

Enzympolymorphismus der N-Acetyltransferase 2 und der Glutathion-S-Transferase M1 bei Dickdarmkarzinompatienten aus der Industrieregion Dortmund

von

Hermann C. Römer, Wobbeke Weistenhöfer, Ricarda Thier,
Uwe Zorn*, Dietrich Löhlein* und Klaus Golka

*Chirurgische Klinik des Klinikums Dortmund, Beurhausstraße 40, 44137 Dortmund

Zusammenfassung

Im Großraum Dortmund ist eine erhöhte Sterblichkeitsrate bei Dickdarmkarzinom beschrieben. Daher wurden in Dortmund 108 Dickdarmkarzinompatienten und 180 tumorfreie chirurgische Patienten hinsichtlich verschiedener Risikofaktoren für Dickdarntumoren untersucht. Der Anteil der „langsamen“ Acetylierer der N-Acetyltransferase 2 lag bei den Fällen bei 65 %, bei den Kontrollen bei 61 %. In den bislang publizierten Studien wurde hingegen zu meist ein Überwiegen des „schnellen“ Acetyliererstatus als Risikofaktor bei Patienten mit Dickdarmkarzinom beschrieben. Es fand sich in dieser Studie keine Überrepräsentation von Montanberufen bzw. von Expositionen gegen montanindustrietytische Arbeitsstoffe. In der Fallgruppe wurden ein vermehrter Laxantienabusus sowie vermehrt eine berufliche Tätigkeit im Sitzen beobachtet. Die unauffällige Verteilung der Montanberufe und ein höherer Anteil von „langsamen“ Acetylierern in der Gruppe der an Dickdarmkarzinom erkrankten Frauen sprechen gegen arbeitsbedingte und eher für umweltbedingte Einflüsse im untersuchten Kollektiv.

Einleitung

Darmkrebs (im Sinne von Dickdarm- und Mastdarntumoren) ist die zweithäufigste Krebstodesursache in der Bundesrepublik Deutschland bei beiden Geschlechtern. Der Anteil an der Gesamtkrebsmortalität beträgt in der Bundesrepublik Deutschland bei Männern ca. 13 % und bei Frauen ca. 15 %.

Die geschätzten Zahlen für die jährlich neu in der Bundesrepublik Deutschland an diesem Tumor Erkrankenden betragen für das Jahr 1998 für Dickdarmkrebs (synonym: Kolonkarzinom) bei Männern ca. 15.000 und bei Frauen ca. 19.000 (Robert-Koch Institut 2002).

Darmkrebs gehört zu den Tumoren, bei denen die Sterblichkeit nach dem 2. Weltkrieg zunächst stark angestiegen ist. Seit Mitte der 70er Jahre war im Gebiet der Bundesrepublik über viele Jahre zunächst keine weitere Zunahme zu verzeichnen. Allerdings ist in den letzten Jahren erneut ein Anstieg zu registrieren.

An der Auslösung von Darmkrebs sind Risikofaktoren aus verschiedenen Bereichen beteiligt, wie z. B. Ernährungsgewohnheiten, genetische, umwelt- sowie möglicherweise hormonelle Faktoren, berufliche und nicht-berufliche Expositionen gegen krebs-erzeugende Stoffe sowie Nikotin- und Alkoholkonsum (AICR 1997).

Als mögliche Karzinogene im Bereich des Dickdarms werden aromatische Amine, heterozyklische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe diskutiert. Die beiden zuletzt genannten Stoffgruppen finden sich auch in einer Reihe von Nahrungsmitteln, wie z. B. gegrilltem Fleisch. Die polymorphen fremdstoffmetabolisierenden Enzyme N-Acetyltransferase 2 (NAT2; Substrat: u. a. aromatische und heterozyklische Amine) und Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1; Substrat: u. a. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) sind an der

Verstoffwechslung dieser Stoffe beteiligt. Für Lungenkarzinome (u. a. Hou et al. 2000) und Tumoren der Harnblase (Übersicht: Golka et al. 2002) sind sowohl der langsame Acetyliererstatus der NAT2 als auch der negative Genotyp der GSTM1 (u. a. Bell et al. 1993; Seidegård et al. 1986) als prädisponierende Faktoren beschrieben. Eine Überrepräsentation des GSTM1-negativen Genotyps bei Patienten mit Darmtumoren wird bislang lediglich von Strange et al. (1991) beschrieben.

