

Kombinationswirkungen von PAK

Zellbiologische Untersuchungen als Instrument zur Beurteilung von Kombinationswirkungen



Sabine Plöttner, Heiko U. Käfferlein, Peter Welge, Thomas Brüning

Die regulatorische Toxikologie evaluiert und bewertet die Risiken von in der Regel einzelnen Gefahrstoffen für den Menschen und schlägt Maßnahmen zur Expositionsminde rung vor. Dementsprechend beziehen sich nahezu alle Arbeitsplatzgrenzwerte auf Einzelsubstanzen. Die Realität am Arbeitsplatz ist jedoch deutlich komplexer. Häufig liegen Mischexpositionen vor, deren Wirkung in der Gesamtheit der Exposition nur sehr schwer beurteilt werden kann. Es können dabei Effekt-Verstärkung aber auch – seltener – Effekt-Verminderung beobachtet werden. Dies betrifft auch Expositionen gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), komplexen Gemischen aus kanzerogenen und nicht-kanzerogenen Verbindungen. Für die standardisierte und qualitätsgesicherte Bewertung von Mischexpositionen gibt es nur wenige praktische Lösungsansätze, unter anderem Untersuchungen an Zellkulturen. Die Ergebnisse erlauben einen ersten Einblick in die komplexen Dosis-Wirkungsbeziehungen von Mischexpositionen. Am Beispiel der PAK wird aufgezeigt, welchen Beitrag Zellkultursysteme hier konkret leisten können.

Berufliche Exposition gegen PAK

Im Beruf kommen viele Beschäftigte mit Gefahrstoffen in Kontakt, die über die Atemwege oder die Haut in den Körper aufgenommen werden können. Dabei sind die Beschäftigten häufig gegen Substanzgemische und nicht nur gegen Einzelsubstanzen exponiert. Ein Beispiel hierfür ist die berufliche Exposition gegen PAK, die unter anderem ein bekannter Risikofaktor für die Lungenkrebsentstehung ist. Lungenkrebs nach beruflich bedingter PAK-Exposition kann als Berufskrankheit unter den Nummern 4110, 4113 oder 4114 anerkannt werden. Arbeitsplätze, an denen hohe PAK-Expositionen vorkommen können, sind zum Beispiel Kokereien, Teerverarbeitungsbetriebe, Aluminiumproduktion, Eisen- und Stahlgießereien oder Untertagebergbau (DFG 2008, AGS 2010). Da PAK durch unvollständige Verbrennung aus organischem Material entstehen, treten sie in der Realität niemals als einzelne Verbindungen, sondern ausnahmslos in komplexen Gemischen auf. Insgesamt umfasst die Substanzgruppe der PAK mehrere hundert Einzelverbindungen mit unterschiedlicher kanzerogener Wirkstärke. Eine Auswahl an Strukturformeln häufig am Arbeitsplatz vorkommender PAK ist in

Abbildung 1 exemplarisch dargestellt. Für die Abschätzung des kanzerogenen Potenzials von PAK-Gemischen wird dabei zumeist das kanzerogene Benzo[a]pyren (B[a]P) als Leitsubstanz verwendet. Allerdings können PAK-Gemische – je nach Arbeitsplatz – unterschiedliche Vertreter dieser Substanzgruppe enthalten und damit im Vergleich zu B[a]P allein deutlich unterschiedliche kanzerogene Wirkstärken aufweisen.

Metabolische Aktivierung von Benzo[a]pyren (B[a]P)

Einzelne PAK sind insbesondere im Hinblick auf ihre genotoxischen und kanzerogenen Wirkungen gut untersucht (DFG 2008). So weiß man, dass PAK in ihrer Ausgangsform reaktionsträge sind und zunächst den Menschen kaum schädigen würden. Erst nach ihrer Aufnahme in den Körper des Menschen werden sie zu hochreaktiven Zwischenprodukten (u.a. Diol-epoxiden) verstoffwechselt, die an die DNA des Menschen binden und in Folge die Krebsentstehung einleiten können. Diese so genannte metabolische Aktivierung von PAK verläuft über mehrere Zwischenschritte, an denen verschiedene Enzyme beteiligt sind.

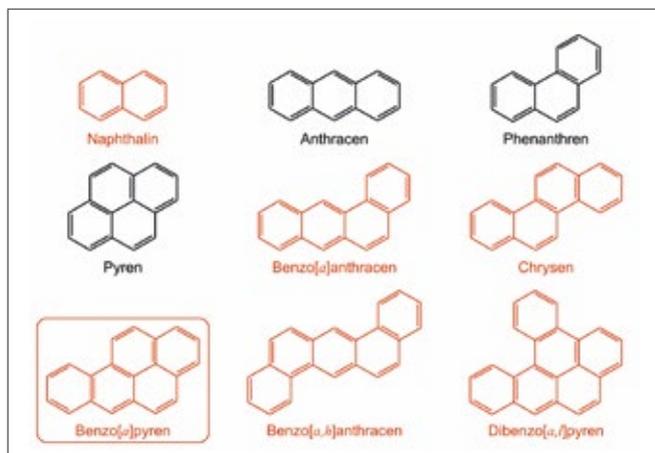


Abb. 1: Strukturformeln einiger ausgewählter PAK. Kanzerogene PAK sind rot, nicht-kanzerogene schwarz dargestellt. Benzo[a]pyren (eingerahmt) gilt häufig als Leitsubstanz für die Abschätzung des kanzerogenen Potenzials von PAK-Gemischen.

