen-Test eine Probe bereits als gentoxisch eingeschätzt werden, wenn reproduzierbar ein Induktionsfaktor von $\geq 1,2$ erreicht wird (Grummt 1998, persönliche

Mitteilung). Als Induktionsfaktor IF ist definiert der Quotient aus der induzierten Revertanzahl (der Probe) und der spontanen Revertanzahl.

3.4. Statistische Bewertung

Für die biometrische Bewertung von Unterschieden in der zentralen Tendenz wurde der nichtparametrische Test nach Wilcoxon, Mann und Withney ausgewählt, der den Vergleich zweier verteilungsunabhängiger Stichproben erlaubt. Bei mehr als zwei Stichproben wurden die multiplen Tests nach Bonferoni korrigiert. Das relative Risiko der toxischen Wirkung in der Probe unter dem Einfluß der beiden Faktoren „Rauchen“ und „Alkoholkonsum“, wurde mit dem Verfahren der logistischen Regression ermittelt. Die statistische Beratung erfolgte durch die Forschungsstelle Bad Elster des Umweltbundesamtes in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover sowie durch das Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Tabelle 2: Zusammensetzung des S9-Mixes (bezogen auf 1 ml Endvolumen)
Das metabolisierende Enzymsystem (S9-Mix) wurde aus einem kommerziell erworbenen Rattenleberpräparat (S9-Fraktion) und den genannten Kofaktoren gemischt.

Komponente	Menge/Volumen	Bemerkung
S9-Fraktion	0,1 ml	9000 x g Überstand des Leberhomogenates (ca. 40 mg Protein/ml), Rat liver S9 products der Fa. INC Biochemical GmbH, Eschwege
MgCl ₂	8 µMol	0,2 ml einer Stammlösung von 406,51 mg MgCl ₂ x 6 H ₂ O pro 50 ml Aqua dest., steril filtriert
KCl	33 µMol	0,2 ml einer Stammlösung von 615 mg KCl pro 50 ml Aqua dest., steril filtriert
Glucose-6-phosphat	5 µMol	5 µMol Glucose-6-phosphat (0,1 ml einer Stammlösung von 304 mg Glucose-6-phosphat-Na ₂ pro 20 ml Aqua dest., steril filtriert
NADP	4 µMol	0,1 ml einer Stammlösung von 726 mg NADP pro 20 ml Aqua dest., steril filtriert
Na-K-Phosphat	100 µMol	= 0,3 ml Phosphatstammlösung, pH 7,4, aus 19,6 ml Lösung A (4,804 g KH ₂ PO ₄ /100 ml Aqua dest.) + 80,4 ml Lösung B (6,286 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O/100 ml Aqua dest.), steril filtriert

Tabelle 3: Nährmedien und Lösungen für den Salmonella/Mikrosomen-Test

Nährmedium/Lösung	Zusammensetzung
Glucoselösung	50 g Glucose ad 1 l Aqua dest.
Salzlösung für Minimalmedium	50 g K_2HPO_4 , 24 g KH_2PO_4 , 8 g $(NH_4)_2 SO_4$, 4 g Natriumcitrat und 1,6 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ad 1 l Aqua dest.
Basalmedium für Minimalmedium	24 g Fadenagar ad 1 l Aqua dest.
Top-Agar	5 g NaCl und 10 g Difco-Agar ad 1 l Aqua dest.
Biotin-Histidin-Lösung	7,25 mg L-Histidin und 12,2 mg Biotin ad 0,1 l Aqua dest.
Puffersaline	7 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ und 3 g KH_2PO_4 ad 1 l Aqua dest.
Vollmedium	15 g Nährbouillon II und 20 g Agar ad 1 l Aqua dest.
Nährmedium	15 g Nährbouillon II ad 1 l Aqua dest. für Bakterienschüttelkultur (60 ml je Erlenmeyerkolben)
Ampicillin-Agar (für Schrägagar oder Platte)	30 g Difco-Agar und 15 g Nährbouillon II ad 1 l Phosphatpuffer, pH 7, autoklavieren, abkühlen auf 60 °C, Zugabe von 10 ml Ampicillin-Stammlösung
Ampicillin-Stammlösung	80 mg Ampicillin ad 10 ml Aqua dest., steril filtrieren
Phosphatpuffer	392 ml Lösung A: 9,08 g KH_2PO_4 ad 1 l H_2O ; 608 ml Lösung B: 11,88 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ ad 1 l H_2O

Tabelle 4: Referenzsubstanzen im Salmonella/Mikrosomen-Test

Je Versuchsreihe wurden Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt. Der Negativkontrollansatz bestand aus Bakterien, Topagar und ggf. metabolisierendem Enzymsystem (S9-Mix) und Aqua dest.

In der Positivkontrolle wurde Aqua dest. durch eine der aufgeführten mutagenen Referenzsubstanzen je nach Teststamm und An-/Abwesenheit des metabolisierenden Enzymsystems substituiert.

	Stamm TA 98		Stamm TA 100	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Negativkontrolle:				
Aqua dest 0,1 ml/Platte	X	X	X	X
Positivkontrollen:				
Dinitro-o-kresol (DNOC) 0,1 mg/Platte	X			
Bis(2-chlorethyl)ammonium chlorid (Nor-HN ₂) 0,1 mg/Platte			X	
N-Fluoren-2-ylacetamid (AAF) 0,01 mg/Platte		X		
Fluorenamin-2 (AF) 0,01 mg/Platte				X

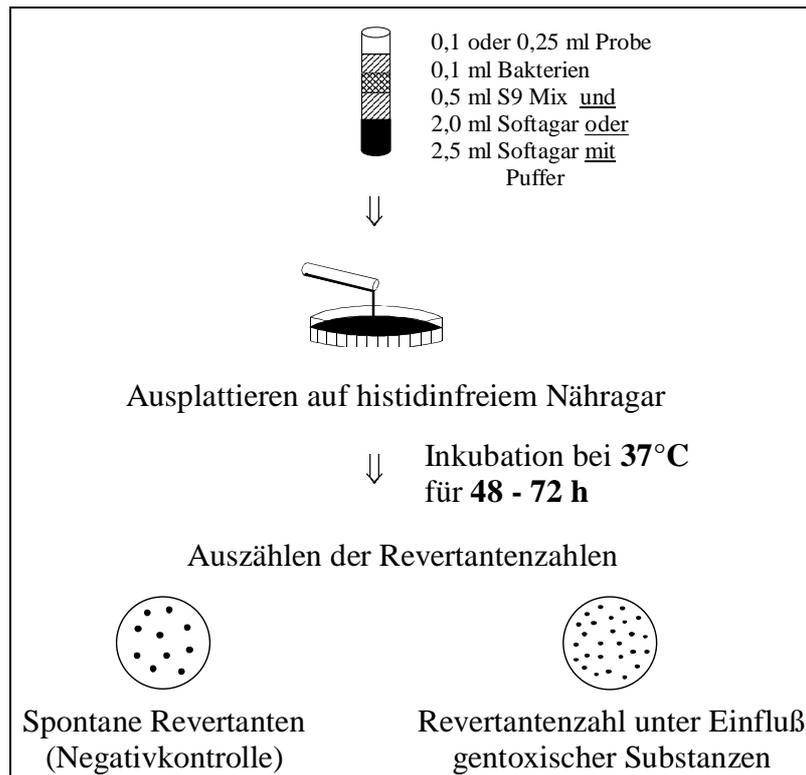


Abbildung 5:

Salmonella/Mikrosomen-Test

Topagar, Speichelprobe, Suspension an Testbakterien und ggf. S9-Mix wurden gemischt und auf die histidinfreie Agarplatte aufgetragen. Nur die zur Histidinprototrophie rückmutierten Bakterienzellen bilden Kolonien, die nach der Inkubation ausgewertet werden konnten. Für das Ermitteln der spontanen Revertantenzahl (Negativkontrolle) wurde die Speichelprobe durch 0,1 ml Aqua dest. substituiert.

4. Ergebnisse

4.1. Probandencharakterisierung

In die Untersuchung wurden 131 männliche Personen einbezogen. Die epidemiologische Charakterisierung basierte auf den Angaben der Probanden, die sie im Fragebogen nach Carrano and Natarajan (1988) gemacht hatten (Zusammenfassung Tabelle 5; Einzeldaten Tabelle 6).

Das Alter der Probanden lag zwischen 11 und 88 Jahren; das Durchschnittsalter der Population betrug 44,3 Jahre. Bei der Auswahl der Probanden konnte eine ausgewogene Altersverteilung erreicht werden. Die Population wurde in vier Altersklassen eingeteilt: 31 Personen gehörten der Altersklasse bis 20 Jahre an, 29 und 25 Probanden waren im Alter von 21 bis 40 bzw. 41 bis 60 Jahre, und 49 Studienteilnehmer hatten ein Alter von über 60 Jahren. Von den 131 Probanden hatten 53 nie geraucht, 42 Personen waren Nichtraucher, die das Rauchen aufgegeben hatten, und 36 waren Raucher. Die Mehrzahl der Raucher (29 von 36) gab einen Zigarettenkonsum von bis zu 20 Stück pro Tag an; 7 Probanden rauchten mehr als eine Schachtel am Tag.

Angaben zum Alkoholgenuß werden erfahrungsgemäß in den meisten Fällen von den Probanden nach unten korrigiert. Daher wurde sich auf die Einteilung in *kein*, *gelegentlicher* und *regelmäßiger* Alkoholgenuß beschränkt. Demnach tranken 79 der Befragten regelmäßig, 29 gelegentlich und 23 Probanden keinen Alkohol. Wie zu erwarten fanden sich die meisten alkoholabstinenten Studienteilnehmer in der Nichtrauchergruppe. Von den insgesamt 95 Nichtrauchern gaben 21 % an, keinen Alkohol zu trinken; unter den Rauchern verzichteten nur acht Prozent auf Alkohol.

Die Auswertung der Angaben zu chronischen Erkrankungen beschränkte sich unter Beachtung der Zielstellung der Arbeit auf die oberen Atemwege.

Tabelle 5: Charakterisierung der Studienteilnehmer nach Alter, beruflichen Belastungen und Lebensgewohnheiten (in Anlehnung an den Fragebogen für das Populationsmonitoring von Carrano und Natarajan, 1988) - *Zusammenfassung*

Parameter	Probanden						
Populationsgröße:	131						
	davon:						
Altersstruktur:		Nichtraucher	Nichtraucher, vorm. Raucher	Raucher	kein	Alkohol gelegentlich	regelmäßig
≤ 20 Jahre	31	29	-	2	10	15	6
21 - 40 Jahre	29	11	7	11	1	5	23
41 - 60 Jahre	25	4	9	12	5	3	17
> 60 Jahre	46	9	26	11	7	6	33
		Σ: 53	42	36	23	29	79
Rauchgewohnheiten:							
Nichtraucher					13	20	20
Nichtraucher vorm. Raucher					7	5	30
Raucher					3	4	29

Tabelle 6: Charakterisierung der Studienteilnehmer nach Alter, beruflichen Belastungen und Lebensgewohnheiten (in Anlehnung an den Fragebogen für das Populationsmonitoring von Carrano und Natarajan, 1988) - *Einzeldaten*

Zeichenerklärung:

Berufliche Exposition gegenüber Lösemitteln, Stäuben und Metallen: -- nicht beruflich exponiert; - vormals beruflich exponiert; + beruflich exponiert;

Rauchgewohnheiten: -- ständiger Nichtraucher; - seit mindestens 2 Jahren Nichtraucher; + Raucher mit < 10 Zigaretten/d; ++ Raucher mit 10 bis 20 Zigaretten/d; +++ Raucher mit > 20 Zigaretten/d;

Alkoholkonsum: - abstinente; + gelegentlich; ++ regelmäßig;

Nr.	Geb.-jahr	Alter	Berufliche Tätigkeit	Berufliche Exposition			Rauchgewohnheiten		Alkoholkonsum	Erkrankungen
				Lösemittel	Stäube	Metalle	Nicht-raucher	Raucher		
1	1954	41	Polizist	-	--	--	-		++	
2	1926	69	Rentner	--	--	--		++	++	
3	1928	67	Rentner	-	-	-	-		++	
4	1924	71	Rentner	--	--	--		+	++	
5	1979	16	Schüler	--	--	--		++	+	
6	1979	16	Schüler	--	--	--	--		+	
7	1979	16	Schüler	--	--	--	--		+	
8	1979	16	Schüler	--	--	--	--		++	
9	1979	16	Schüler	--	--	--	--		+	
10	1980	15	Schüler	--	--	--	--		-	

Nr.	Geb.- jahr	Alter	Berufliche Tätigkeit	Berufliche Exposition			Rauchgewohn- heiten		Alko- hol- konsum	Erkrankungen
				Löse- mittel	Stäube	Metalle	Nicht- raucher	Raucher		
11	1980	15	Schüler	--	--	--	--		-	
12	1979	16	Schüler	--	--	--	--		-	
13	1979	16	Schüler	--	--	--	--		+	
14	1979	16	Schüler	--	--	--	--		+	
15	1979	16	Schüler	--	--	--	--		+	
16	1979	16	Schüler	--	--	--	--		+	Heuschnupfen
17	1979	16	Schüler	--	--	--	--		+	
18	1980	15	Schüler	--	--	--	--		+	
19	1970	25	Student	--	-	--	--		++	Asthma bronch.
20	1970	25	Student	--	-	--		+	++	
21	1948	47	Selbständiger	--	--	--	-		-	
22	1957	38	Vertriebsleiter	--	--	--	--		++	
23	1922	73	Rentner	--	--	--	-		+	
24	1921	74	Rentner	--	--	--	-		++	
25	1977	18	Maurer	+	+	--	--		++	Heuschnupfen
26	1980	15	Schüler	--	--	--	--		-	
27	1980	15	Schüler	--	--	--	--		+	
28	1980	15	Schüler	--	--	--	--		+	
29	1981	14	Schüler	--	--	--	--		-	
30	1981	14	Schüler	--	--	--	--		-	
31	1980	15	Schüler	--	--	--	--		+	
32	1978	17	Schüler	--	--	--	--		++	
33	1978	17	Schüler	--	--	--	--		-	
34	1978	17	Schüler	--	--	--	--		++	
35	1978	17	Schüler	--	--	--	--		+	
36	1957	38	Rentner	--	--	--		+	++	
37	1967	28	Musik- instrumentenbauer	+	+	+		+++	++	
38	1924	71	Rentner	--	--	--	-		++	
39	1972	23	Baggerfahrer	--	--	--	-		++	
40	1943	52	Bankangestellter	-	--	--		++	++	
41	1949	46	Zylinder- maschinenbauer	--	--	--		++	++	
42	1965	30		--	--	--	--		-	
43	1945	50	Lackierer	+	--	--	--		+	
44	1955	40	Pharmavertreter	+	--	--	-		+	
45	1925	70	Rentner	-	--	--		++	++	
46	1940	55	arbeitslos	-	--	-		+++	++	

Nr.	Geb.- jahr	Alter	Berufliche Tätigkeit	Berufliche Exposition			Rauchgewohn- heiten		Alko- hol- konsum	Erkrankungen
				Löse- mittel	Stäube	Metalle	Nicht- raucher	Raucher		
47	1938	57	arbeitslos	--	--	--		+++	++	
48	1963	32	Forstwirt	--	--	--		++	+	
49	1932	63	Vorruhestand	--	--	--	--		+	
50	1936	59	Vorruhestand	-	-	--	--		++	
51	1947	48	Invalidenrentner	-	--	--	-		+	
52	1926	69	Rentner	--	--	--	--		+	
53	1970	25	Student	--	--	--	-		++	
54	1974	21	Student	--	--	--	--		++	
55	1975	20	Schüler	--	--	--	--		++	
56	1971	24	Verzinner	--	--	+	-		++	
57	1960	35	Außendienst	--	--	--	--		++	
58	1936	59	Vorruhestand	--	--	--		+	++	
59	1911	84	Rentner	--	--	--	-		-	
60	1970	25	Kraftfahrer	--	--	--		++	+	
61	1974	21	Werkzeugmechaniker	--	+	--		++	++	
62	1929	66	Rentner	--	--	--		++	++	
63	1947	48		--	--	--		++	++	
64	1954	41	Verkehrsingenieur	--	--	--	-		+	
65	1939	56	Kraftfahrer	--	--	--		+++	++	
66	1907	88	Rentner	-	--	--		+	++	
67	1934	61	Rentner	--	--	--		+++	-	
68	1963	32	Fliesenleger	+	--	--	-		++	
69	1937	58	Vorruhestand	-	--	--		+	-	
70	1968	27	Student	--	--	--	-		++	
71	1961	34	Zahnarzt	--	--	--		++	+	
72	1969	26	Student	--	--	--	--		++	
73	1970	25	Student	--	--	--		++	++	
74	1968	27	Student	--	--	--	-		++	
75	1924	71	Rentner	-	-	-	-		++	
76	1925	70	Rentner	--	--	--	-		-	
77	1934	61	Vorruhestand	--	--	-	--		-	
78	1928	67	Rentner	--	--	--	-		+	
79	1938	57	Rentner	--	-	--	-		++	
80	1939	56	Polizist	--	--	--		+	++	
81	1975	20	Schüler	--	--	--	--		-	