Die Inzidenz für Dickdarmkarzinome zeigt regionale Unterschiede. So ist für Dortmund und Umgebung als einem ehemaligen Standort der Kohle-, Eisen- und Stahlindustrie eine, im Vergleich zu Nordrhein-Westfalen, sowohl für Männer als auch für Frauen erhöhte Sterblichkeit an Dickdarmtumoren beschrieben (Pesch et al. 1994). Daher wurde an einem Patientenkollektiv mit Dickdarmkarzinom der Chirurgischen Klinik des Klinikums Dortmund untersucht, ob sich Auffälligkeiten hinsichtlich des Anteils der Genotypen der beiden polymorphen fremdstoffmetabolisierenden Enzyme NAT2 und GSTM1 bei diesem Patientengut zeigen.

Untersuchtes Kollektiv und angewandte Methoden

Es wurden bislang 108 Dickdarmkarzinompatienten und 180 tumorfreie Patienten (Kontrollen) der Chirurgischen Klinik des Klinikums Dortmund untersucht.

Der Genotyp der N-Acetyltransferase 2 wurde bei den Dickdarmkarzinompatienten und der Kontrollgruppe anhand der Leukozyten-DNA mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und Polymerasekettenreaktion (PCR) nach der von Cascorbi et al. (1996) publizierten Standardmethode bestimmt.

Der Genotyp der Glutathion-S-Transferase M1 wurde mittels PCR nach der von Bell et al. (1993) vorgegebenen Standardmethode bestimmt.

Die Isolierung der DNA erfolgte aus 10 ml EDTA-Blut mittels Proteinase K-Verdau und einer dreistufigen Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook et al. 2001) oder dem Aussalzen mit Kochsalz (Miller et al. 1988).

Zusätzlich wurden alle jemals länger als 6 Monate ausgeübten Berufe, mögliche Expositionen gegen krebserzeugende Substanzen am Arbeitsplatz sowie berufliche und außerberufliche Risikofaktoren für ein Dickdarmkarzinom mittels eines Fragebogens erhoben.

Ergebnisse

Die Genotypisierung der 108 Patienten mit Dickdarmkarzinom und der 180 stationär behandelten Patienten ohne einen Tumor in der Anamnese ergab hinsichtlich des Anteils der verschiedenen Genotypen der beiden untersuchten polymorphen fremdstoffmetabolisierenden Enzyme NAT2 und GSTM1 keinen relevanten Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen (**Tab. 1**).

Tab. 1: Anteil der langsamen Acetylierer der NAT2 und des GSTM1-negativen Genotyps in der Gruppe der Dickdarmkarzinompatienten und in der Kontrollgruppe

	NAT2 „langsam“	GSTM1 negativ
Dickdarmkarzinompatienten	65 %	53 %
Kontrollgruppe	61 %	47 %
Europ. Bevölkerung	50-65 %	50 %

Bei Aufschlüsselung der Daten nach dem Geschlecht zeigte sich, dass bei den Frauen in der Fallgruppe der Anteil der langsamen Acetylierer höher war als bei den Männern (**Tab. 2**).

Tab. 2: Anteil der langsamen Acetylierer der NAT2 und des GSTM1-negativen Genotyps bei Männern und Frauen in der Gruppe der Dickdarmkarzinompatienten und in der Kontrollgruppe

	NAT2 „langsam“	GSTM1 negativ
Dickdarmkarzinompatienten		
Männer	62 %	56 %
Frauen	71 %	49 %
Kontrollgruppe		
Männer	63 %	49 %
Frauen	57 %	46 %

Weiterhin wurde der Anteil der verschiedenen Genotypen der beiden polymorphen Enzyme NAT2 und GSTM1 bei Teilkollektiven untersucht, die angegeben hatten, „Raucher“¹ zu sein oder die eine „positive Alkoholanamnese“² angegeben hatten.

Es zeigten sich bei Rauchern keine Auffälligkeiten bei den Anteilen der langsamen Acetylierer der NAT2 zwischen Fällen und Kontrollen (**Tab. 3**). Hinsichtlich des GSTM1-Status zeigte sich eine Überrepräsentation des GSTM1-negativen Genotyps bei den Dickdarmkarzinompatienten (**Tab. 3**).