B[a]P, der vermutlich am besten untersuchte Vertreter aller PAK, wird unter anderem durch die Enzyme Cytochrom P450 1A1 und 1B1 (CYP1A1 und CYP1B1) sowie Epoxidhydrolasen metabolisch aktiviert (Abb. 2). Insgesamt ist der B[a]P-Metabolismus sehr komplex und es können zahlreiche verschiedene Metaboliten entstehen (Miller & Ramos 2001). Einer der wichtigsten Metaboliten ist jedoch das B[a]P-7,8-Diol-9,10-Epoxid (BPDE), das hochreaktiv ist, mit der Erbsubstanz DNA reagiert und somit genotoxisch wirkt. Wenn solche Reaktionsprodukte (DNA-Addukte) nicht repariert werden, können Mutationen zum Beispiel in Tumorsuppressorgenen wie p53 entstehen. Derartige Vorgänge sind wichtige Initialschritte bei der Entstehung von Lungenkrebs.

Ein weiterer gut untersuchter Aspekt in diesem Kontext ist, dass B[a]P selbst in der Lage ist, seine metabolische Aktivierung zu fördern, indem es über bestimmte molekulare Mechanismen bewirkt, dass verstärkt unter anderem CYP1A1 und CYP1B1 gebildet werden. Man spricht dabei von einer Enzyminduktion, welche wiederum zu einer verstärkten Bildung von BPDE und damit der kanzerogenen Wirkung führen kann. B[a]P verstärkt seine Wirkung also selbst.

Basierend auf dem vorgenannten Wissensstand und der bekannten lungenkanzerogenen Wirkung von PAK werden am IPA entsprechende Untersuchungen zu Kombinationswirkungen von PAK in einem Lungenzellmodell durchgeführt. Zu Beginn des Projektes wurde zunächst ein geeignetes Zellkultursystem als Untersuchungsmodell identifiziert, an dem die Fragestellung zur Beeinflussung der genotoxischen Wirkung von B[a]P durch andere PAK untersucht werden kann.

Auswahl eines geeigneten *In-vitro*-Modells

Als *In-vitro*-Modell erwiesen sich A549-Zellen als besonders geeignet. Hierbei handelt es sich um eine humane Lungenkarzinomzelllinie, die Eigenschaften von Alveolarepithelzellen (Typ II-Zellen) aufweist. Eigene Untersuchungen zur Enzymausstattung bestäti-

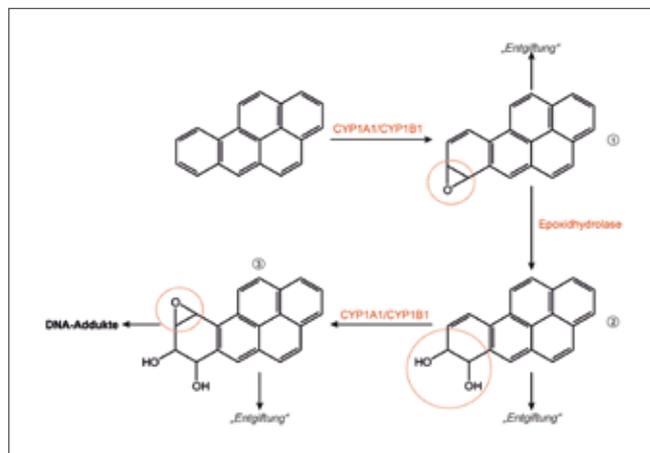


Abb. 2: Vereinfachtes Schema der metabolischen Aktivierung des Benzo[a]pyrens über die Zwischenprodukte B[a]P-7,8-Epoxid (1) und B[a]P-7,8-Diol (2) zum hochreaktiven B[a]P-7,8-Diol-9,10-Epoxid (3), dem ultimalen kanzerogenen Metaboliten, der unter anderem DNA-Addukte bilden kann.