Nr.	Geb.- jahr	Alter	Berufliche Tätigkeit	Berufliche Exposition			Rauchgewohn- heiten		Alko- hol- konsum	Erkrankungen
				Löse- mittel	Stäube	Metalle	Nicht- raucher	Raucher		
82	1922	73	Rentner	--	--	--	--		+	
83	1921	74	Rentner	-	--	--		+	++	
84	1952	43	Fleischer	--	--	--	--		++	
85	1930	65	Rentner	--	-	-	-		-	
86	1984	11	Schüler	--	--	--	--		-	
87	1939	56	Angestellter	--	--	--		++	-	
88	1981	14	Schüler	--	--	--	--		-	
89	1924	71	Rentner	--	--	--	-		++	
90	1933	62	Rentner	--	-	--	--		++	
91	1964	31	Schmied	+	+	--		++	++	
92	1930	65	Vorruhestand	--	--	--	--		++	Pilzbefall
93	1974	21	Soldat	--	--	--	--		++	
94	1978	17	Schüler	--	--	--	--		+	
95	1935	60	Vorruhestand	--	--	--	-		++	
96	1959	36	Rohrleger	--	--	--		++	++	
97	1968	27	Student	--	--	--	--		++	
98	1946	49	ABM	--	-	-		+++	++	
99	1937	58	Rentner	-	-	-	-		-	
100	1924	71	Rentner	--	--	--		++	++	
101	1923	72	Rentner	--	--	--	-		++	
102	1970	25	Student	-	--	-	--		++	
103	1963	32	Dreher	-	--	-	--		+	
104	1975	20	Rundfunkmechaniker	--	--	--		+	++	Heuschnupfen
105	1934	61	Vorruhestand	-	--	--	-		++	
106	1932	63	Rentner	--	-	--	-		++	
107	1925	70	Rentner	-	--	--	-		++	
108	1925	70	Rentner	--	--	--	-		++	chronische Laryngitis
109	1922	73	Rentner	--	--	--	-		++	
110	1927	68	Rentner	-	--	-	-		++	
111	1949	46	arbeitslos	--	--	--		+++	++	
112	1934	61	Vorruhestand	--	-	--	-		-	
113	1921	74	Rentner	--	-	-	-		-	
114	1945	50	Transportarbeiter	--	--	--	--		-	
115	1931	64	Rentner	--	-	-	-		++	
116	1931	64	Rentner	-	--	--	-		++	
117	1965	30	Kraftfahrer	--	--	--		++	++	

Nr.	Geb.- jahr	Alter	Berufliche Tätigkeit	Berufliche Exposition			Rauchgewohn- heiten		Alko- hol- konsum	Erkrankungen
				Löse- mittel	Stäube	Metalle	Nicht- raucher	Raucher		
118	1923	72	Rentner	-	-	-		+	++	
119	1930	65	Vorruhestand	--	--	--	-		++	
120	1927	68	Rentner	--	--	--	-		++	Wangentumor (o. histologischen B.)
121	1922	73	Rentner	-	--	--	--		+	
122	1932	63	Rentner	-	--	--		+	++	
123	1951	44	Maschinenschlosser	-	--	--	-		++	
124	1925	70	Rentner	--	--	--	-		++	
125	1911	84	Rentner	--	--	--	--		++	
126	1924	71	Rentner	-	--	--	-		++	
127	1915	80	Rentner	--	-	-		++	++	
128	1963	32	Maurer	--	+	--	--		++	
129	1925	70	Rentner	--	-	--	-		++	
130	1934	61	Rentner	--	--	--	--		++	
131	1949	46	Betriebshandwerker	--	--	--	-		++	

4.2. Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung

Für den Endpunkt Zytotoxizität existiert eine Reihe gut etablierter Methoden. Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Speichelproben wurde das Testsystem 'plating efficiency' in der permanenten Zelllinie von Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters eingesetzt, da für dieses Verfahren bereits ein validiertes Protokoll (u.a. Reproduzierbarkeit, Variabilität, Störgrößen) vorlag.

Insgesamt wurden 131 Speichelproben auf ihre zytotoxische Wirkung im Zellkulturtest untersucht. Die Einzelergebnisse sind in der Tabelle 9 aufgelistet.

Die Abbildung 6 zeigt die prozentuale Verteilung der zytotoxischen Wirkung in den Speichelproben. Das Wirkspektrum der Proben reicht von einem nicht erkennbaren Effekt über mäßig bis stark zytotoxisch. Ein deutliches zytotoxisches Schädigungspotential,

definiert durch die Reduktion der 'plating efficiency' um mindestens 50 % im Vergleich zur Kontrolle, zeigten sieben von 131 (5,1 %) der getesteten Speichelproben. 37 Proben (28,2 %) wiesen mit einer 'plating efficiency' von > 50 - 80 % gegenüber der Kontrolle eine mäßige Erhöhung der Zytotoxizität auf. In 66,7 % der Proben (n=87) war keine zytotoxische Wirkung nachweisbar.

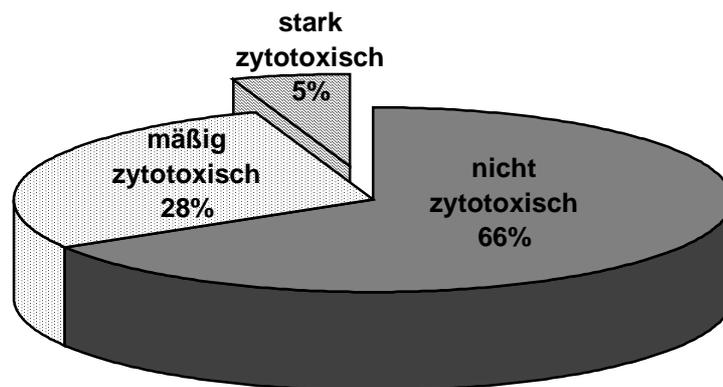


Abbildung 6:

Zytotoxische Wirkung der 131 Speichelproben männlicher Studienteilnehmer in der Säugerzellkultur
 Die 'plating efficiency' der Kontrolle wird 100 % gesetzt.
 Bei einer Reduktion der 'plating efficiency' um mindestens 50 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wird die Probe als zytotoxisch eingestuft.

Ein direkter Vergleich des zytotoxischen Wirkpotentials der Speichelproben mit den Rauchgewohnheiten der Probanden verdeutlicht das biologisch hochwirksame Gefährdungspotentials des Tabakrauches (Tabelle 7, Abbildung 7 und 8). Alle sieben Speichelproben mit einer nachweisbaren stark zytotoxischen Wirkung (≤ 50 % 'plating efficiency') konnten der Rauchergruppe zugeordnet werden. Keine Speichelprobe eines Nichtrauchers hatte eine 'plating efficiency' unter 50 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Proben, die zu einer mäßigen Erhöhung der Zytotoxizität (> 50 - 80 % 'plating efficiency') führten, ließen sich 27 Rauchern und zehn Nichtrauchern, davon sieben ehemaligen Rauchern, zuordnen. Von den 87 Speichelproben ohne einen nachweisbaren zytotoxischen Effekt waren nur zwei Proben aus der Rauchergruppe, 35 Proben stammten von

Nichtrauchern, die vormalig geraucht hatten; der überwiegende Teil (57,7 %, n = 50) konnte in die Gruppe der ständigen Nichtraucher eingeteilt werden.

Der Speichel von Rauchern wies eine signifikant ($P < 0,002$) höhere Zytotoxizität auf als der von Nichtrauchern.

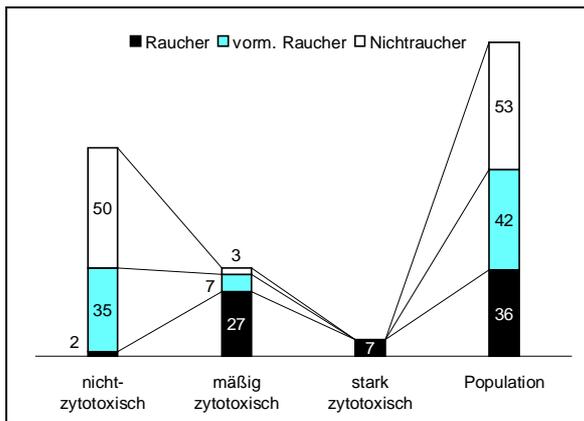


Abbildung 7:

Zytotoxische Wirkung der Speichelproben und der Raucherstatus der Probanden (im Vergleich zum Raucherstatus der Gesamtpopulation)

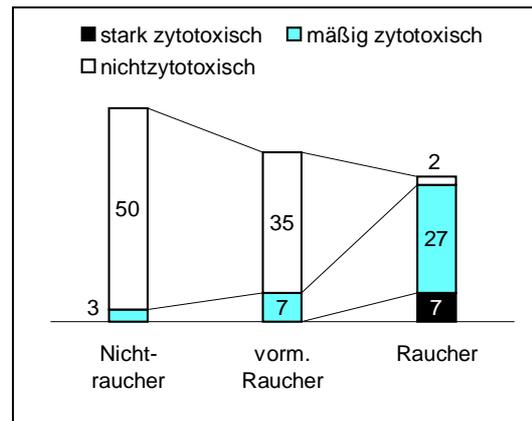


Abbildung 8:

Einfluß des Rauchens der Probanden auf die zytotoxische Wirkung der Speichelproben. Stark zytotoxische Speichelproben konnten nur bei Rauchern nachgewiesen werden. Die Mehrzahl nichtzytotoxischer Speichelproben stammte von Nichtrauchern.

Tabelle 7: Abhängigkeit der zytotoxischen Aktivität der Speichelproben von den Rauchgewohnheiten der Probanden

Raucherstatus	'plating efficiency' (Zytotoxizität) der Speichelproben					
	> 80 - 100 %		> 50 - 80 %		≤ 50 %	
	Probenzahl	Prozentualer Anteil	Probenzahl	Prozentualer Anteil	Probenzahl	Prozentualer Anteil
Nichtraucher, ständige (n = 53)	50	57,5	3	8,1	-	0
Nichtraucher, vormalig Raucher (n = 42)	35	40,2	7	18,9	-	0
Raucher (n = 36)	2	2,3	27	73,0	7	100
Σ:	131	100	37	100	7	100

Der Vergleich des zytotoxischen Wirkpotentials der Speichelproben mit dem Alkoholkonsum der Probanden ergab folgendes Bild (Tabelle 8): Alle sieben Proben mit einer 'plating efficiency' $\leq 50\%$ ließen sich Probanden mit einem regelmäßigen Alkoholkonsum zuordnen. In den Bereich 50 bis 80 % 'plating efficiency' gruppierten sich die Speichelproben von 29 Probanden mit regelmäßigem, von fünf mit gelegentlichem und weiteren fünf ohne Alkoholkonsum. Von den 87 Speichelproben ohne sichtbare zytotoxische Wirkung stammte die Hälfte der Proben (n=43) aus der Probandengruppe mit einem regelmäßigen Alkoholverbrauch; die anderen 44 Proben verteilten sich zu fast gleichen Anteilen auf Abstinenzler bzw. Probanden mit gelegentlichem Alkoholgenuß. Die sieben stark zytotoxischen Speichelproben ('plating efficiency' von $\leq 50\%$) ließen sich Studienteilnehmern (Probanden-Nr. 2, 4, 41, 45, 46, 47, 65) zuordnen, die sowohl starke Raucher (mit 10 bis 20 Zigaretten und mehr pro Tag) als auch regelmäßige Konsumenten von Alkohol waren. Bei gleichzeitigem Auftreten der Faktoren 'Rauchen' und 'regelmäßiger Alkoholkonsum' zeigte sich ein signifikant erhöhtes Risiko, daß die Speichelprobe zytotoxisch wirkt (Odds Ratio = 17,4; p = 0,005).

Tabelle 8: Abhängigkeit der zytotoxischen Aktivität der Speichelproben vom Alkoholkonsum der Probanden

Alkoholkonsum	'plating efficiency' (Zytotoxizität) der Speichelproben					
	> 80 - 100 %		> 50 - 80 %		$\leq 50\%$	
	Probenzahl	Prozentualer Anteil	Probenzahl	Prozentualer Anteil	Probenzahl	Prozentualer Anteil
abstinent (n=23)	20	57,5	3	8,1	-	0
gelegentlich (n=29)	24	40,2	5	18,9	-	0
regelmäßig (n=79)	43	2,3	29	73,0	7	100
Σ :	131	87	100	37	100	7

Ein Zusammenhang zwischen zytotoxischer Wirkung der Speichelproben und Lebensalter der Probanden konnte nicht gezeigt werden (Abbildung 9).

Abbildung 9:

Lebensalter der Probanden und 'plating efficiency' der Speichelproben.
 Eine Korrelation zwischen dem Alter der Probanden und der zytotoxischen Wirkung der Speichelproben bestand nicht.
 Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,0858$

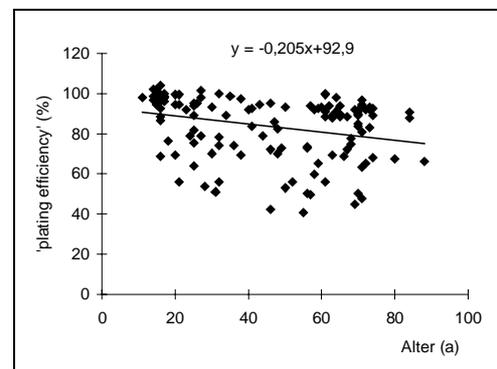


Tabelle 9: Zytotoxisches Potential von 131 Speichelproben männlicher Probanden in der Säugerzellkultur
 Die 'plating efficiency' der Kontrolle wird 100 % gesetzt. Bei einer Reduktion der 'plating efficiency' um mindestens 50 % im Vergleich zur Kontrolle wird die Probe als (stark) zytotoxisch eingestuft (fettgedruckt hervorgehoben).

Proband	Anzahl der Klone					Standard- abweichung	'plating efficiency' in %
	1. Wieder- holung	2. Wieder- holung	3. Wieder- holung	Wieder- holung	Mittelwert		
1	76	84	86	82	5,3	84	
2	36	52	44	44	8,0	45	
3	64	72	76	71	6,1	72	
4	48	52	40	47	6,1	48	
5	68	72	62	67	5,0	69	
6	82	94	84	87	6,4	88	
7	98	102	92	97	5,0	99	
8	94	88	106	96	9,2	98	
9	92	102	94	96	5,3	98	
10	90	96	104	97	7,0	99	
11	104	98	98	100	3,5	102	
12	86	92	94	91	4,2	93	
13	92	96	94	94	2,0	96	
14	88	104	92	95	8,3	97	
15	106	98	102	102	4,0	104	
16	82	84	88	85	3,1	86	
17	94	96	98	96	2,0	98	
18	92	104	96	97	6,1	99	
19	86	82	94	87	6,1	89	
20	74	76	72	74	2,0	76	
21	78	86	88	84	5,3	86	
22	94	94	98	95	2,3	97	
23	88	92	90	90	2,0	92	
24	84	86	92	87	4,2	89	
25	72	84	68	75	8,3	76	
26	86	94	102	94	8,0	96	
27	92	94	92	93	1,2	95	
28	96	98	102	99	3,1	101	
29	102	98	100	100	2,0	102	
30	94	98	92	95	3,1	97	
31	88	96	94	93	4,2	95	
32	104	90	94	96	7,2	98	
33	96	92	102	97	5,0	99	
34	94	98	102	98	4,0	100	
35	94	92	96	94	2,0	96	
36	64	72	68	68	4,0	69	
37	48	54	56	53	4,2	54	
38	72	84	82	79	6,4	81	
39	88	92	90	90	2,0	92	
40	54	62	48	55	7,0	56	

Proband	Anzahl der Klone					'plating efficiency' in %
	1. Wiederholung	2. Wiederholung	3. Wiederholung	Mittelwert	Standardabweichung	
41	36	42	46	41	5,0	42
42	92	88	94	91	3,1	93
43	54	56	46	52	5,3	53
44	86	94	90	90	4,0	92
45	56	44	48	49	6,1	50
46	36	44	40	40	4,0	41
47	52	46	48	49	3,1	50
48	62	52	50	55	6,4	56
49	82	88	92	87	5,0	89
50	92	86	94	91	4,2	93
51	76	82	84	81	4,2	82
52	88	88	94	90	3,5	92
53	92	92	96	93	2,3	95
54	104	96	92	97	6,1	99
55	94	92	92	93	1,2	95
56	84	72	76	77	6,1	79
57	102	98	90	97	6,1	99
58	62	72	58	64	7,2	65
59	82	84	92	86	5,3	88
60	64	68	56	63	6,1	64
61	54	46	64	55	9,0	56
62	62	72	68	67	5,0	69
63	72	68	66	69	3,1	70
64	88	92	92	91	2,3	93
65	48	56	44	49	6,1	50
66	64	72	58	65	7,0	66
67	58	52	54	55	3,1	56
68	68	74	76	73	4,2	74
69	56	62	58	59	3,1	60
70	72	84	76	77	6,1	79
71	84	86	92	87	4,2	89
72	92	98	90	93	4,2	95
73	88	80	72	80	8,0	82
74	92	94	102	96	5,3	98
75	88	94	96	93	4,2	95
76	94	82	92	89	6,4	91
77	102	94	96	97	4,2	99
78	84	86	90	87	3,1	88
79	92	88	96	92	4,0	94
80	76	68	72	72	4,0	73
81	104	92	96	97	6,1	99
82	90	88	94	91	3,1	93
83	72	66	62	67	5,0	68
84	92	90	96	93	3,1	95
85	88	92	84	88	4,0	90
86	104	94	90	96	7,2	98
87	68	72	74	71	3,1	73