Tab. 3: Anteil der langsamen Acetylierer der NAT2 und des GSTM1-negativen Genotyps im Teilkollektiv der Raucher in der Gruppe der Dickdarmkarzinompatienten und in der Kontrollgruppe

Raucher	NAT2 „langsam“	GSTM1 negativ
Dickdarmkarzinompatienten	61 %	57 %
Kontrollgruppe	59 %	47 %

¹ Die Patienten hatten angegeben, dass sie durchschnittlich mehr als 1 Schachtel täglich über mindestens 10 Jahre geraucht hatten.

² Die Patienten hatten angegeben, dass sie täglich Alkohol trinken.

Bei Patienten mit „positiver Alkoholanamnese“ war der Anteil der genotypisch langsamen Acetylierer der NAT2 bei den Fällen zwar höher als bei den Kontrollen, jedoch lag der Anteil bei beiden Teilkollektiven im Bereich des in Mitteleuropa zu erwartenden Anteils der langsamen Acetylierer der NAT2 in der Allgemeinbevölkerung (**Tab. 4**). Der Anteil der GSTM1-negativen Patienten war in beiden Teilkollektiven vergleichbar (**Tab. 4**).

Tab. 4: Anteil der langsamen Acetylierer der NAT2 und des GSTM1-negativen Genotyps im Teilkollektiv mit positiver Alkoholanamnese in der Gruppe der Dickdarmkarzinompatienten und in der Kontrollgruppe

Positive Alkoholanamnese	NAT2 „langsam“	GSTM1 negativ
Dickdarmkarzinompatienten	64 %	56 %
Kontrollgruppe	54 %	53 %

Die für das Dickdarmkarzinom als Risikofaktoren angesehenen Items „Laxantienabusus“ und „sitzende Tätigkeit“ sowie das als Risikofaktor zumindest diskutierte „Rauchen“ wurden hinsichtlich eines Unterschiedes zwischen Fällen und Kontrollen untersucht. Dabei zeigte sich für „Laxantienabusus“ und „sitzende Tätigkeit“, nicht aber für „Rauchen“ eine Überrepräsentation in der Fallgruppe (**Tab. 5**).

Tab. 5: Laxantienabusus, sitzende Tätigkeit und Rauchen in der Gruppe der Dickdarmkarzinompatienten und in der Kontrollgruppe

	Laxantienabusus	sitzende Tätigkeit	Raucher
Dickdarmkarzinompatienten	28 %	35 %	58 %
Kontrollgruppe	18 %	29 %	64 %

Hinsichtlich der Ernährungsgewohnheiten zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Genusses von Obst, Gemüse oder Fleisch (**Tab. 6**). Es zeigte sich aber eine

leichte Überrepräsentation für „Alkoholgenuss“ in der Fallgruppe (**Tab. 6**).

Tab. 6: Anteil der Patienten mit Obst-, Gemüse-, Fleisch- oder Alkoholgenuss in der Gruppe der Dickdarmkarzinompatienten und in der Kontrollgruppe

	Obst	Gemüse	Fleisch	Alkohol
Dickdarmkarzinompatienten	65 %	65 %	9 %	55 %
Kontrollgruppe	66 %	64 %	12 %	43 %

Der Anteil der Montanberufe betrug 34 % bei den Fällen und 32 % bei den Kontrollen. Der Anteil montanindustrietyperischer Expositionen wie z. B. Exposition gegen Metallstaub (25 % vs. 26 %), Steinkohlenstaub (12 % vs. 12 %) oder Schweißrauch (14 % vs. 18 %) ist bei Fällen und Kontrollen vergleichbar.

Diskussion

Der Anteil der „langsamen“ Acetylierer in dieser Studie (Fälle 65 %, Kontrollen 61 %) unterscheidet sich von den Ergebnissen der meisten bislang durchgeführten Studien, in denen im Allgemeinen ein Überwiegen des „schnellen“ Acetyliererstatus der NAT2 bei Patienten mit Karzinomen des Darmtraktes im Vergleich zur Kontrollgruppe beschrieben wurde (u. a. Lang et al. 1986; Ilett et al. 1987). Roberts-Thomson et al. (1996) beschreiben einen Zusammenhang zwischen dem „schnellen“ Acetyliererstatus bei Patienten mit Darmkrebs und einem hohen Konsum von „rotem“ Fleisch. Ein derartiger Zusammenhang wurde in dieser Studie nicht beobachtet.