Proband	Anzahl der Klone					'plating efficiency' in %
	1. Wiederholung	2. Wiederholung	3. Wiederholung	Mittelwert	Standardabweichung	
88	102	92	96	97	5,0	99
89	94	88	102	95	7,0	97
90	92	96	88	92	4,0	94
91	52	56	42	50	7,2	51
92	90	94	92	92	2,0	94
93	88	98	92	93	5,0	95
94	102	96	90	96	6,0	98
95	94	88	92	91	3,1	93
96	72	68	78	73	5,0	74
97	94	106	98	99	6,1	101
98	68	70	76	71	4,2	73
99	86	94	90	90	4,0	92
100	62	68	56	62	6,0	63
101	84	92	94	90	5,3	92
102	92	88	96	92	4,0	94
103	82	72	76	77	5,0	78
104	68	64	72	68	4,0	69
105	86	92	90	89	3,1	91
106	82	90	86	86	4,0	88
107	84	86	80	83	3,1	85
108	86	92	84	87	4,2	89
109	78	84	82	81	3,1	83
110	82	70	76	76	6,0	78
111	74	68	70	71	3,1	72
112	82	90	88	87	4,2	88
113	86	92	94	91	4,2	93
114	92	88	94	91	3,1	93
115	94	102	92	96	5,3	98
116	86	88	94	89	4,2	91
117	72	66	68	69	3,1	70
118	56	72	64	64	8,0	65
119	82	88	90	87	4,2	88
120	68	74	78	73	5,0	75
121	92	88	94	91	3,1	93
122	74	68	62	68	6,0	69
123	84	82	66	77	9,9	79
124	78	86	82	82	4,0	84
125	82	94	90	89	6,1	90
126	92	88	96	92	4,0	94
127	66	70	62	66	4,0	67
128	94	104	96	98	5,3	100
129	82	92	90	88	5,3	90
130	104	94	96	98	5,3	100
131	94	90	96	93	3,1	95
Kontrolle	92	104	98	98	6,0	-

4.3. Ergebnisse der Gentoxizitätstestung

Auf ihre gentoxische Wirkung wurden die Speichelproben der 131 Studienteilnehmer im Salmonella/Mikrosomen-Test unter Verwendung der Teststämme *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 untersucht. Die Einzelwerte sind in Tabelle 13 und 14 dargestellt.

Von den 131 getesteten Speichelproben zeigten im verwendeten Testsystem 88 Proben keine gentoxische Aktivität. Weder in Stamm TA 98 noch in Stamm TA 100, sowohl mit als auch ohne Zugabe des metabolisierenden Systems (S9-Mix), bewirkten diese 88 Speichelproben keine signifikante Zunahme der Revertanzahl bzw. des Induktionsfaktors im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. 16 der 131 Speichelproben führten hingegen in beiden Teststämmen zu einer deutlichen Erhöhung der Revertanzahl; dabei, mit einer Ausnahme, vorwiegend in der Testvariante ohne S9-Mix. Im Test mit metabolisierender Leberfraktion zeigten sich mehrheitlich keine gentoxischen Wirkungen. Lediglich in einer Probe ließ sich ein positiver Effekt in TA 98 ohne S9-Mix und in TA 100 mit S9-Mix nachweisen. Ausschließlich in nur einem der beiden Teststämmen führten 27 Proben zu einem signifikanten Anstieg des Induktionsfaktors: Elf Proben bei Stamm TA 98 ohne S9-Mix, eine Probe beim gleichen Stamm aber mit S9-Mix sowie 13 Proben in TA 100 ohne S9-Mix. Zwei Speichelproben erwiesen sich im Stamm TA 100 sowohl ohne als auch mit Zugabe des metabolisierenden Systems als positiv (siehe Abbildung 10).

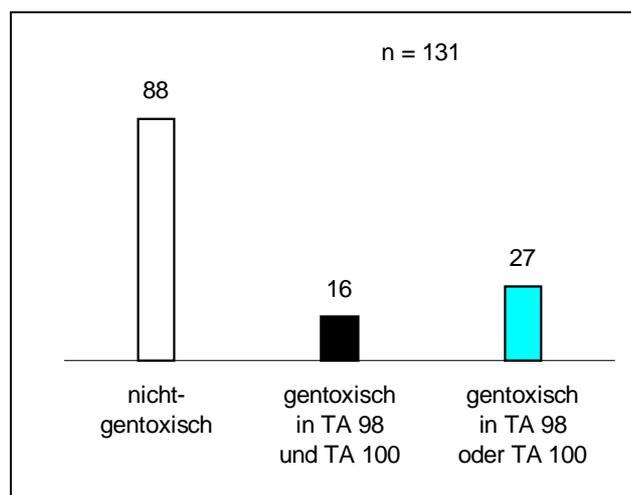


Abbildung 10: Gentoxische Aktivität der 131 Speichelproben im Salmonella/Mikrosomen-Test mit den Stämmen *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100

Den Bezug zwischen der gentoxischen Wirkung der Speichelproben und den Rauchgewohnheiten der Studienteilnehmer vermittelt Tabelle 10: Von 88 nichtgentoxischen Speichelproben konnten 46 Proben (46,5 %) in die Gruppe der (ständigen) Nichtraucher eingeordnet werden; 13 der im Ames-Test negativen Proben stammten von Rauchern. Der Anteil an nichtgentoxischen Speichelproben heutiger Nichtraucher, aber ehemaliger Raucher, lag bei etwa einem Drittel (32,9 %, 29 von 88 Proben). Von den 43 Speichelproben, die in Stamm TA 98 und/oder Stamm TA 100 positiv waren, ließen sich sieben Proben (16,3 %) der Nichtrauchergruppe, etwa ein Drittel (13 Proben = 30,2 %) vormaligen Rauchern und 23 Proben (53,5 %) der Rauchergruppe zuordnen (Abbildung 11). Zehn der 16 Speichelproben, die in beiden Stämmen eine gentoxische Wirkung auslösten, kamen ebenfalls von Rauchern, zwei Proben stammten von ehemaligen Rauchern. Das heißt: Von den 36 Rauchern, die an der Studie teilnahmen, blieben 36 % der Proben im Salmonella-Test ohne Wirkung, die anderen 64 % waren in mindestens einem der beiden Teststämmen positiv (Abbildung 11). Dagegen zeigten nur 13 % des Probenmaterials aus der Nichtrauchergruppe eine positive Wirkung, in den übrigen 87 % konnte kein gentoxischer Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 12).

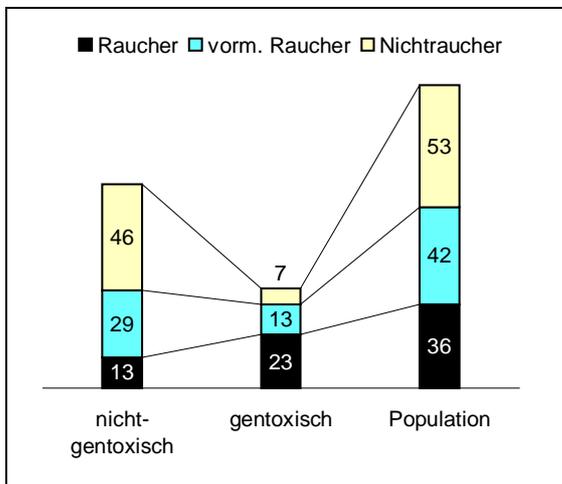


Abbildung 11:

Gentoxische Wirkung der Speichelproben und der Raucherstatus der Probanden (im Vergleich zum Raucherstatus der Gesamtpopulation)

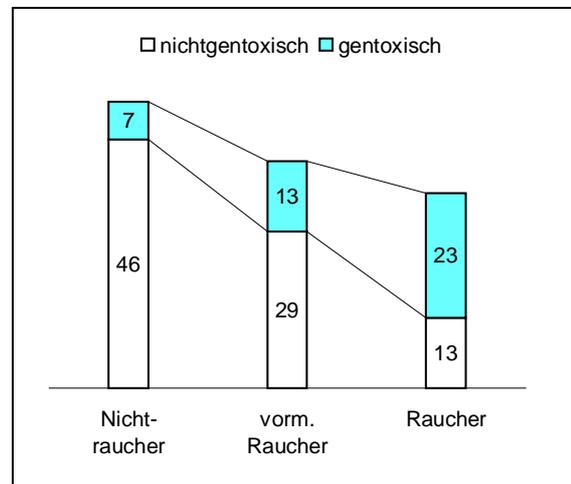


Abbildung 12:

Einfluß des Rauchens auf die gentoxische Wirkung der Speichelproben. Die Mehrzahl gentoxischer Speichelproben stammte von Rauchern, die Mehrzahl nichtgentoxischer Speichelproben von Nichtrauchern. Der Unterschied in der mittleren Gentoxizität des Speichels zwischen Rauchern, vormaligen Nichtrauchern und (ständigen) Nichtrauchern war nicht signifikant.

Tabelle 10: Abhängigkeit der gentoxischen Aktivität der Speichelproben von den Rauchgewohnheiten der Probanden

Raucherstatus	(Prozentualer Anteil an 131 Studienteilnehmern)	Speichelproben			
		nichtgentoxisch		gentoxisch (in mind. einem Teststamm)	
		Probenzahl	Prozentualer Anteil	Probenzahl	Prozentualer Anteil
Nichtraucher, ständige	(40)	46	52,3	7	16,3
Nichtraucher, vormals Raucher	(32)	29	32,9	13	30,2
Raucher	(28)	13	14,8	23	53,5
Σ:		88	100	43	100

Der Vergleich von gentoxischer Wirkung der Speichelproben und Alkoholkonsum der Probanden führte zu folgenden Aussagen (Tabelle 11): Von den 88 nichtgentoxischen Proben stammten 17 (19,3 %) von Probanden, die keinen Alkohol trinken, 23 (26,1 %) Proben von Personen mit gelegentlichem und 48 Proben (54,6 %) von Studienteilnehmern mit einem regelmäßigen Alkoholkonsum. Dem stehen 43 (in mindestens einem der beiden Teststämme) positive Speichelproben gegenüber, von denen 31 Proben regelmäßigen Alkoholkonsumenten, 14 Proben gelegentlich alkoholkonsumierenden Probanden und weitere 14 Proben der abstinent lebenden Gruppe zugeordnet werden konnten. Während der Anteil von Personen mit regelmäßigem Alkoholverbrauch an der untersuchten Gesamtpopulation bei 60 % lag, kamen aus dieser Gruppe 72 % der in TA 98 und/oder TA 100 positiven Speichelproben. 40 % aller Studienteilnehmer waren Personen ohne und mit gelegentlichem Alkoholgenuß; hier ließen sich 28 % der positiven Proben diesem Personenkreis zuordnen.

Tabelle 11: Abhängigkeit der gentoxischen Aktivität der Speichelproben vom Alkoholkonsum der Probanden

Alkoholkonsum	(Prozentualer Anteil an 131 Studienteilnehmern)	Speichelproben			
		nichtgentoxisch		gentoxisch (in mind. einem Teststamm)	
		Probenzahl	Prozentualer Anteil	Probenzahl	Prozentualer Anteil
abstinent	(18)	17	19,3	6	14,0
gelegentlich	(22)	23	26,1	6	14,0
regelmäßig	(60)	48	54,6	31	72,0
Σ:		88	100	43	100

Die Unterschiede im gentoxischen Wirkpotential der einzelnen Speichelproben werden auch durch die folgende Gegenüberstellung deutlich (Tabelle 12, Abbildung 13): 26 von 33, d.h. 79 % der Speichelproben von Rauchern mit einem regelmäßigem oder gelegentlichen Alkoholkonsum waren in TA 98 und/oder TA 100 positiv; sieben Proben (21 %) waren negativ. Nur drei Proben (9 %) aus der alkoholabstinenten Nichtrauchergruppe (n = 33) waren in einem oder beiden Salmonella-Stämmen gentoxisch, 30 (91 %) aus dieser Gruppe blieben im Salmonella/Mikrosomen-Test ohne Wirkung. Die Speichelproben aus der Subpopulation *Raucher/regelmäßig-gelegentlich Alkohol* wiesen eine signifikant höhere gentoxische Aktivität auf als jene aus der Gruppe *Nichtraucher/abstinent-gelegentlich Alkohol* ($P < 0,002$).

Mit dem Verfahren der logistischen Regression ließen sich die bisherigen Aussagen (vgl. Abb. 12 und 13) zum Einfluß des Rauchens und Alkohols auf die Gentoxizität der Speichelprobe bestätigen. Für Rauchen allein bestand ein marginales Risiko, daß die Probe gentoxisch reagiert (Odds Ratio = 4,7; $P = 0,07$). Bei zusätzlich regelmäßiger Alkoholaufnahme verstärkte sich dieses Risiko auf das 6fache (Odds Ratio=6,0; $p=0,008$).

Tabelle 12: Gentoxische Wirkung der Speichelproben von Rauchern mit regelmäßigem/gelegentlichem Alkoholkonsum und Nichtrauchern ohne/mit gelegentlichem Alkoholkonsum

Raucherstatus und Alkoholkonsum	Speichelproben			
	nichtgentoxisch		gentoxisch (in mind. einem Teststamm)	
	Probenzahl	Prozentualer Anteil	Probenzahl	Prozentualer Anteil
Raucher, regelmäßig/gelegentlich Alkohol	33	7 21,2	26 78,8	
Nichtraucher, abstinent/gelegentlich Alkohol	33	30 90,9	3 9,1	

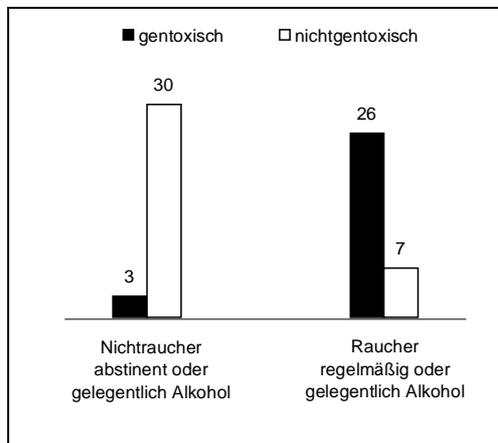


Abbildung 13:

Einfluß von Rauchen und Alkohol auf die gentoxische Aktivität der Speichelproben.

Unter den 33 Rauchern mit regelmäßigem oder gelegentlichem Alkoholkonsum war der Anteil an gentoxischen Proben um das 8,5fache höher als bei den 33 Nichtrauchern ohne oder mit gelegentlichem Alkoholkonsum. Die Speichelproben aus der Gruppe *Raucher/regelmäßig-gelegentlich Alkohol* waren signifikant gentoxischer als die Speichelproben aus der Gruppe *Nichtraucher/abstinent-gelegentlich Alkohol* ($P < 0,002$).

Eine Abhängigkeit der gentoxischen Wirkung der Speichelproben vom Lebensalter der Probanden konnte nicht gezeigt werden (Abbildung 14).

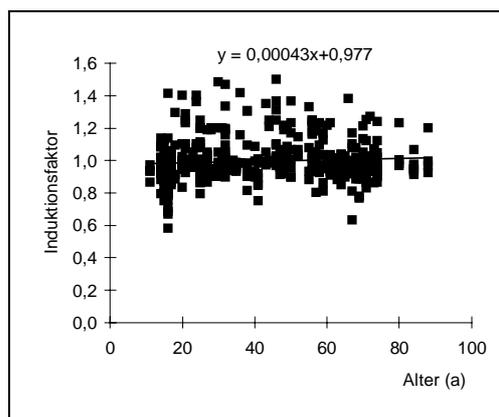


Abbildung 14:

Lebensalter der Probanden und Induktionsfaktor als Maß der gentoxischen Wirkung der Speichelproben

Eine Korrelation zwischen dem Alter der Probanden und der gentoxischen Wirkung der Speichelproben konnte nicht gefunden werden. Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,005717$.

Tabelle 13: Gentoxisches Potential von 131 Speichelproben männlicher Probanden im Salmonella/Mikrosomen-Test (Teststamm TA 98)

Eine Probe wird als positiv im Salmonella/Mikrosomen-Test bewertet, wenn der Induktionsfaktor den Wert $\geq 1,2$ annimmt und/oder eine Konzentration-Wirkung-Beziehung induziert wird. Der Induktionsfaktor IF ist der Quotient aus der induzierbaren Revertanzahl der Probe und der spontanen Revertanzahl (Negativ-/Lösungsmittelkontrolle).

Zeichenerklärung:

WH: Wiederholung; MW: arithmetischer Mittelwert; S: Standardabweichung IF: Induktionsfaktor

Proband	Revertanzahl von Salmonella typhimurium TA 98 und Induktionsfaktor											
	ohne metabolische Aktivierung						mit metabolischer Aktivierung					
	1. WH	2. WH	3. WH	MW	(S)	IF	1. WH	2. WH	3. WH	MW	(S)	IF
1	14	16	15	15	1,0	0,8	18	14	17	16	2,1	0,8
2	12	16	18	15	3,1	0,8	14	16	15	15	1,0	0,8
3	14	11	13	13	1,5	0,6	16	17	14	16	1,5	0,8
4	17	19	17	18	1,2	0,9	16	18	14	16	2,0	0,8
5	20	18	22	20	2,0	1,0	24	22	20	22	2,0	1,1
6	13	15	13	14	1,2	0,7	16	17	17	17	0,6	0,9
7	20	18	16	18	2,0	0,9	14	16	14	15	1,2	0,8
8	11	14	15	13	2,1	0,7	32	24	26	27	4,2	1,4
9	12	13	10	12	1,5	0,6	14	17	16	16	1,5	0,8
10	16	15	14	15	1,0	0,8	16	15	20	17	2,6	0,9
11	22	18	16	19	3,1	0,9	21	18	19	19	1,5	1,0
12	19	16	17	17	1,5	0,9	14	15	17	15	1,5	0,8
13	17	16	15	16	1,0	0,8	14	15	17	15	1,5	0,8
14	20	14	15	16	3,2	0,8	13	12	16	14	2,1	0,7
15	18	17	17	17	0,6	0,9	16	14	18	16	2,0	0,8
16	14	16	17	16	1,5	0,8	20	18	17	18	1,5	0,9
17	16	15	19	17	2,1	0,8	17	19	16	17	1,5	0,9
18	22	14	17	18	4,0	0,9	18	17	16	17	1,0	0,9
19	20	19	17	19	1,5	0,9	14	16	16	15	1,2	0,8
20	24	26	22	24	2,0	1,2	14	20	16	17	3,1	0,9
21	22	18	24	21	3,1	1,1	17	16	20	18	2,1	0,9
22	16	15	18	16	1,5	0,8	20	19	16	18	2,1	0,9
23	20	21	23	21	1,5	1,1	17	24	16	19	4,4	1,0
24	18	20	17	18	1,5	0,9	22	18	16	19	3,1	1,0
25	20	17	16	18	2,1	0,9	18	18	17	18	0,6	0,9
26	14	18	16	16	2,0	0,8	20	19	16	18	2,1	0,9
27	17	19	15	17	2,0	0,9	22	16	18	19	3,1	1,0
28	18	22	21	20	2,1	1,0	19	17	17	18	1,2	0,9

Proband	Revertanzahl von Salmonella typhimurium TA 98 und Induktionsfaktor											
	<i>ohne</i> metabolische Aktivierung						<i>mit</i> metabolischer Aktivierung					
	1. WH	2. WH	3. WH	MW	(S)	IF	1. WH	2. WH	3. WH	MW	(S)	IF
29	17	19	21	19	2,0	1,0	15	16	15	15	0,6	0,8
30	18	20	17	18	1,5	0,9	19	20	24	21	2,6	1,1
31	22	24	20	22	2,0	1,1	19	21	18	19	1,5	1,0
32	16	17	20	18	2,1	0,9	22	18	18	19	2,3	1,0
33	15	21	16	17	3,2	0,9	19	18	19	19	0,6	1,0
34	14	17	20	17	3,0	0,9	20	19	21	20	1,0	1,0
35	17	19	17	18	1,2	0,9	19	15	19	18	2,3	0,9
36	17	18	19	18	1,0	0,9	20	18	19	19	1,0	1,0
37	16	19	19	18	1,7	0,9	18	19	18	18	0,6	0,9
38	20	18	21	20	1,5	1,0	20	22	23	22	1,5	1,1
39	24	18	21	21	3,0	1,1	19	21	18	19	1,5	1,0
40	22	21	21	21	0,6	1,1	20	19	21	20	1,0	1,0
41	26	24	25	25	1,0	1,3	20	19	18	19	1,0	1,0
42	18	19	17	18	1,0	0,9	22	16	17	18	3,2	0,9
43	27	23	24	25	2,1	1,2	18	18	16	17	1,2	0,9
44	18	19	19	19	0,6	0,9	17	18	17	17	0,6	0,9
45	20	18	16	18	2,0	0,9	22	18	17	19	2,6	1,0
46	19	18	19	19	0,6	0,9	14	20	17	17	3,0	0,9
47	17	16	15	16	1,0	0,8	18	20	19	19	1,0	1,0
48	23	21	19	21	2,0	1,1	20	18	19	19	1,0	1,0
49	20	20	19	20	0,6	1,0	17	16	18	17	1,0	0,9
50	21	18	19	19	1,5	1,0	14	17	16	16	1,5	0,8
51	26	25	22	24	2,1	1,2	18	20	16	18	2,0	0,9
52	18	17	20	18	1,5	0,9	16	18	21	18	2,5	0,9
53	17	19	16	17	1,5	0,9	14	17	20	17	3,0	0,9
54	22	24	20	22	2,0	1,1	14	22	21	19	4,4	1,0
55	17	17	16	17	0,6	0,8	20	18	19	19	1,0	1,0
56	28	26	30	28	2,0	1,4	19	21	24	21	2,5	1,1
57	19	16	21	19	2,5	0,9	15	22	18	18	3,5	0,9
58	24	26	20	23	3,1	1,2	17	19	14	17	2,5	0,9
59	18	20	20	19	1,2	1,0	19	14	20	18	3,2	0,9
60	20	24	22	22	2,0	1,1	18	16	20	18	2,0	0,9
61	27	24	23	25	2,1	1,2	20	18	19	19	1,0	1,0
62	18	18	19	18	0,6	0,9	21	19	18	19	1,5	1,0
63	20	17	18	18	1,5	0,9	20	18	21	20	1,5	1,0
64	18	17	20	18	1,5	0,9	19	19	19	19	0,0	1,0
65	24	30	21	25	4,6	1,3	22	19	18	20	2,1	1,0

Proband	Revertanzahl von Salmonella typhimurium TA 98 und Induktionsfaktor											
	<i>ohne</i> metabolische Aktivierung						<i>mit</i> metabolischer Aktivierung					
	1. WH	2. WH	3. WH	MW	(S)	IF	1. WH	2. WH	3. WH	MW	(S)	IF
66	26	22	24	24	2,0	1,2	18	17	21	19	2,1	1,0
67	24	25	25	25	0,6	1,2	19	19	16	18	1,7	0,9
68	19	21	22	21	1,5	1,0	19	18	18	18	0,6	0,9
69	25	26	23	25	1,5	1,2	21	17	16	18	2,6	0,9
70	20	19	18	19	1,0	1,0	18	18	17	18	0,6	0,9
71	19	20	21	20	1,0	1,0	24	16	18	19	4,2	1,0
72	16	20	18	18	2,0	0,9	19	17	17	18	1,2	0,9
73	19	17	17	18	1,2	0,9	20	16	21	19	2,6	1,0
74	20	15	17	17	2,5	0,9	24	18	19	20	3,2	1,1
75	20	18	19	19	1,0	1,0	22	16	19	19	3,0	1,0
76	14	19	20	18	3,2	0,9	18	18	18	18	0,0	0,9
77	21	18	20	20	1,5	1,0	20	19	17	19	1,5	1,0
78	24	20	26	23	3,1	1,2	19	23	22	21	2,1	1,1
79	19	19	21	20	1,2	1,0	20	18	20	19	1,2	1,0
80	23	23	27	24	2,3	1,2	19	18	17	18	1,0	0,9
81	20	19	21	20	1,0	1,0	24	19	21	21	2,5	1,1
82	22	20	20	21	1,2	1,0	19	20	21	20	1,0	1,0
83	36	34	33	34	1,5	1,7	20	24	21	22	2,1	1,1
84	28	26	27	27	1,0	1,4	22	20	19	20	1,5	1,1
85	20	18	17	18	1,5	0,9	19	18	18	18	0,6	0,9
86	17	19	16	17	1,5	0,9	18	18	18	18	0,0	0,9
87	24	25	26	25	1,0	1,3	19	20	22	20	1,5	1,1
88	19	21	16	19	2,5	0,9	20	16	15	17	2,6	0,9
89	17	18	21	19	2,1	0,9	16	17	19	17	1,5	0,9
90	20	19	18	19	1,0	1,0	21	18	19	19	1,5	1,0
91	15	21	19	18	3,1	0,9	17	20	19	19	1,5	1,0
92	18	19	19	19	0,6	0,9	17	16	21	18	2,6	0,9
93	26	26	23	25	1,7	1,3	19	20	18	19	1,0	1,0
94	18	19	20	19	1,0	1,0	20	16	17	18	2,1	0,9
95	22	26	25	24	2,1	1,2	17	21	18	19	2,1	1,0
96	30	28	27	28	1,5	1,4	20	19	18	19	1,0	1,0
97	18	18	19	18	0,6	0,9	17	21	16	18	2,6	0,9
98	20	22	23	22	1,5	1,1	19	24	18	20	3,2	1,1
99	21	17	18	19	2,1	0,9	15	22	18	18	3,5	0,9
100	19	18	15	17	2,1	0,9	21	19	18	19	1,5	1,0
101	17	20	19	19	1,5	0,9	23	17	18	19	3,2	1,0
102	17	19	18	18	1,0	0,9	21	19	18	19	1,5	1,0

Proband	Revertanzahl von Salmonella typhimurium TA 98 und Induktionsfaktor											
	<i>ohne</i> metabolische Aktivierung						<i>mit</i> metabolischer Aktivierung					
	1. WH	2. WH	3. WH	MW	(S)	IF	1. WH	2. WH	3. WH	MW	(S)	IF
103	29	33	26	29	3,5	1,5	19	19	20	19	0,6	1,0
104	26	29	29	28	1,7	1,4	20	18	17	18	1,5	0,9
105	22	18	19	20	2,1	1,0	17	19	19	18	1,2	0,9
106	18	19	20	19	1,0	1,0	19	20	18	19	1,0	1,0
107	22	23	23	23	0,6	1,1	18	19	20	19	1,0	1,0
108	21	20	19	20	1,0	1,0	19	21	21	20	1,2	1,1
109	18	19	19	19	0,6	0,9	16	16	18	17	1,2	0,9
110	16	21	18	18	2,5	0,9	21	19	19	20	1,2	1,0
111	29	33	28	30	2,6	1,5	17	19	20	19	1,5	1,0
112	18	20	19	19	1,0	1,0	21	19	20	20	1,0	1,0
113	18	15	19	17	2,1	0,9	19	22	18	20	2,1	1,0
114	24	26	20	23	3,1	1,2	15	19	18	17	2,1	0,9
115	21	19	20	20	1,0	1,0	20	20	20	20	0,0	1,0
116	17	18	16	17	1,0	0,9	16	22	20	19	3,1	1,0
117	32	28	29	30	2,1	1,5	19	21	21	20	1,2	1,1
118	19	16	17	17	1,5	0,9	20	18	17	18	1,5	0,9
119	22	18	19	20	2,1	1,0	17	19	16	17	1,5	0,9
120	17	18	18	18	0,6	0,9	20	19	19	19	0,6	1,0
121	19	20	21	20	1,0	1,0	18	20	22	20	2,0	1,0
122	23	19	18	20	2,6	1,0	16	18	20	18	2,0	0,9
123	26	25	24	25	1,0	1,3	21	17	19	19	2,0	1,0
124	18	20	19	19	1,0	1,0	21	17	18	19	2,1	1,0
125	22	22	20	21	1,2	1,1	18	20	17	18	1,5	0,9
126	19	18	18	18	0,6	0,9	20	21	18	20	1,5	1,0
127	24	25	25	25	0,6	1,2	19	18	19	19	0,6	1,0
128	28	26	26	27	1,2	1,3	17	16	19	17	1,5	0,9
129	21	19	18	19	1,5	1,0	18	20	21	20	1,5	1,0
130	24	19	16	20	4,0	1,0	20	19	18	19	1,0	1,0
131	18	23	20	20	2,5	1,0	19	19	21	20	1,2	1,0
Kon- trolle	18	20	22	20	2,0	1	19	18	21	19	1,5	1,0

Tabelle 14: Gentoxisches Potential von 131 Speichelproben männlicher Probanden im Salmonella/Mikrosomen-Test (Teststamm TA 100)

Eine Probe wird als positiv im Salmonella/Mikrosomen-Test bewertet, wenn der Induktionsfaktor den Wert $\geq 1,2$ annimmt und/oder eine Konzentration-Wirkung-Beziehung induziert wird. Der Induktionsfaktor IF ist der Quotient aus der induzierbaren Revertanzahl der Probe und der spontanen Revertanzahl (Negativ-/Lösungsmittelkontrolle).

Zeichenerklärung:

WH: Wiederholung; MW: arithmetischer Mittelwert; S: Standardabweichung IF: Induktionsfaktor

Proband	Revertanzahl von Salmonella typhimurium TA 100 und Induktionsfaktor											
	ohne metabolische Aktivierung						mit metabolischer Aktivierung					
	1. WH	2. WH	3. WH	MW	(S)	IF	1. WH	2. WH	3. WH	MW	(S)	IF
1	144	152	162	153	9,0	0,9	146	154	138	146	8,0	0,9
2	142	155	158	152	8,5	0,9	166	144	156	155	11,0	0,9
3	162	153	158	158	4,5	0,9	163	171	159	164	6,1	1,0
4	157	163	149	156	7,0	0,9	154	147	161	154	7,0	0,9
5	153	147	161	154	7,0	0,9	172	161	159	164	7,0	1,0
6	161	157	165	161	4,0	0,9	149	156	162	156	6,5	0,9
7	154	144	160	153	8,1	0,9	151	162	149	154	7,0	0,9
8	147	159	161	156	7,6	0,9	158	163	151	157	6,0	0,9
9	158	150	164	157	7,0	0,9	171	161	158	163	6,8	1,0
10	144	148	155	149	5,6	0,9	163	168	173	168	5,0	1,0
11	156	147	162	155	7,5	0,9	170	152	162	161	9,0	0,9
12	162	168	172	167	5,0	1,0	156	174	167	166	9,1	1,0
13	152	176	161	163	12,1	1,0	162	159	173	165	7,4	1,0
14	173	149	156	159	12,3	0,9	161	168	154	161	7,0	0,9
15	163	157	172	164	7,5	1,0	156	166	172	165	8,1	1,0
16	154	162	171	162	8,5	0,9	158	149	161	156	6,2	0,9
17	180	152	149	160	17,1	0,9	170	162	143	158	13,9	0,9
18	154	162	161	159	4,4	0,9	156	176	165	166	10,0	1,0
19	168	149	154	157	9,8	0,9	161	157	162	160	2,6	0,9
20	212	186	174	191	19,4	1,1	232	198	212	214	17,1	1,2
21	173	155	163	164	9,0	1,0	169	174	158	167	8,2	1,0
22	196	182	184	187	7,6	1,1	172	168	154	165	9,5	1,0
23	174	176	154	168	12,2	1,0	182	196	172	183	12,1	1,1
24	168	172	146	162	14,0	0,9	147	156	161	155	7,1	0,9
25	232	221	212	222	10,0	1,3	198	185	181	188	8,9	1,1
26	178	156	182	172	14,0	1,0	164	173	180	172	8,0	1,0
27	186	168	157	170	14,6	1,0	158	182	159	166	13,6	1,0
28	173	162	167	167	5,5	1,0	180	173	191	181	9,1	1,1