Der Anteil der langsamen Acetylierer der NAT2 im untersuchten Tumorkollektiv liegt etwas höher als in der Kontrollgruppe, entspricht jedoch noch dem in der Normalbevölkerung mitteleuropäischen Ursprungs („Kaukasier“) zu erwartenden Anteil von langsamen Acetylierern. Eine berufliche Ursache für das in der Studie nicht beobachtete Überwiegen des schnellen Ace-

tyliererstatus bei Dickdarmtumorkollektiv erscheint weniger wahrscheinlich, da sich keine Überrepräsentation von Montanberufen bzw. von Expositionen gegen montanindustrietyperische Arbeitsstoffe bei den untersuchten Tumorkollektiv fand. In die gleiche Richtung deutet, dass in der Fallgruppe der Anteil der langsamen Acetylierer bei Frauen höher ist als bei den Männern.

Schlussfolgerung

Die im Vergleich zur Kontrollgruppe unauffällige Verteilung der für die Montanindustrie typischen Berufe und Expositionen sowie der in der Gruppe der an Dickdarmkarzinom erkrankten Frauen höhere Anteil von langsamen Acetylierern sprechen gegen arbeitsplatzbedingte und eher für umweltbedingte Einflüsse im untersuchten Kollektiv.

Literatur

AICR (1997). Cancer, nutrition and food. Colon, rectum. In: American Institute for Cancer Research and World Cancer Research Fund (eds.): Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective (pp 216-251). Washington, DC: AICR.

Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW (1993). Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increased susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 1159-1164.

Cascorbi I, Brockmüller J, Mrozikiewicz PM, Bauer S, Loddenkemper R, Roots I (1996). Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res* 56: 3961-3966.

Golka K, Prior V, Blaszkewicz M, Bolt HM (2002). The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. *Toxicol Lett* 128: 229-241.

Hou SM, Ryberg D, Falt S, Deverill A, Tefre T, Borresen AL, Hangen A, Lambert B (2000). GSTM1 and NAT2 polymorphisms in operable and non-operable lung cancer patients. *Carcinogenesis* 21: 49-54.

Ilett K, David BM, Detchon P, Castleden WM, Kwa R (1987). Acetylator phenotype in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 47: 1466-1469.

Lang NP, Chu DZJ, Hunter CF, Kendall DC, Flammang T, Kadlubar FF (1986). Role of aromatic amine acetyltransferase in human colon cancer. *Arch Surg* 121: 1259-1261.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16: 1215-1216.

Pesch B, Halekoh U, Ranft U, Richter M, Pott F (1994). Atlas zur Krebssterblichkeit in Nordrhein-Westfalen. Düsseldorf: Ministerium für Arbeit, Gesundheit und Soziales des Landes Nordrhein-Westfalen.

Robert-Koch Institut (2002). Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends. 3., erw. aktual. Ausg. Saarbrücken. [<http://www.rki.de>].

Roberts-Thomson IC, Ryan P, Khoo KK, Hart WJ, McMichael AJ, Butler RN (1996). Diet, acetylator phenotype, and risk of colorectal neoplasia. *Lancet* 347: 1372-1374.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Seidegård J, Pero RW, Miller DG, Beattie EJ (1986). A glutathione transferase in human leucocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 7: 751-753.

Strange RC, Matharoo B, Faulder GC, Jones P, Cotton W, Elder JB, Deakin M (1991). The human glutathione S-transferase: a case-control study of the incidence of the GST1 0 phenotype in patients with adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 12: 25-28.

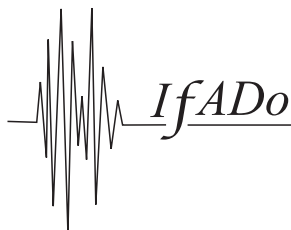
Arbeitsphysiologie *heute*

Bd. 4 (2002)

Themenband „Toxikologie“

Herausgegeben von

H.M. Bolt
B. Griefahn
H. Heuer



Dortmund

ISBN 3-9808342-0-4

Alle Rechte vorbehalten.

© 2002 *IfADo*

Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund
Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund
Tel.: 0231/1084-0
Fax: 0231/1084-308
<http://www.ifado.de>

Druck: Koffler-Druck, Dortmund

Printed in Germany

Vorwort

Der Jahresband 2002 von *Arbeitsphysiologie heute* soll einen aktuellen Einblick über Forschungsarbeiten der toxikologischen Projektbereiche des *IfADo* mit ihren Bezügen zu Grundlagen und Anwendungen dokumentieren.

In Bezug auf die Forschungsplanung des *IfADo* wurde mehrfach darauf verwiesen, dass ein Paradigmenwechsel in der Zielrichtung der angewandten Toxikologie zu beobachten ist. Während bislang die Erkennung und Prophylaxe manifester Berufserkrankungen durch chemische Stoffe im Zentrum des Interesses standen, gehen sich abzeichnende Entwicklungen in die sehr viel generellere Richtung einer für Menschen umweltverträglichen Chemie. So entfalten sich unter dem Stichwort '*Green Chemistry*' in den USA an Universitäten, Forschungsinstituten und Industrieunternehmen neue Aktivitäten, die die Entwicklung verträglicher Chemikalien, aber auch die Entwicklung neuer verträglicher chemischer Prozesse zum Inhalt haben. In diesen Kontext einzuordnen ist auch die Gesamtproblematik der so genannten „Ersatzstoffe“. '*Green Chemistry*' wird dabei als wichtiger Beitrag zur zukünftigen Sicherung eines Innovationsvorsprunges der deutschen und europäischen chemischen Industrie angesehen.

Die europäische Kommission hat in diesem Zusammenhang im Februar 2001 ein Weißbuch „Strategie für eine zukünftige Chemiewirtschaft“ vorgelegt, welches derzeit in weiten Bereichen von Wissenschaft, Behörden und Industrie sowie im sozialpolitischen Raum diskutiert wird.

Das Weißbuch der EU enthält unter anderem dezidierte Aussagen zum längerfristigen Forschungsbedarf, der insbesondere in Richtung der Entwicklung neuer toxikologischer Methoden und Verfahren zur Risikobeurteilung zielt. Besonders wird dabei auch auf die Notwendigkeit der Beurteilung von potenziell schädlichen Wirkungen von Chemikalien auf das Hormonsystem von Mensch und Tier abgehoben. Forschungen über Chemikalien mit endokriner Wirkung sollten auch die Wirkung niedriger Dosen langfristiger Expositionen und Exposition gegenüber Chemikaliengemischen sowie die Auswirkungen der hormonellen Veränderungen auf die Krebsentstehung beinhalten.

Auf den damit angesprochenen Feldern hat das *IfADo* in den letzten Jahren seine Grundkompetenzen erheblich verstärkt. Eine Neuorientierung der toxikologischen Forschung am *IfADo* trägt daher den Erfordernissen auf europäischer Ebene mit Vorrang Rechnung; der Diskurs über ihre mittel- und langfristige Entwicklung wurde auf einer öffentlichen Vortragsveranstaltung anlässlich der Jahressitzung des Kuratoriums des *IfADo* am 26.03.2001 eröffnet und im Oktober 2001 mit dem wissenschaftlichen Beirat fortgesetzt. In einem abschließenden moderierten Workshop am 07.11.2001 wurden die bislang erarbeiteten Einzelelemente zu einem Gesamtkonzept zusammengefügt. Dieses ist in der nachfolgenden **Abb. 1** dargestellt.

Das toxikologische Aufgabenfeld umfasst die Bewertung des Expositionsumfeldes des Menschen, der Wirkungsseite und des sich für den Menschen ergebenden Risikos auf einem Felde, das biochemische, morphologische, physiologische und Verhaltensveränderungen in einer ganzheitlichen Weise einschließt.