29	198	182	176	185	11,4	1,1	199	203	183	195	10,6	1,1
30	168	174	182	175	7,0	1,0	174	181	168	174	6,5	1,0
31	173	164	162	166	5,9	1,0	186	204	191	194	9,3	1,1
32	162	158	170	163	6,1	1,0	166	178	184	176	9,2	1,0
33	154	168	176	166	11,1	1,0	172	192	181	182	10,0	1,1
34	166	160	170	165	5,0	1,0	168	171	173	171	2,5	1,0
35	178	158	159	165	11,3	1,0	156	182	161	166	13,8	1,0
36	236	212	223	224	12,0	1,3	231	219	221	224	6,4	1,3
37	209	196	212	206	8,5	1,2	198	210	204	204	6,0	1,2
38	176	168	172	172	4,0	1,0	156	183	172	170	13,6	1,0
39	164	170	171	168	3,8	1,0	159	163	169	164	5,0	1,0
40	204	191	193	196	7,0	1,1	181	176	172	176	4,5	1,0
41	241	236	226	234	7,6	1,4	192	184	190	189	4,2	1,1
42	176	163	167	169	6,7	1,0	180	159	164	168	11,0	1,0
43	242	228	231	234	7,4	1,4	192	174	183	183	9,0	1,1
44	198	183	177	186	10,8	1,1	164	172	176	171	6,1	1,0
45	175	181	169	175	6,0	1,0	170	158	161	163	6,2	0,9
46	241	217	226	228	12,1	1,3	189	192	174	185	9,6	1,1
47	213	199	194	202	9,8	1,2	172	183	185	180	7,0	1,0
48	204	196	216	205	10,1	1,2	192	186	184	187	4,2	1,1
49	172	184	164	173	10,1	1,0	156	174	167	166	9,1	1,0
50	167	175	145	162	15,5	0,9	170	164	156	163	7,0	1,0
51	162	165	171	166	4,6	1,0	182	174	188	181	7,0	1,1
52	158	171	167	165	6,7	1,0	162	171	159	164	6,2	1,0
53	172	146	166	161	13,6	0,9	170	157	163	163	6,5	1,0
54	168	172	176	172	4,0	1,0	183	159	165	169	12,5	1,0
55	169	175	182	175	6,5	1,0	158	167	173	166	7,5	1,0
56	227	239	234	233	6,0	1,4	198	187	171	185	13,6	1,1
57	159	165	171	165	6,0	1,0	183	172	153	169	15,2	1,0
58	202	185	192	193	8,5	1,1	171	182	179	177	5,7	1,0
59	170	153	161	161	8,5	0,9	156	173	159	163	9,1	0,9
60	204	196	214	205	9,0	1,2	196	181	178	185	9,6	1,1
61	225	205	231	220	13,6	1,3	182	178	192	184	7,2	1,1
62	242	231	236	236	5,5	1,4	174	155	161	163	9,7	1,0
63	198	204	209	204	5,5	1,2	164	182	177	174	9,3	1,0
64	182	164	171	172	9,1	1,0	177	168	172	172	4,5	1,0
65	204	212	216	211	6,1	1,2	164	179	166	170	8,1	1,0
66	146	156	174	159	14,2	0,9	180	162	171	171	9,0	1,0
67	158	167	169	165	5,9	1,0	168	170	173	170	2,5	1,0
68	170	164	159	164	5,5	1,0	182	177	163	174	9,8	1,0

69	201	213	217	210	8,3	1,2	199	186	178	188	10,6	1,1
70	172	162	166	167	5,0	1,0	182	170	167	173	7,9	1,0
71	168	173	165	169	4,0	1,0	146	172	164	161	13,3	0,9
72	158	165	170	164	6,0	1,0	181	164	162	169	10,4	1,0
73	170	168	180	173	6,4	1,0	178	166	171	172	6,0	1,0
74	214	197	199	203	9,3	1,2	178	180	176	178	2,0	1,0
75	170	174	167	170	3,5	1,0	162	171	159	164	6,2	1,0
76	208	212	202	207	5,0	1,2	170	166	167	168	2,1	1,0
77	182	156	168	169	13,0	1,0	146	158	164	156	9,2	0,9
78	193	179	182	185	7,4	1,1	156	164	170	163	7,0	1,0
79	168	172	168	169	2,3	1,0	173	169	170	171	2,1	1,0
80	204	193	199	199	5,5	1,2	177	174	168	173	4,6	1,0
81	170	166	165	167	2,6	1,0	162	174	176	171	7,6	1,0
82	160	156	172	163	8,3	0,9	158	161	169	163	5,7	0,9
83	205	211	220	212	7,5	1,2	174	147	159	160	13,5	0,9
84	171	168	161	167	5,1	1,0	163	172	175	170	6,2	1,0
85	159	171	165	165	6,0	1,0	174	173	182	176	4,9	1,0
86	173	160	166	166	6,5	1,0	148	171	163	161	11,7	0,9
87	196	207	201	201	5,5	1,2	172	146	168	162	14,0	0,9
88	172	166	158	165	7,0	1,0	163	171	159	164	6,1	1,0
89	165	173	181	173	8,0	1,0	165	172	155	164	8,5	1,0
90	163	171	170	168	4,4	1,0	152	175	161	163	11,6	0,9
91	212	199	206	206	6,5	1,2	178	181	162	174	10,2	1,0
92	171	163	174	169	5,7	1,0	156	166	172	165	8,1	1,0
93	177	169	165	170	6,1	1,0	159	164	154	159	5,0	0,9
94	173	168	176	172	4,0	1,0	169	161	174	168	6,6	1,0
95	164	159	178	167	9,8	1,0	171	159	162	164	6,2	1,0
96	203	197	194	198	4,6	1,2	162	170	174	169	6,1	1,0
97	173	181	175	176	4,2	1,0	156	173	162	164	8,6	1,0
98	196	209	214	206	9,3	1,2	162	156	173	164	8,6	1,0
99	154	161	170	162	8,0	0,9	156	157	162	158	3,2	0,9
100	198	232	213	214	17,0	1,3	146	171	156	158	12,6	0,9
101	173	167	161	167	6,0	1,0	164	173	178	172	7,1	1,0
102	164	173	178	172	7,1	1,0	156	163	154	158	4,7	0,9
103	207	193	212	204	9,8	1,2	168	172	176	172	4,0	1,0
104	164	173	167	168	4,6	1,0	156	164	166	162	5,3	0,9
105	186	164	176	175	11,0	1,0	172	168	168	169	2,3	1,0
106	164	170	168	167	3,1	1,0	156	146	172	158	13,1	0,9
107	148	182	176	169	18,1	1,0	163	148	166	159	9,6	0,9
108	158	163	169	163	5,5	1,0	156	170	168	165	7,6	1,0

109	163	167	157	162	5,0	0,9	190	180	179	183	6,1	1,1
110	154	165	171	163	8,6	1,0	176	206	174	185	17,9	1,1
111	231	226	217	225	7,1	1,3	194	187	181	187	6,5	1,1
112	184	178	163	175	10,8	1,0	180	164	172	172	8,0	1,0
113	192	168	178	179	12,1	1,0	170	168	163	167	3,6	1,0
114	180	186	152	173	18,1	1,0	154	172	166	164	9,2	1,0
115	146	158	162	155	8,3	0,9	175	191	169	178	11,4	1,0
116	171	164	166	167	3,6	1,0	183	156	162	167	14,2	1,0
117	197	217	203	206	10,3	1,2	171	168	169	169	1,5	1,0
118	206	217	230	218	12,0	1,3	164	158	179	167	10,8	1,0
119	156	181	175	171	13,1	1,0	156	163	163	161	4,0	0,9
120	171	165	173	170	4,2	1,0	181	156	170	169	12,5	1,0
121	169	180	170	173	6,1	1,0	146	182	169	166	18,2	1,0
122	147	173	180	167	17,4	1,0	172	168	163	168	4,5	1,0
123	212	217	192	207	13,2	1,2	168	172	175	172	3,5	1,0
124	162	169	173	168	5,6	1,0	163	174	179	172	8,2	1,0
125	153	161	163	159	5,3	0,9	182	159	161	167	12,7	1,0
126	170	174	183	176	6,7	1,0	170	176	160	169	8,1	1,0
127	166	173	164	168	4,7	1,0	162	181	173	172	9,5	1,0
128	201	195	198	198	3,0	1,2	176	164	169	170	6,0	1,0
129	165	176	181	174	8,2	1,0	163	170	180	171	8,5	1,0
130	168	175	169	171	3,8	1,0	173	162	164	166	5,9	1,0
131	177	190	162	176	14,0	1,0	162	173	177	171	7,8	1,0
Kon- trolle	158	174	182	171	12,2	1	180	162	173	172	9,1	1

4.4. Vergleich von zytotoxischer und gentoxischer Aktivität in den Speichelproben

Ohne Wirkung in der Zellkultur und im Salmonella/Mikrosomen-Test blieben 58 % (n = 77) der 131 getesteten Speichelproben. Von den sieben stark zytotoxischen Proben waren vier zugleich gentoxisch in mindestens einem der beiden Salmonella-Teststämmen; drei der stark zytotoxischen Speichelproben zeigten keinen gentoxischen Effekt. Zehn Speichelproben wirkten gentoxisch, aber nicht zytotoxisch. 29 Proben waren sowohl mäßig zytotoxisch in der Säugerzelle und als auch gentoxisch in Salmonella Stamm TA 98 und/oder TA 100; acht Proben mit einer mäßigen Zytotoxizität waren nichtgentoxisch. Von den 77 nichtzytotoxischen/nichtgentoxischen Speichelproben stammten 75 von Nichtrauchern, nur zwei dieser Proben kamen von Rauchern. Eine zytotoxische und gentoxische Wirkung fand sich hingegen überwiegend in den Speichelproben von Rauchern (vgl. Tabelle 15 und Abbildung 15).

Tabelle 15: Zytotoxische und gentoxische Wirkung der 131 Speichelproben

Biologische Wirkung	Zahl der Speichelproben		
	nichtzytotoxisch (Nichtraucher/Raucher)	mäßig zytotoxisch (Nichtraucher/Raucher)	stark zytotoxisch (Nichtraucher/Raucher)
nichtgentoxisch (n = 88)	77 (75/2)	8 (5/ 3)	3 (0/3)
gentoxisch (n = 43)	10 (10/0)	29 (5/24)	4 (0/4)

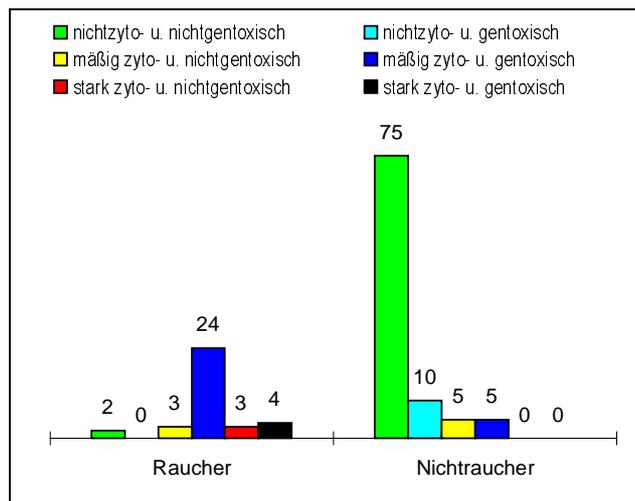


Abbildung 15:

Zyto- und gentoxische Aktivität der Speichelproben der 131 Studienteilnehmer. 28 der 33 sowohl zyto- als auch gentoxischen Proben stammten aus der Rauchergruppe. 75 von 77 Speichelproben ohne eine zyto- und gentoxische Wirkung waren von Nichtrauchern.

5. Diskussion

Für die nächsten vierzig Jahre rechnet man weltweit mit einem 50prozentigen Anstieg der Tumorerkrankungen. Ursache dieser Entwicklung ist eine Kombination von verschiedenen Faktoren, so z.B. der individuelle Lebensstil, Erbfaktoren und die Exposition und Aufnahme von kanzerogenen Substanzen aus der Umwelt. Ein wesentlicher Arbeitsschwerpunkt zur Verringerung der Tumorerkrankungen wird in der Fortsetzung und Verbesserung der Prophylaxe und Früherkennung gesehen. Das umfaßt zum einen die Identifikation von kanzerogenen Noxen und, daraus resultierend im Sinne eines proaktiven Umwelt- und Gesundheitsschutzes, als Ziel, ihren Eintritt in die Umwelt oder ihre Handhabung zu verhindern bzw. zu minimieren, zum anderen die Identifikation und Validierung von Biomarkern, die mit dem Prozeß der Kanzerogenese assoziiert sind. Durch den Einsatz solcher Biomarker eröffnen sich u.a. auch Möglichkeiten, Entwicklungs- und Verlaufsmechanismen im Kanzerogenesgeschehen aufzuzeigen und damit im präventiven Gesundheitsschutz letztlich auch Risikopersonen zu identifizieren.

Biomarker beschreiben biologische, chemische und physikalische Methoden in Humanproben, wie Zellen, Gewebe, Blut, Speichel oder Urin. Diese Verfahren erlauben den Nachweis einer Exposition gegenüber einem bestimmten oder unbestimmten Agens, eine eingetretene Wirkung oder eine angeborene wie auch erworbene Disposition und Suszeptibilität. Sie umgrenzen ein breites Kontinuum vom Normalzustand über ein präklinisches Stadium bis zum klinischen Krankheitsbild.

Viel und kontrovers wurde über die Zuverlässigkeit gentoxischer Tests für die Vorhersage der kanzerogenen Potenz eines Stoffes diskutiert. Ames erkannte 90 % der bis dahin untersuchten Kanzerogene auch als mutagen im (inzwischen fest etablierten) Salmonella/Mikrosomen-Test (Ames et al. 1975). Mitte der 80er Jahre kamen erhebliche Zweifel auf, ob die Empfindlichkeit und Genauigkeit einfacher In-vitro-Mutagenitätstests ausreichen, kanzerogene Noxen zuverlässig zu identifizieren (Brookman und DeMarini 1988, Heddle 1988, Shelby et al. 1988). Untersuchungen zur Validierung der Tests mit Nager-Kanzerogenen erbrachten nur eine 60 %ige Übereinstimmung von Kanzerogenität und Mutagenität. Das führte zu den Überlegungen, daß eine Reihe der für den Nager kanzerogenen Noxen nicht über den Weg des mutagenen/elektrophilen Zwischenproduktes wirkt; der Begriff der nichtgentoxischen Kanzerogene wurde eingeführt. Bisher ist von keinem der nichtgentoxischen Kanzerogene der genaue Mechanismus vollständig aufgeklärt; es mehren sich aber die Hinweise, daß einige von ihnen mit endogenen Liganden um Rezeptoren des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung konkurrieren. Dieser

Wirkmechanismus wird aufgrund der erforderlichen „Paßgenauigkeit“ auf wenige Noxen begrenzt bleiben. Im Gegensatz dazu laufen Biotransformationsvorgänge, bei denen die gentoxischen Intermediate aus zahlreichen Fremdstoffen entstehen, mit einer eher geringen Substratspezifität ab. Die für den Menschen kanzerogenen Agenzien wiesen zu 80 -90 % auch gentoxische Aktivitäten auf. Nichtgentoxische Kanzerogene scheinen für den Menschen weniger bedeutsam zu sein (IARC 1987). Die hohe Prävalenz gentoxischer Substanzen unter den für den Menschen nachgewiesenen Kanzerogenen rechtfertigt den weiteren Einsatz von solchen Tests, die DNA-Schäden, Gen- und Chromosomenveränderungen zum Endpunkt haben. Gentoxizitätstests bleiben bei aller Verbesserungswürdigkeit ein wichtiges Instrument, (neue) kanzerogene und mutagene Wirkungen zu identifizieren.

Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Salmonella/Mikrosomen-Test detektiert Genmutationen und findet breite Anwendung in der Testung von Einzelsubstanzen und komplexen Gemischen aus Umweltproben und Körperflüssigkeiten und ist heute der Basistest zum Nachweis direkt und indirekt mutagen wirkender Noxen.

Für den Endpunkt Zytotoxizität liegen mit primären und permanenten Zellkulturen eine Reihe gut etablierter und aussagekräftiger Methoden vor. Das Testsystem ‘plating efficiency’ in Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters wurde ausgewählt, da bezüglich der Zytotoxizitätsbestimmung die Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien nur gering ausfallen und ein bereits gut validiertes Protokoll vorliegt (Grummt et al. persönliche Mitteilung).

Zytotoxizität, die auf der gentoxischen Wirkung einer Substanz beruht, wird in der Regel zeitverzögert wirksam. Mit der Messung der ‘plating efficiency’ in der Säugerzellkultur lassen sich diese Zeiteffekte erfassen. Durch die 7- bis 10tägige Inkubation der Zellen über 7 bis 10 Tage wird berücksichtigt, daß akute Schäden über Reparatur- und Adaptionsvorgänge durch die Zelle behoben werden können. Der Parameter Zytotoxizität charakterisiert die biologische Toleranz bei Schadstoffbelastung und erlaubt Rückschlüsse auf die Anpassungsfähigkeit eines biologischen Systems in Abhängigkeit von Exposition und Zeit (Guettinger 1993). Jede biochemische und physiologische Veränderung, wirkt sie nur ausreichend stark und lange auf das Zielorgan ein, wird eine morphologische Reaktion zur Folge haben (Hinton und Larén 1990). Zytotoxische Wirkungen sollten daher insbesondere bei langfristiger Schadstoffeinwirkung unter dem Aspekt einer irreversiblen Schädigung von Zellmembranen, -organellen und -kompartimenten sowie Enzymsystemen bewertet werden. Werden zelluläre Abwehrmechanismen wie Fremdstoffentgiftung, DNA-

Reparatur und Immunkompetenz gestört, läßt sich leicht ein Zusammenhang zwischen zytotoxischer und genotoxischer Wirkung herstellen. Diesen Zusammenhang haben Ashby und Tennant für verschiedene Verbindungsklassen beschrieben (Ashby und Tennant 1988, 1991). Ein Absterben von Gewebszellen löst eine vermehrte Mitogenese aus; dieser Anstieg der Zellteilung begünstigt die Kanzerogenese. Über den toxischen Wirkmechanismus, dem Auslösen chronischer Mitogenese und Entzündung, können nichtgenotoxische Substanzen (z.B. Saccharin) eine dosisabhängige kanzerogene Aktivität entfalten (Cohen und Ellwein 1990, Ames und Gold 1991).