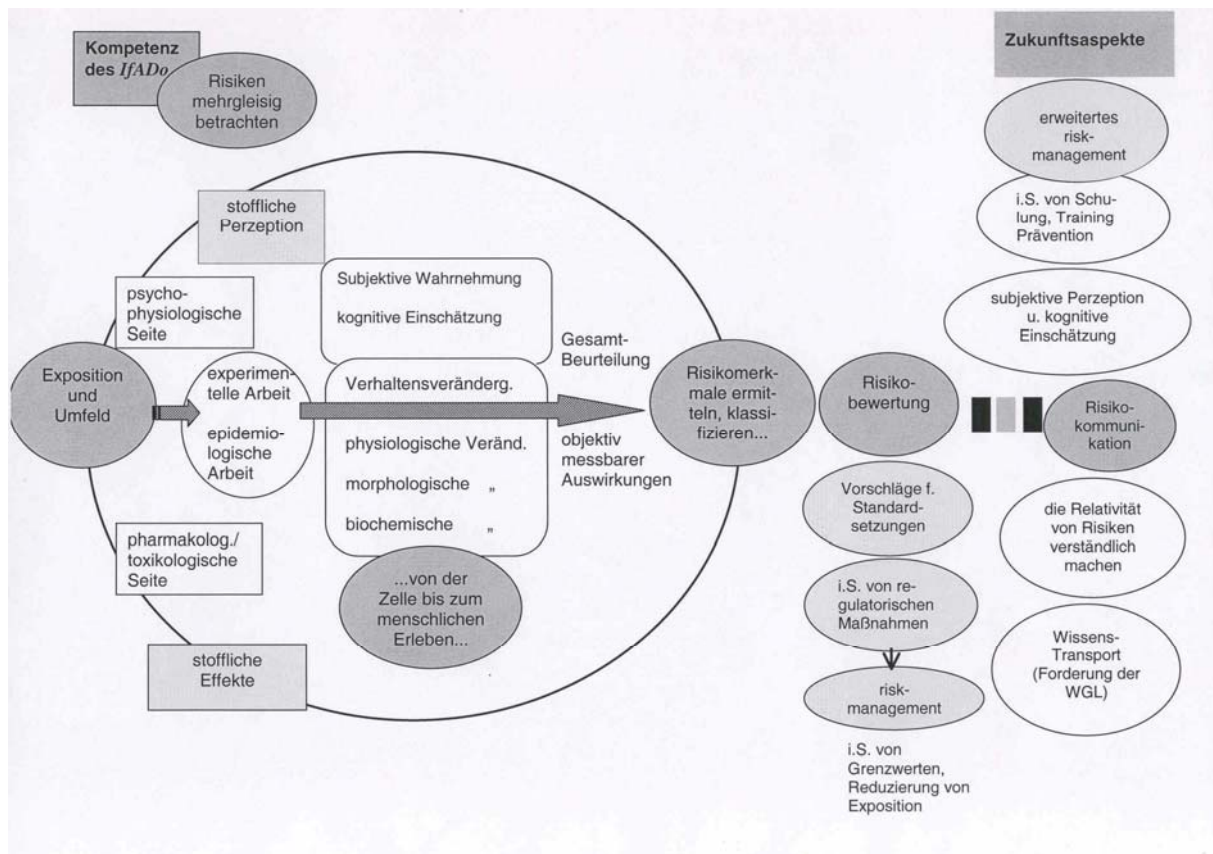


Abb. 1: Gesamtkonzept toxikologischer Forschung am *IfADo* (schematisch)

Die Ansätze zur Risikobewertung gehen in behördliche Umsetzungen des Risikomanagements - wie Vorschläge für Standardsitzungen und von Grenzwerten – ein. Die Mitarbeit von Wissenschaftlern des *IfADo* in Kommissionen auf nationaler und supranationaler Ebene, in deren Aufgabenbereich die Bewertung toxikologischer Stoffeigenschaften im Hinblick auf regulatorische Belange fällt, stellt daher einen sehr wesentlichen und direkten Umsetzungsweg für toxikologische Arbeitsergebnisse des Instituts dar.

Unter diesem Aspekt sind Wissenschaftler des *IfADo* in folgenden Gremien tätig (Stand: 01.04.2002):

- *Scientific Committee on Occupational Exposure Limits* bei der Generaldirektion V der EU in Luxemburg (1 Mitglied),
- *Interministerielle Kommission zur Neuordnung der Verfahren und Strukturen der Risikobewertung und Standardsetzung im gesundheitlichen Umweltschutz der Bundesrepublik Deutschland*, die im Jahre 2001 vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit sowie vom Bundesgesundheitsministerium gemeinsam eingesetzt wurde (1 Mitglied),
- *Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe* (3 Mitglieder) mit den Arbeitsgruppen „Aufstellung von MAK-Werten“, „Grenzwerte in biologischem Material“, „Analytische Chemie“ und mit unterschiedlich wechselnden ad-hoc-Arbeitsgruppen,

- *Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS)* beim Bundesminister für Arbeit und Sozialordnung (1 Mitglied) mit dem zuarbeitenden „*Beraterkreis Toxikologie*“ (2 Mitglieder).

Schon in der Vergangenheit hat die Mitarbeit von Wissenschaftlern des *IfADo* in Gremien, die der Regulation zuarbeiten, die Forschungstätigkeit des Instituts stark beeinflusst und beflügelt. Die Auswahl der Beiträge des nun vorgelegten Jahresbandes 2002 von ***Arbeitsphysiologie heute*** soll zeigen, dass hiermit auch in Zukunft neue Akzente gesetzt werden.

Dortmund, im April 2002

Die Institutsleitung des *IfADo*