Alle oral aufgenommenen Stoffe kommen zunächst mehr oder weniger mit Speichel in Kontakt. Speichel ist maßgeblich an der Stoffaufnahme und -umwandlung, am Stofftransport und an der Verweildauer aktiver Metaboliten im Mund-Rachen-Raum beteiligt. Speichel enthält zahlreiche Elektrolyte und organische Stoffe, verfügt über enzymatische (siehe u.a. Nishioka und Nunoshiba 1986) und immunkompetente Aktivitäten. Die unkomplizierte Probenentnahme macht ihn darüber hinaus für das Biomonitoring zu einer leicht zugänglichen Untersuchungsmatrix, um Stoffgehalt, -vorgänge und Umwandlungen in der Mundhöhle zu analysieren. So führte z.B. die Aufnahme von nitratreichem Trinkwasser zu einem nachweisbaren Anstieg von Nitrat und Nitrit im Speichel (van Maanen et al. 1996). Speichel von betel- und tabakkauenden Probanden löste Chromosomenschäden in der Säugerzellkultur aus (Stich und Stich 1982). Neben Speichel konnten auch in anderen Körperflüssigkeiten wie Magensaft und Galle mutagene und zytotoxische Aktivitäten gefunden werden (O'Connor et al. 1988). Bisher fehlen aber Untersuchungen zur In-vitro-Genotoxizität im Speichel belasteter Personengruppen in den bakteriellen Testsystemen.

Seit Jahren besteht Konsens, daß mit dem Tabakrauchen zwei fundamentale zelluläre Wirkungen verbunden sind: die Mutagenität und die Zytotoxizität (Hopkin und Evans 1984), die beide zur Krebsentwicklung in Lunge, oberen Atemwegen und Mund-Rachen-Raum führen können. An vielen Biomarkern sind die negativen Folgen des Rauchens gezeigt worden: Die Genmutationsfrequenz, die Chromosomenaberrations- und Schwesterchromatidaustausch-Rate sind in peripheren Lymphozyten von Rauchern signifikant höher als bei Nichtrauchern (Ammenheuser et al. 1997, Perera et al. 1987). Zigarettenraucher haben mehr DNA-Addukte in Lunge und Bronchien als Nichtraucher (Perera et al. 1987, Phillips et al. 1990); auch nimmt die Konzentration an Hämoglobinaddukten, ausgelöst von Kanzerogenen, wie sie im Tabakrauch vorkommen, bei Rauchern und Passivrauchern zu (Bartsch et al. 1990). Der Uringehalt an Thioether,

Nikotin und seiner Metabolite steigt mit zunehmendem Zigarettenverbrauch an (Granella et al. 1996). Urin von Rauchern ist im Ames-Test mutagener als von Nichtrauchern (Doolittle et al. 1990, Kuenemann-Migeot et al. 1996, 1997, Scherer et al. 1996, Smith et al. 1996). Auch in anderen In-vitro-Testsystemen konnte die genotoxische Wirkung von Tabakinhaltsstoffen, von Tabakrauch und Tabakrauchkondensat sowie zahlreicher ihrer Einzelkomponenten nachgewiesen werden (Gairola 1982, Riebe und Westphal 1983, Mohtashamipur et al. 1987, Curvall et al. 1987, Munzer und Renner 1989, Rahn 1991, Trivedi et al. 1993, Yim und Hee 1995, Doolittle et al. 1995).

In dieser Arbeit wurden 131 Speichelproben männlicher Probanden auf zyto- und genotoxische Wirkung untersucht. Mit der Bestimmung der 'plating efficiency' konnte gezeigt werden, daß ein Zusammenhang zwischen zytotoxischer Wirkung des Speichels und dem Rauchverhalten der Probanden sehr wahrscheinlich ist. Lediglich in zwei von 36 Speichelproben aus der Rauchergruppe konnte keine zytotoxische Aktivität nachgewiesen werden, während umgekehrt im Speichel der 53 (permanenten) Nichtraucher nur bei drei Proben ein zytotoxischer Effekt gefunden wurde. Der Unterschied in der zytotoxischen Aktivität der Speichelproben zwischen Rauchern und Nichtrauchern war hoch signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0,2\%$). Der Alkoholkonsum beider Vergleichsgruppen nahm darauf keinen Einfluß. Eine ähnliche Relation ergab sich am biologischen Endpunkt Genotoxizität: Unter den Rauchern war die Zahl genotoxisch zu klassifizierender Speichelproben deutlich ausgeprägter als unter den Nichtrauchern. Nur wenige Speichelproben von Nichtrauchern wirkten unter den gewählten Versuchsbedingungen genotoxisch. Diese genotoxischen Unterschiede im Speichel von Rauchern und Nichtrauchern konnten allerdings erst statistisch abgesichert werden, wenn auch der Alkoholkonsum berücksichtigt wurde. Dann erwies sich die höhere genotoxische Aktivität im Speichel aller 36 Raucher als signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$) im Vergleich zu den Nichtrauchern mit nur mäßigem oder ohne Alkoholgenuß.

Das Ziel der Arbeit bestand darin, die Aussagefähigkeit der Speicheltestung auf zyto- und genotoxische Effekte zu überprüfen; die Untersuchungen waren aber nicht daraufhin angelegt, die biologischen Testverfahren mit chemischer Analytik hinsichtlich der Ursachenfindung in der Kausalkette zu kombinieren. In der Studie mußte aufgrund der relativ großen Personenzahl auf eine vorgegebene, kontrollierte nichtmutagene Diät verzichtet werden. Unsere Nahrungsmittel enthalten eine Reihe mutagener Substanzen, die sowohl bei der Zubereitung entstehen als auch natürlicherweise bereits in den Lebensmitteln vorkommen können (Ames 1983, Moon und Micozzi 1989). Aufgrund des engen Kulturkreises unserer

Probanden mit vergleichsweise ähnlichen Ernährungsformen ist dieser Einflußfaktor vernachlässigt worden. Eine chemische Analyse der Nahrung und die Identifizierung einzelner chemischer Komponenten im Speichel konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geleistet werden.

Ein wesentlicher 'Nahrungsfaktor' ist der Alkohol. Alkoholbedingte Lebererkrankungen reichen von reversibler Fettleber bis zur irreversiblen Zirrhose. Alkohol verursacht Störungen im Gastrointestinaltrakt und kann zur chronischen Pankreatitis führen, schädigt das Immunsystem, führt zu einer Reihe neurologischer und psychologischer Probleme und wirkt bekanntermaßen teratogen. Auf der anderen Seite reduziert moderater Alkoholgenuß das Risiko einer koronaren Herzerkrankung (Doll et al. 1994).

Die alleinige Betrachtung von Alkoholkonsum und biologischer Wirkung des Speichels widerspiegelte einen weniger eindeutigen Zusammenhang von Alkoholkonsum und Genotoxizität/Zytotoxizität als dies beim Faktor 'Rauchen' und Genotoxizität/Zytotoxizität erkennbar war. Obwohl die Hälfte der Speichelproben von Probanden, die einen regelmäßigen Alkoholgenuß angegeben haben, keine zytotoxischen und gentoxischen Aktivitäten aufwiesen, blieb aber die überwiegende Mehrzahl an Speichelproben der abstinent lebenden Personen in den eingesetzten Testverfahren ohne biologische Wirkung, und nur in wenigen Proben dieses Personenkreises ließen sich Zytotoxizität und Genotoxizität detektieren. Populationsstudien zum gentoxischen Einfluß von Alkohol erwiesen sich als schwierig. In den Fragebögen sind die gemachten Angaben zum tatsächlichen Alkoholverbrauch häufig ungenau und werden gern nach unten korrigiert, während Raucher relativ exakt ihren täglichen Zigarettenverbrauch beziffern können und auch benennen. Personen, die nur gelegentlich Alkohol trinken oder völlig auf Alkohol verzichten können, sind in den allermeisten Fällen auch permanente Nichtraucher. Umgekehrt ist ein hoher Alkoholkonsum sehr häufig mit einem ausgeprägten Rauchverhalten verbunden. In der Gegenüberstellung der Untersuchungsteilnehmer als Raucher/Alkoholgenuß und Nichtraucher/mäßig Alkohol bzw. Alkoholverzicht konnte dann auch in dieser Arbeit gezeigt werden: Speichelproben mit stark zytotoxischer/gentoxischer Wirkung stammten von Rauchern mit regelmäßigen Alkoholgenuß, während in 90 % der Speichelproben von abstinenten Nichtrauchern diese gesuchten biologischen Wirkungen ausblieben. Die gewählten Endpunkte Zytotoxizität und Genotoxizität markieren die (entscheidende) Summe der komplexen Einflüsse. Welcher einzelne Anteil an der Wirkung dem Rauchen bzw. dem Alkoholkonsum zuzuschreiben ist, sollte mit der hier durchgeführten Studie nicht im Detail beurteilt werden. Im Verfahren

der logistischen Regression ließ aber aufzeigen, daß Rauchen der stärkere Risikofaktor ist (Rauchen: Odds Ratio = 5,4, $p = 0,04$; Alkohol: Odds Ratio = 3,4, $p = 0,13$). Beim Zusammentreffen von Rauchen und Alkohol erhöht sich das Risiko für einen zyto- und/oder genotoxischen Speichel wesentlich (Rauchen + Alkohol: Odds Ratio = 12,9, $p = 0,002$).

Die Verbindung von Alkohol und Krebs ist seit langem bekannt. Bereits 1910 fand Lamy, daß 80 % der Patienten mit Ösophagus- und Magenkrebs Alkoholiker waren (Lamy 1910). In vielen Ländern belegt die Mortalitätsstatistik ein hohes Krebsrisiko unter den Beschäftigten der Herstellung und des Vertriebes alkoholischer Getränke (Clemmesen 1965, Jensen 1979). 1988 klassifizierten die IARC und die WHO Alkohol als kanzerogenes Risiko (IARC 1988). Alkohol, Tabakkauen und Rauchen gehören demnach zu den wichtigen exogenen, überwiegend durch den Lebensstil bedingten Krebsrisikofaktoren. Das belegen seit Jahrzehnten zahlreiche epidemiologische Vergleiche in verschiedenen Ländern und unterschiedlichen Kulturkreisen. Ein nahezu klassisches Beispiel sind die Studien unter Mormonen und Sieben-Tage-Adventisten, die aus religiösen Gründen das Rauchen und den Genuß alkoholischer Getränke strikt ablehnen. Diese Bevölkerungsgruppen haben eine deutlich niedrigere Erkrankungsrate an Magen- und Speiseröhrenkrebs und Tumoren des Mund-Rachen-Raumes als auf der Grundlage der Krebsstatistik beispielsweise der USA (Wynder et al. 1959, Lyon 1976, Phillips 1980) und Dänemarks (Jensen 1983) zu erwarten wäre. Nicht wenige Autoren konnten einen synergistischen Zusammenhang von Rauchen und Alkohol auch für die Entstehung von Mundhöhlenkrebs belegen und fanden unter starken Rauchern mit hohem Alkoholverbrauch einen vielfachen Anstieg des relativen Risikos im Vergleich zu Personen, die weder rauchten noch tranken (Rothman und Keller 1972, Graham et al. 1977, Tuyns et al. 1987, Spitz et al. 1988).

In der neueren DÖSAK-Studie (Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, DÖSAK 1998) sind die Daten von 8678 Patienten mit primären Plattenepithelkarzinomen ausgewertet und dazu die Häufigkeit von Risikokonstellationen abgeleitet worden. Von den einzelnen Risikofaktoren erhöhte das Rauchen am deutlichsten, d.h. um 14 %, die Häufigkeit eines Mundhöhlenkrebses. Danach folgen schlechte Mundhygiene (etwa 6 %) und starker Alkoholkonsum (ca. 3 %). Die Kombination zweier dieser Faktoren steigerte das Krebsrisiko bis zu 17 %; die 'Trias' aus Rauchen, Alkohol und mangelnder Mundhygiene führten zu einem starken Risikoanstieg auf etwa 40 %.

Mundhöhlentumore zeigen sich im Frühstadium meist symptomlos als leukoplakische oder erythroplakische Schleimhautveränderungen. Bei einfachen Leukoplakien kommt es in 3 bis 5 % zu einer Tumortransformation, verruköse Leukoplakien entarten in etwa 20 bis 26 % und erosive Leukoplakien bis zu 40 % in ein Karzinom (Zenkel und Rettinger 1997). Zu einem frühen Zeitpunkt sind solche Malignome bereits durch eine minimal-invasive Therapie mit sehr guten Heilungschancen zu behandeln. Hier genügt häufig bereits eine Laserresektion des Tumorherdes mit Heilungsraten von bis zu 90 %.

Die Voraussetzungen für ein Screening und eine Früherkennung von Tumoren im Mund-Rachen-Raum sind relativ günstig, da die zu untersuchenden Regionen der Entnahme von Probenmaterial und einer lokalen Begutachtung leicht zugänglich sind. Die Zunahme des Raucheranteils unter Frauen und Jugendlichen und ein Anstieg an Tumoren der Mundhöhle unter jüngeren Patienten belegen zum einen die Notwendigkeit permanenter und gezielter Gesundheitserziehung und Prophylaxe, zum anderen die relative Wirkungslosigkeit von Antitabakkampagnien zumindest in Teilen der Bevölkerung. Aufgrund der bekannten und vermeidbaren Risikofaktoren für Oropharynxtumore und einer damit möglichen Begrenzung der Risikogruppen muß in die Vorsorgeuntersuchung nicht eine Gesamtpopulation einbezogen werden, wie dies z.B. bei Frauen zur Früherkennung des Zervixkarzinoms oder bei Männern in der Prophylaxe des Prostatakrebses als sinnvoll vorgegeben ist. Die Risikofaktoren 'Rauchen' und 'Alkohol' finden sich andererseits gehäuft in den sozial benachteiligten Bevölkerungsgruppen, in denen die Bereitschaft für prophylaktische Maßnahmen gering ist. Für die Motivation zur Vorsorge spielt sicherlich neben gesundheitlicher Aufklärung auch die Einfachheit der Methode eine wichtige Rolle. Das biologische Monitoring umfaßt z.T. gut handhabbare Methoden, die meist an arbeitsmedizinischen Fragestellungen etabliert worden sind und heute einen festen Platz in der Arbeits- und Umweltmedizin einnehmen. Veränderungen an genetischen Endpunkten können mit verhältnismäßig guter Spezifität und Sensitivität ein mutagenes/kanzerogenes Risiko anzeigen (Bender et al. 1989, Anderson et al. 1991, Tates et al. 1991). Der einfache Umgang mit Speichel führte zu der Frage, ob Speichelproben in das Bio- und Populationsmonitoring einbezogen werden können und aufgrund ihrer biologischen Wirkung in In-vitro-Testverfahren Rückschlüsse auf ein kanzerogenes Risiko der Probanden erlauben. Für analytische Fragen, z.B. Cotininnachweis oder DNA-Analyse wird Speichel als Probenmaterial sehr erfolgreich eingesetzt. Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß im Speichel der untersuchten Personen zytotoxische und/oder mutagene Wirkungen gefunden worden sind und diese biologischen Effekte den Einfluß

von Rauchen und Alkoholkonsum auf die Probanden widerspiegeln. Die zytotoxische und mutagene Wirkung des Speichels wiederum sind ein Anzeichen, daß die Mundschleimhaut verstärkt genotoxisch belastet wird und einem 'kanzerogenen Streß' ausgesetzt ist. Im Biomonitoring weisen Veränderungen an genetischen Endpunkten auf ein erhöhtes kanzerogenes Risiko hin, sie erlauben aber kaum Aussagen, ob und wann es tatsächlich zu einer Entartung kommen wird. Biologisches Monitoring wird daher vom Prinzip her die ärztliche Vorsorgeuntersuchung und die pathohistologische Einzeldiagnose bei Krebsverdacht nicht ersetzen können. Das Biomonitoring könnte aber für Präscreeningprogramme von Risikogruppen eine zunehmende Bedeutung gewinnen. Gerade in der Oropharynx tumorprophylaxe, die aufgrund der bekannten exogenen Risikofaktoren einerseits begrenzt und gezielt bezüglich des Personenkreis, andererseits in bezug auf die Methode relativ unproblematisch und kostengünstig durchführbar ist, könnte die zyto- und genotoxikologische Speicheluntersuchung als vorgeschaltete Routineprüfung auf erste Anzeichen einer kanzerogenen Exposition im Mund-Rachen-Raum gelten. Mikrotiterverfahren, heute mit Erfolg auch auf den Salmonella/Mikrosomen-Test übertragbar, erlauben die Messung großer Probenmengen bei einem hohen Automatisierungsgrad der Methode. Darüber hinaus sollten auch einfache zytogenetische In-vitro-Untersuchungen der Mundschleimhaut, wie sie der Mikrokern-Test bietet, auf ihre Eignung in der Früherkennung kanzerogener Anzeichen in der Mundhöhle in Erwägung gezogen werden.

6. Zusammenfassung

Oropharynx tumore hängen in ihrer Ätiologie in entscheidendem Maße von exogenen Einflüssen ab. Die Hauptrisikofaktoren sind Rauchen, Tabakkauen und Alkoholkonsum. Mit der vorliegenden Arbeit wurde das Ziel verfolgt, durch den Einsatz relevanter und etablierter (gen)toxikologischer Prüfverfahren einen methodischen Ansatz zur Erfassung und Bewertung von Risikofaktoren und Risikoindikatoren der Krebsentstehung im Mund-Rachen-Raum zu finden. Das biologische Monitoring umfaßt gut handhabbare Methoden, die durch die Veränderungen an genetischen Endpunkten ein mutagenes/kanzerogenes Risiko anzeigen. Die Möglichkeit des relativ einfachen Umganges mit Speichelproben führte zu der Frage, ob Speichel in das Bio- und Populationsmonitoring einbezogen werden kann und aufgrund seiner biologischen Wirkung in In-vitro-Testverfahren Rückschlüsse auf ein kanzerogenes Risiko der Probanden erlaubt. Da zyto- und genotoxische Wirkmechanismen

die Kanzerogenese entscheidend beeinflussen, wurden mit der 'plating efficiency' in der Säugerzellkultur und dem Salmonella/Mikrosomen-Test zwei gut validierte In-vitro-Testverfahren zum Nachweis eines zytotoxischen bzw. gentoxischen Potentials in Speichelproben eingesetzt. In die Untersuchung wurden 131 männliche Personen einbezogen. Das Alter der Probanden lag zwischen 11 und 88 Jahren; das Durchschnittsalter der Population betrug 44,3 Jahre. Bei der Auswahl der Probanden konnte eine ausgewogene Altersverteilung erreicht werden. 53 Probanden hatten nie geraucht, 42 Personen waren Nichtraucher, die das Rauchen aufgegeben hatten, 36 Studienteilnehmer waren Raucher. Die Mehrzahl der Raucher (29 von 36) gab einen Zigarettenverbrauch von bis zu 20 Stück pro Tag an; 7 Probanden rauchten mehr als eine Schachtel am Tag. 79 der Befragten tranken regelmäßig, 29 gelegentlich und 23 Probanden keinen Alkohol. Die meisten alkoholabstinenten Studienteilnehmer waren gleichzeitig Nichtraucher; unter den Rauchern verzichteten nur acht Prozent auf Alkohol.

In der Arbeit konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen zytotoxischer Wirkung des Speichels und dem Rauchverhalten der Probanden gezeigt werden. Ein vergleichbarer Zusammenhang lag auch zwischen Gentoxizität der Speichelproben und dem Raucherstatus der Probanden vor. Die Verbindung von Alkoholkonsum und biologischer Wirkung des Speichels war weniger ausgeprägt. Die Kombination Rauchen und Alkoholkonsum führte zu einer Zunahme an zytotoxischen und/oder gentoxischen Speichelproben, während in 90 % der Speichelproben von abstinenten Nichtrauchern die biologische Wirkung ausblieb. Im Speichel der untersuchten Personen konnten somit zytotoxische und/oder mutagene Wirkungen gefunden werden; diese biologischen Effekte widerspiegeln zum großen Teil den Raucherstatus und Alkoholkonsum der Probanden. Gegenüber Alkohol erwies sich das Rauchen als der stärkere Einflußfaktor. Treffen die Faktoren 'Rauchen' und 'Alkohol' zusammen, erhöht sich das Risiko für ein zyto- und/oder gentoxisches Potential im Speichel wesentlich.

Die Voraussetzungen für ein Screening und eine Früherkennung von Tumoren im Mund-Rachen-Raum sind relativ günstig, da die zu untersuchenden Regionen der Entnahme von Probenmaterial und einer lokalen Begutachtung leicht zugänglich sind. Für die Motivation zur Vorsorge spielt sicherlich neben gesundheitlicher Aufklärung auch die Einfachheit der Methode eine wichtige Rolle. Die zyto- und gentoxische Wirkung des Speichels ist ein Anzeichen, daß die Mundschleimhaut verstärkt belastet und einem 'kanzerogenen Streß' ausgesetzt ist. Im Biomonitoring weisen Veränderungen an genetischen Endpunkten auf ein erhöhtes kanzerogenes Risiko hin. Sie erlauben aber kaum Aussagen, ob und wann es tat-

sächlich zu einer Entartung kommen wird. Biologisches Monitoring wird daher vom Prinzip her die ärztliche Vorsorgeuntersuchung und die pathohistologische Einzeldiagnose bei Krebsverdacht nicht ersetzen können. Das Biomonitoring könnte aber für Präscreeningprogramme von Risikogruppen eine zunehmende Bedeutung gewinnen. Als eine Möglichkeit der frühzeitigen Erfassung eines Oropharynxtumorrisikos könnte die zyto- und gentoxikologische Speicheluntersuchung als vorgeschaltete Routineprüfung auf erste Anzeichen einer kanzerogenen Exposition im Mund-Rachen-Raum gelten.

7. Literatur

- Ames BN, Dursten WE, Yamasaki E, Lee FD: Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 70 (1975) 2281-2285
- Ames BN, Gold LS: Endogenous mutagens and the cause of aging and cancer. *Mutat Res* 250 (1991) 3-16
- Ames BN: Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221 (1983) 1256-1264
- Ammenheuser MM, Hastings DA, Whorton EB Jr, Ward JB Jr: Frequencies of hprt mutant lymphocytes in smokers, non-smokers, and former smokers. *Environ Mol Mutagen* 131 (1997) 131-138
- Anders A, Anders F, Zechel Ch, Gröger H, Schmidt D, Smith A, Schlatterer B: Genetische Mechanismen der Tumorgenese - Prüfung erb- und umweltabhängiger Krebsrisiken in *Xiphophorus*-Testsystemen. In: Schlatterer B (Hrsg): *Chemische Krebsrisikofaktoren der Umwelt*. Erich Schmidt, Berlin, 1991, S. 81-115
- Anders F: A biologist's view of human cancer. In: Neth R, Gallo RC, Greaves MF et al. (eds.): *Modern trends in human leukemia VIII*. Springer, Berlin, 1989, pp 23-45
- Anders MW (ed): *Bioactivation of foreign compounds*. Academic Press, Orlando, 1985
- Anderson D, Francis AJ, Godbert P, Jenkinson PC, Butterworth KR: Chromosome aberrations (CA), sister chromatid exchanges (SCE) and mitogen-induced blastogenesis in cultured peripheral lymphocytes from 48 control individuals sampled 8 times over 2 years. *Mutat Res* 250 (1991) 467-476
- Armitage P, Doll R: The age distribution of cancer and a multi-stage theory in carcinogenesis. *Br J Cancer* 8 (1954) 1-8
- Ashby J, Tennant RW: Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutat Res* 204 (1988) 17-115
- Ashby J, Tennant RW: Definitive relationships among chemicals, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested in rodents by the U.S. NTP. *Mutat Res* 257 (1991) 229-306.
- Bartsch H, Coparosa N, Coda M et al.: Carcinogen hemoglobin adducts, urinary mutagenicity, and metabolic phenotype in active and passive cigarette smokers. *J Natl Cancer Inst* 82 (1990) 1826-1831.
- Bauer KH: *Mutationstheorie der Geschwulstentstehung*. Springer, Berlin, 1928
- Bauer KH: *Das Krebsproblem*. Julius Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1949
- Bender MA, Preston RJ, Leonard RC, Pyatt BE, Gooch PC: Chromosomal aberration and sister chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. *Mutat Res* 212 (1989) 149-154
- Berenblum I: The mechanism of carcinogenesis: A study of the significance of carcinogenic actions and related phenomena. *Cancer Res* 1 (1941) 807-814
- Blot JW, Fraumeni JF: Geographic epidemiology of cancer in the United States. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF (eds): *Cancer Epidemiology and Prevention*. Saunders, Philadelphia, 1982, pp 179-193
- Blot WJ, Devesa SS, McLaughlin JK: Oral and pharyngeal cancer. *Cancer Surv* 19 (1994) 23-42
- Boveri T: *Zur Frage der Entstehung maligner Tumore*. Gustav Fischer, Jena, 1914
- Boyle P, Macfarlane GJ, Blot WJ, Ciesia F, Lefebvre JL, Azul AM, Devries N, Scully C: European School of Oncology advisory report to the European Commission for the Europe Against Cancer Programm - oral carcinogenesis in Europe. *J Cancer Oral Oncol* 31B (1995) 75-85
- Bradley MO Bhuyan B, Francis MC, Langenbach R, Peterson A, Huberman F: Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* 87 (1981) 81-142
- Brookman HE, DeMarini DM: Utility of short-term tests for genetic toxicity in the aftermath of the NTP's analysis of 73 chemicals. *Environ Mol Mutagen* 11 (1988) 421-435
- Bursch W, Lauer B, Timmermann-Trosiener I: Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* 5 (1984) 453-558

- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D: Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56 (1996) 2488-2492
- Carrano AV, Natarajan AT: Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204 (1988) 379-406
- Clemmesen J: Statistical studies in the aetiology of malignant neoplasms. *APMIS (Suppl 1)* 1174 (1965) 86-93
- Cohen SM, Ellwein LB: Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 249 (1990) 1007-1011
- Cohen SM, Ellwin LR: Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res* 51 (1991) 6493-6505
- Cooper CS, Grover PL (eds): *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I and II. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 94/I, 94/II*, Springer, Berlin, 1990
- Curvall M, Romert L, Norlen E, Enzell CR: Mutagen levels in urine from snuff users, cigarette smokers and non tobacco users - a comparison. *Mutat Res* 188 (1987) 105-110
- Doll R, Peto R, Hall E, Wheatley K, Gray R: Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years' observations on male British doctors. *BMJ* 309 (1994) 911-918
- Doolittle DJ, Rahn CA, Riccio E, Passananti GT, Howard G, Vesell ES, Burger GT, Hayes AW: Comparative studies of the mutagenicity of urine from smokers and non-smokers on a controlled non-mutagenic diet. *Food Chem Toxicol* 28 (1990) 639-646
- Doolittle DJ, Winegar R, Lee CK, Caldwell WS, Hayes AW, de Bethizy JD: The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat Res* 344 (1995) 95-102
- DÖSAK-Studie (Deutsch-Österreichisch-Schweizerische Arbeitskreis für Tumoren im Kopf-Hals-Bereich) *Ärzte Zeitung* 17 (1998) 13
- Foulds L: Multiple etiologic factors in neoplastic development. *Cancer Res* 25 (1965) 1339-1347
- Freedman DA, Navidi WC: On the multistage model for carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 81 (1989) 169-188
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W: *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington DC, 1995, 698 pp
- Friedwald WF, Rous P: The initiating and promoting elements in tumor production: An analysis of the effects of tar, benzpyrene, and methylcholanthrene on rabbit skin. *J Exp Med* 80 (1944) 101-126
- Gairola C: Genetic effects of fresh cigarette smoke in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 102 (1982) 123-136
- Gibel W, Berndt H, Schramm T, Lohs K: *Krebsverhütung und Umweltschutz*. Fischer, Jena, 1976
- Grafström RC, Norén UG, Zheng X, Elfving A, Sundqvist K: Growth and transformation of human oral epithelium in vitro. In: Müller-Hermelink, Neumann HG, Dekant (eds): *Recent Results in Cancer Research. Risk and Progression Factors in Carcinogenesis*. Springer, Berlin, 1996, 275-306
- Graham S, Mettlin, C, Marshall J. et al.: Dentition, diet, tobacco and alcohol in the epidemiology of oral cancer. *J Natl Cancer Inst* 59 (1977) 1611-1618
- Granella M, Priante E, Nardini B, Bono R, Clonfero E: Excretion of mutagens, nicotine and its metabolites in urine of cigarette smokers. *Mutagenesis* 11 (1996) 207-211
- Guengerich FP, Liebler DC: Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *CRC Crit Rev Toxicol* 14 (1985) 259
- Guettinger H: Combined interpretation of biological and chemical field data to evaluate ecotoxicity of chemical substances. *The Science of the Total Environment, Suppl* 1993, 1539-1545
- Haas JF, Rahu M, Staneczek W: Time trends in cancer in the German Democratic Republic. *Neoplasma* 33 (1986) 129-139
- Harris CC: Interindividual variation among humans in carcinogenic metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis* 10 (1989) 1563-1566

- Heddle JA: Prediction of chemical carcinogenicity from *in vitro* genotoxic activity. *Mutagenesis* 3 (1988) 287-291
- Hinton, D.E. and D.J. Larén: Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: J.F. Mc Carty and L.R. Shugart: Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publ., Boca Raton, 1990, pp 15-57
- Hopkin JM, Evans HJ: Cellular effects of smoke from „safer“ cigarettes. *Br J Cancer* 49 (1984) 333-336.
- Huxley J: Biological aspects of cancer. Allen & Unwin Ltd., London, 1958
- IARC. Monographs on the evaluation the carcinogenic risks to human. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs. Volumes 1-52, International Agency of Risk on Cancer, Lyon, 1981-1992
- IARC. Monographs on the evaluation the carcinogenic risks to human. Tobacco habits other than smoking, betel-quid and areca-nut chewing, and some related nitrosamines. Vol 37, International Agency of Risk on Cancer, Lyon, 1985
- IARC. Monographs on the evaluation the carcinogenic risks to human. Tobacco smoking. Vol 38, International Agency of Risk on Cancer, Lyon, 1986
- IARC. Monographs on the evaluation the carcinogenic risks to human. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs. Volume 1-42, Supplement 6, International Agency of Risk on Cancer, Lyon, 1987a
- IARC. Monographs on the evaluation the carcinogenic risks to human. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs. Volumes 1-42, Supplement 7, International Agency of Risk on Cancer, Lyon, 1987b
- IARC. Monographs on the evaluation the carcinogenic risks to human. Alcohol drinking. Vol 44, International Agency of Risk on Cancer, Lyon, 1988
- Jensen OM: Cancer morbidity and causes of death among Danish brewery workers. *J Natl Cancer Inst* 23 (1979) 454-463
- Jensen OM: Cancer risk among Danish male Seventh-Day Adventists and other temperance society members. *J Natl Cancer Inst* 70 (1983) 1011-1014
- Kaiser HE (ed): Neoplasms - Comparative pathology of growth in animals, plants, and man. Williams & Wilkins, Baltimore, London, 1981
- Knudson AG: Genetics in human cancer. *Annu Rev Genet* 20 (1986) 231-251
- Krieg K: Invertebraten in der Geschwulstforschung. Verlag Theodor Steinkopf, Dresden, 1973
- Kuenemann-Migeot C, Callais F, Momas I, Festy B: Urinary promutagens of smokers: comparison of concentration methods and relation to cigarette consumption. *Mutat Res* 368 (1996) 141-147
- Kuenemann-Migeot C, Callais F, Momas I, Festy B: Use of Salmonellatyphimurium TA 98, YG 1024 and Y 1021 and deconjugating enzymes for evaluating the mutagenicity from smokers' urine. *Mutat Res* 390 (1997) 293-291
- Lamy L: Etude de statistique clinique de 134 cas de cancer de l'oesophage et du cardia. *Arch Mal Appar Digest* 4 (1910) 451-475 (zit. nach Schottenfeld D, Fraumeni JF (eds): *Cancer Epidemiology and Prevention*. Oxford University Press, New York, Oxford, 1996)
- Lindahl T, Sedgwick B: Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu Rev Biochem* 57 (1988) 133-157
- Lindahl T: DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* 51 (1982) 61-87
- Lyon IL, Klauber MR, Gardner JW: Cancer incidence in Mormons and non-Mormons in Utah, 1966-1970. *New Engl J Med* 292 (1976) 129-133
- Maier H, Fischer G, Sennwald E, Heller WD: Berufliche Risikofaktoren für Rachenkrebs. Ergebnisse der Heidelberger Rachenkrebsstudie. *HNO* 42 (1994) 530-549
- Maier H, Tisch M, Enderle D, Dietz A, Weidauer H: Berufliche Exposition gegenüber Farben, Lacken und Lösungsmittel und Krebsrisiko im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes. *HNO* 45 (1997) 905-908
- Mak-Kregar et al.: *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252 (1995) 133-138
- Marks F: Chemical carcinogenesis. The multistage approach. *Interdisc Sc Rev* 14 (1989) 233 ff.

- Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113 (1983) 173-215
- Maugh, T: Chemicals: How many are there? *Science* 199 (1978) 162
- Miller EC, Miller JA: Mechanisms of chemical carcinogens. *Cancer* 47 (1981)1055-1064
- Mohtashamipur E, Norpoth K, Lieder F: Urinary excretion of mutagens in smoking of cigarettes with various tar and nicotine yields, black tobacco, and cigars. *Cancer Lett* 34 (1987) 103-112
- Moolgavkar SH: Carcinogenesis modeling: from molecular biology to epidemiology. *Annu Rev Public Health* 7 (1986) 151-169
- Moolgavkar SH: Model for human carcinogenesis: Action of environmental agents. *Environ Health Perspect* 50 (1983) 285-291
- Moolgavkar SH: The multistage theory of carcinogenesis and the age distribution of cancer in man. *J Natl Cancer Inst* 61 (1978) 49-52
- Moon TE, Micozzi ME (eds): *Nutrition and Cancer Prevention*. Marcel Dekker, New York, 1989
- Muir CS, Waterhouse J, Mack T: *Cancer incidence in five continents*. Vol. V. IARC Sci Publ No 88, International Agency of Risk on Cancer, Lyon, 1987
- Munzer R, Renner HW: Genotoxic investigations of tobacco protein using microbial and mammalian test systems. *Z Ernährungswiss* 28 (1989) 300-309
- Nishioka H, Nunoshiro T: Role of enzymes in antimutagenesis of human saliva and serum. *Basic Life Sci* 39 (1986) 143-151
- O'Connor HJ, Riley SE, Axon AT, Dixon MF, Girling A, Garner RC: The mutagenic activity of gastric juice. *Mutat Res* 206 (1988) 103-113
- Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J: *Cancer incidence in five continents*. Vol. VI. IARC Sci Publ No 120, International Agency of Risk on Cancer, Lyon, 1992
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J: Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 54 (1993) 595-606
- Passey RD: Experimental soot cancer. *Br Med J* 2 (1922) 1112-1113
- Perera FP, Santella RM, Brenner D et al.: DNA adducts, protein adducts and sister chromatid exchanges in cigarette smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 79 (1987) 449-456
- Peto R: Epidemiology, multistage models and short-term mutagenicity tests. In: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA (eds): *Origins of human cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1977, pp 1403
- Phillips DH, Schoket B, Hewer A et al.: Influence of cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells. *Int J Cancer* 46 (1990) 4695-4700
- Phillips RL, Garfinckel L, Kuzma JW et al.: Mortality among California Seventh-Day Adventists for selected cancer sites. *J Natl Cancer Inst* 65 (1980) 1097-1107
- Pitot HC: Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer* 80 (1989) 599-607
- Pitot HC: Stages in neoplastic development. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF (eds): *Cancer Epidemiology and Prevention*. 2nd ed, Oxford University Press, Oxford, New York, 1996, pp 65-79
- Pott P: Cancer scoti. In: *Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of the ruptures, and the mortification of the toes and feet*. Hawes, Clark and Collin, London, 1775, pp 63-68
- Rahn CA, Howard G, Riccio E, Doolittle DJ: Correlations between urinary nicotine or cotinine and urinary mutagenicity in smokers on controlled diets. *Environ Mol Mutagen* 17 (1991) 244-252
- Rehn L: *Arch klin Chir* 50 (1895) 588 (zit. nach Bauer KH: *Das Krebsproblem*. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1949)
- Riebe M, Westphal K: Studies on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by various tobacco alkaloids. *Mutat Res* 124 (1983) 281-286
- Rothman K, Keller A: The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *J Chron Dis* 25 (1972) 711-716

- Ruddon RW: Molecular and genetic events in neoplastic transformation. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF (eds): *Cancer Epidemiology and Prevention*. 2nd ed, Oxford University Press, Oxford, New York, 1996, pp 80-100
- Rudert H: Maligne Tumoren der Lippen, der Mundhöhle und des Oropharynx. In: Naumann HH, Helms J, Heberhold C, Kastenbauer E (Hrsg): *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis*. Thieme, Stuttgart, 1992, S. 648-667
- Rüdiger HW: Endogene und exogene Determinanten in der Bewertung kanzerogener Risiken. *Öff Gesundh Wes* 52 (1990) 1-4
- Sall RD, Shear MJ: Studies in carcinogenesis. XII Effect of the basis fraction of creosote oil on the production of tumors in mice by chemical carcinogens. *J Natl Cancer Inst* 1 (1940) 45-51
- Sargent L, Xu Y-H, Sattler GL: Ploidy and karyotype of hepatocytes isolated from enzyme altered foci in two different protocols of multistage hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis* 10 (1989) 387-391
- Sauls RL, Ames BN: Background levels of DNA damage in the population. In: Simic M, Grossmann L, Upton A (eds): *Mechanisms of DNA damage and repair*. Plenum Press, New York, 1986, pp 529-535
- Scherer G, Doolittle DJ, Ruppert T, Meger-Kossien I, Riedel K, Tricker AR, Adlkofer F: Urinary mutagenicity and thioethers in nonsmokers: role of the environmental tobacco smoke (ETS) and diet. *Mutat Res* 368 (1996) 195-204
- Schulte-Hermann R: Tumor promotion in the liver. *Arch Toxicol* 57 (1985) 147-158
- Shelby MD, Zeiger E, Tennant RW: Commentary on the status of short-term tests for chemical carcinogens. *Environ Mol Mutagen* 11 (1988) 437-441
- Simic M, Grossmann L, Upton A (eds): *Mechanisms of DNA damage and repair*. Plenum Press, New York, 1986
- Smith CJ, McKarns SC, Davis RA, Livingston SD, Bombick BR, Avalos JT, Morgan WT, Doolittle DJ: Human urine mutagenicity study comparing cigarettes which burn or primarily heat tobacco. *Mutat Res* 361 (1996) 1-9
- Spitz MR: Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 21 (1994) 281-288
- Spitz MR, Fueger JJ, Goepfert H et al.: Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. A case comparison analysis. *Cancer* 61 (1988) 203-208
- Statistisches Bundesamt: *Todesursachenstatistik 1993 und 1994*. Wiesbaden, 1995
- Stich HF, Stich W: Chromosome-damaging activity of saliva of betel nut and tobacco chewers. *Cancer Lett* 15 (1982) 193-202
- Stich HF, Rosin MP, Brunnemann KD: Oral lesions, genotoxicity and nitrosamines in betel quid chewers with no obvious increase in oral cancer risk. *Cancer Lett* 31 (1986) 15-25
- Tates AD, Grummt T, Törnquist M et al.: Biological and chemical monitoring of occupational exposure to ethylene oxide. *Mutat Res* 250 (1991) 483-497
- Tomatis L, Kaldor JM, Bartsch H: Experimental studies in the assessment of human risk. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF (eds): *Cancer Epidemiology and Prevention*. 2nd ed, Oxford University Press, Oxford, New York, 1996, pp 11-27
- Tomatis L: The predictive value of rodent carcinogenicity test in the evaluation of human risk. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 19 (1979) 511-530
- Trivedi AH, Dave BJ, Adhvaryu SC: Genotoxic effects of nicotine in combination with arecoline on CHO cells. *Cancer Lett* 74 (1993) 105-110
- Tsutsui H: Über das künstlich erzeugte Cancroid bei der Maus. *Gann* 12 (1918) 17-21
- Tuyns AJ, Riboli E, Doornbos G et al.: Diet and esophageal cancer in Calvados (France). *Nutr Cancer* 9 (1987) 81-92
- van Maanen JM, Welle IJ, Hageman G, Dallinga JW, Mertens PL, Kleinjans JC: Nitrate contamination of drinking water: relationship with HPRT variant frequency in lymphocyte DNA and urinary excretion of N-nitrosamines. *Environ Health Perspect* 104 (1996) 522-528
- Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK: Head and neck cancer. *New Engl J Med* 328 (1993) 184-194

- Volkman R: Beiträge zur Chirurgie 1875, S 370 (zit. nach Bauer KH: Das Krebsproblem. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1949)
- Weinberg RA: How cancer arises? *Scientific American* 275 (1996) 32-40
- Weiss E: Geschwülste. In: Frei A (Hrsg): *Allgemeine Pathologie*. Parey, Berlin, 1972, S. 295-347
- Whittemore AS: The age distribution of human cancer for carcinogenic exposure of varying intensity. *Am J Epidemiol* 106 (1977) 418-432
- Wiltse J, Dellarco VI: U.S. Environmental Protection Agency guidelines for carcinogen risk assessment. Past and future. *Mutat Res* 365 (1996) 3-15
- Wynder EL, Lemon FR, Bross IJ: Cancer and coronary artery disease among Seventh-Day Adventists. *Cancer* 12 (1959) 1016-1028
- Yamagiwa K, Ichikawa K: Experimentelle Studie über die Pathogenese der Epithelialgeschwülste. *Mitteilungen Med Fakultät Univ Tokio* 15(2) (1915 a) 295-344
- Yamagiwa K, Ichikawa K: Über die künstliche Erzeugung von Papillom. *Verh Jpn Path Ges* 5 (1915 b) 142-148
- Yim SH, Hee SS: Genotoxicity of nicotine and cotinine in the bacterial luminescence test. *Mutat Res* 335 (1995) 275-283.
- Ying TS, Enomoto K, Sarma DSR: Effects of delays in the cell cycle on the induction of preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver by 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 42 (1982) 876-880
- Young JL, Percy CL, Asire AJ: Surveillance, epidemiology and end results: incidence and mortality data 1973-77. *Natl Cancer Inst Monogr* 57 (1981) 54-55
- Zenkel ME, Rettinger G: Risikogruppen-Screening bei Oropharynx Tumoren. *Münch med Wschr* 139 (1997) 101-104

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Die Arbeit wurde in der Forschungsstelle Bad Elster des Umweltbundesamtes im Zeitraum von 1995 bis 1999 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Dr. T. Grummt, Bad Elster, und Herrn Dr. M. Bloching, Halle/Saale, angefertigt.

Die Dissertationsschrift wurde an keiner anderen Institution bzw. an keiner anderen Medizinischen Fakultät eingereicht.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. A. Berghaus danke ich für die Überlassung dieses Themas.

Den Mitarbeitern der Forschungsstelle Bad Elster, die Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit genommen haben, danke ich für die mir gewährten großzügigen Arbeitsbedingungen sowie für die wertvollen Anregungen und die fördernde Diskussion beim Fortgang dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. T. Grummt von der Forschungsstelle Bad Elster und Herrn Dr. M. Bloching von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die fortwährende Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen sowie für die hilfreichen Hinweise während der gesamten Arbeit. Ebenfalls herzlich danken möchte ich Frau Dr. Chr. Lautenschläger vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die wertvolle Beratung bei der statistischen Auswertung.

Nicht zuletzt danke ich der Arztpraxis Dr. Stephan, Klingenthal, für die kollegiale Unterstützung, die ich bei der Gewinnung der Speichelproben erfahren habe.

Lebenslauf

Name: Dirk-Ullrich Stephan

Wohnort: Maria-Ward-Str. 1 b
85051 Ingolstadt

Geburtsdatum: 30.12.1968

Geburtsort: Schleiz

Familienstand: ledig

Bildung:

1975-77	Oberschule Markneukirchen
1977-81	Oberschule Klingenthal
1981-85	Kinder- und Jugendsportschule Klingenthal
1985-87	Erweiterte Oberschule Klingenthal

Wehrdienst:

1987-90

Studium:

1990-95 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Berufspraxis:

1995-97	Vorbereitungsassistent in Hude
1997-98	Assistenz Zahnarzt in Langnau i.E. (Schweiz)
seit 1998	Assistenz Zahnarzt in Ingolstadt

Ingolstadt, den 01.09.1999

(Dirk-UlrichStephan)

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- und Ohrenkrankheiten
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)

Thesen der Dissertation

In-vitro-Untersuchungen von Speichelproben
auf zyto- und gentoxische Wirkung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dirk-Ullrich Stephan
geboren am 30.12.1968 in Schleiz

1. Sechs Prozent aller Krebserkrankungen sind Karzinome des Pharynx und der Mundhöhle. Sie nehmen seit Mitte der 60iger Jahre zu und liegen heute an 6. Stelle aller malignen Neubildungen. In Deutschland liegt die Inzidenzrate dieser Tumore für Männer bei 3,9 % (13 bis 14 % in Frankreich und Ungarn), für Frauen bei 0,9 %. Die Hauptrisikofaktoren der Mundhöhlenkarzinome sind exogener Natur: Rauchen, Alkoholkonsum und mangelnde Mundhygiene.
2. Zum Auffinden von Krebsursachen blieben lange Zeit nur epidemiologische Untersuchungen und Tierversuche. Da sie meist mit einem hohen Aufwand verbunden sind, werden seit Jahren zeit- und kostengünstige Alternativverfahren gesucht. Zum Screening auf potentielle kanzerogene und genotoxische Aktivitäten von Einzelsubstanzen, komplexen Umweltgemischen und Körperflüssigkeiten sind eine Reihe aussagekräftiger In-vitro-Methoden entwickelt worden. Zyto- und genotoxische Wirkmechanismen spielen in der Kanzerogenese eine wichtige Rolle. Deshalb werden in der Arbeit mit der 'plating efficiency' in der Säugerzellkultur und dem Salmonella/Mikrosomen-Test zwei gut validierte Kurzzeittests eingesetzt, um Risikoindikatoren und -faktoren für Tumore des Mund-Rachen-Raumes im menschlichen Speichel zu erfassen.
3. Für Speichelproben als Untersuchungsmatrix im Biomonitoring sprechen vor allem zwei Gründe: Erstens stellt die orale Aufnahme einen wichtigen Belastungspfad bei Schadstoffexposition dar; zweitens ist Speichel maßgeblich an der Stoffaufnahme und -umwandlung, am Stofftransport und an der Verweildauer aktiver Metabolite im Mund-Rachen-Raum beteiligt. Speichel ist zudem eine leicht zugängliche Untersuchungsmatrix, um Stoffgehalt und -einflüsse in der Mundhöhle zu analysieren. Eine nichtinvasive Probengewinnung ist im biologischen Monitoring zu bevorzugen.
4. Speichelproben von 131 männlichen Personen werden auf zyto- und genotoxische Wirkung untersucht. Das Alter der Probanden liegt zwischen 11 und 88 Jahren und beträgt durchschnittlich 44,3 Jahre; es besteht eine ausgewogene Altersverteilung. 95 Probanden sind Nichtraucher, davon haben 53 nie geraucht, 42 Personen haben das Rauchen bereits vor Jahren aufgegeben. 36 Probanden sind Raucher; von ihnen rauchen 7 mehr als 20 Zigaretten am Tag; 29 Raucher geben bis zu 20 Stück pro Tag an. Von den Befragten trinken 79 regelmäßig, 29 gelegentlich und 23 keinen Alkohol. Die Mehrzahl der alkoholabstinenten Studienteilnehmer sind auch Nichtraucher, während lediglich 8 % der Raucher auf Alkohol verzichteten.

5. Die zytotoxische Wirkung des Speichels hängt vom Rauchverhalten der Probanden ab; in Speichelproben der Raucher ist im Vergleich zu den Nichtrauchern die Zytotoxizität signifikant erhöht. Ein vergleichbarer Zusammenhang besteht auch zwischen Gentoxizität der Speichelproben und dem Raucherstatus der Probanden. Die Verbindung von Alkoholkonsum und biologischer Wirkung des Speichels war weniger ausgeprägt. Die Kombination Rauchen und Alkoholkonsum führt in den Speichelproben zu einer weiteren Zunahme der Zyto- und Gentoxizität. Rauchen erweist sich gegenüber dem Alkohol als der stärkere Einflußfaktor. Treffen die Faktoren 'Rauchen' und 'Alkohol' zusammen, erhöht sich das Risiko des Probanden für ein zyto- und/oder gentoxisches Potential im Speichel wesentlich.
6. Veränderungen an genetischen Endpunkten bedeuten ein erhöhtes kanzerogenes Risiko. Die zyto- und gentoxische Wirkung des Speichels weisen auf eine kanzerogene Belastung an der Mundschleimhaut, wesentlich verursacht durch Rauchen und Alkoholgenuß.
7. Auch andere Studien zeigen für Tumore im Kopf-Hals-Bereich, daß Rauchen, Alkohol und zusätzlich mangelnde Mundhygiene zu einem starken Risikoanstieg führen.
8. Das biologische Monitoring kann keine Aussagen liefern, ob und wann es zu einer Krebsentartung kommt wird. Biologisches Monitoring kann daher die ärztliche Vorsorgeuntersuchung und die pathohistologische Einzeldiagnose bei Krebsverdacht nicht ersetzen; es sollte aber für Vorsorgeprogramme bei bekannten Risikogruppen eine zunehmende Bedeutung gewinnen.
9. Die Voraussetzungen für Screening und Früherkennung von Tumoren im Mund-Rachen-Raum sind günstig, da die betroffenen Regionen für die Probengewinnung und lokale Begutachtung leicht zugänglich sind. Zur frühzeitigen Erfassung eines Oropharynx-tumorrisikos könnte die zyto- und gentoxikologische Speicheluntersuchung als vorgeschaltete Routineprüfung auf erste Anzeichen einer kanzerogenen Exposition im Mund-Rachen-Raum herangezogen werden.