gen gemeinsam mit Daten aus der Literatur, dass die Zellen über die erforderliche Enzymausstattung, insbesondere die relevanten Cytochrom P450 Enzyme und Epoxidhydrolasen, verfügen, um PAK metabolisch aktivieren zu können (Castell et al. 2005; Plöttner et al. 2012). Im Rahmen der Voruntersuchungen am IPA konnte gezeigt werden, dass A549-Zellen nach Exposition gegenüber B[a]P spezifische DNA-Addukte bilden. Die DNA-Adduktbildung war konzentrationsabhängig, das heißt mit steigenden B[a]P-Konzentrationen wurde auch eine Zunahme der DNA-Adduktraten beobachtet. Zudem wurde mittels Western Blot, einem Proteinnachweisverfahren, bestätigt, dass das an der metabolischen Aktivierung des B[a]P beteiligte Enzym CYP1B1 in A549-Zellen nach Behandlung mit B[a]P konzentrationsabhängig induziert wird. Das verwendete Zellmodell ist also in der Lage, bei B[a]P-Exposition seine eigene metabolische Aktivierung zu initiieren und spezifische DNA-Addukte zu bilden. Ein Zellkulturmodell mit A549-Zellen eignet sich also zur Untersuchung von Kombinationswirkungen von PAK in Lungenzellen.

Pilotstudie mit binären PAK-Gemischen

Im Rahmen einer Pilotstudie zur *In-vitro*-Untersuchung von Kombinationswirkungen von PAK-Gemischen wurden das kanzerogene B[a]P und das nicht-kanzerogene Pyren, zwei typische PAK-Vertreter am Arbeitsplatz, verwendet (Plöttner et al. 2013). In den Untersuchungen wurden A549-Zellen gegen binäre Gemische aus einer konstanten B[a]P-Konzentration aber unterschiedlichen Pyren-Konzentrationen beziehungsweise gegen Pyren alleine exponiert. Um die mögliche Beeinflussung genotoxischer Wirkungen des B[a]P durch Pyren zu untersuchen, wurden als Endpunkte sowohl die Bildung von BPDE-DNA-Addukten als auch die relativen Aktivitäten der am PAK-Metabolismus beteiligten Enzyme CYP1A1 und CYP1B1 analysiert.

Nach Behandlung der A549-Zellen mit Pyren alleine waren aufgrund des Fehlens von B[a]P erwartungsgemäß keine BPDE-DNA-Addukte nachweisbar, da es sich bei diesen um spezifische Adduk-

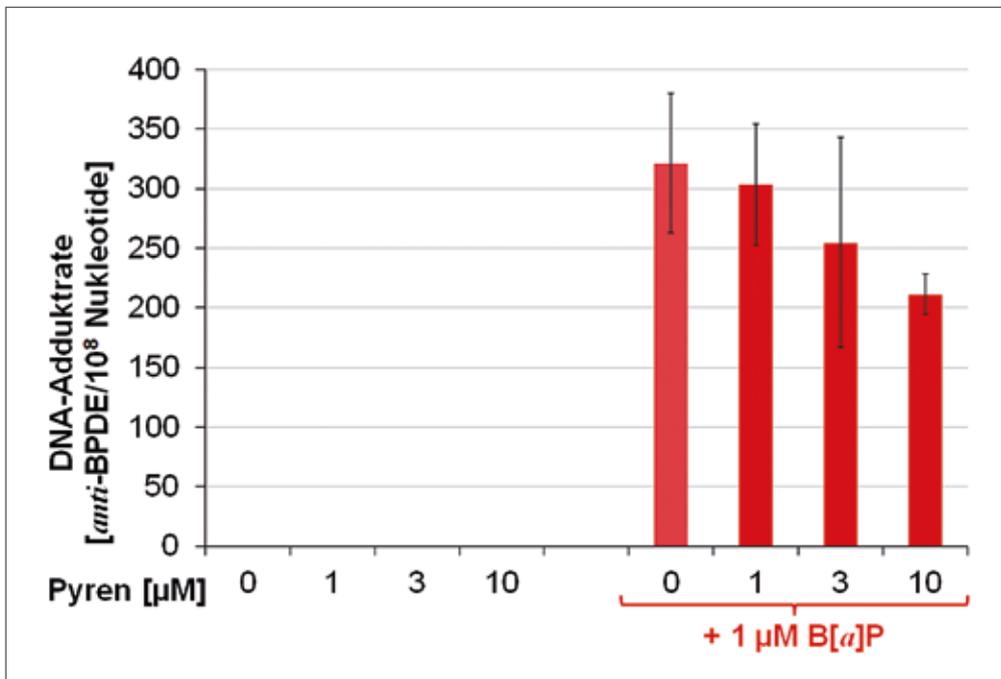


Abb. 3: Spezifische anti-BPDE-DNA-Adduktrate in A549-Zellen wurden mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmt. Nach Inkubation mit Pyren alleine wurden erwartungsgemäß keine spezifischen anti-BPDE-DNA-Addukte gefunden (links im Diagramm). Nach 24-stündiger Inkubation mit 1 µM B[a]P und verschiedenen Pyren-Konzentrationen wurde eine Abnahme der Adduktrate im Vergleich zu 1 µM B[a]P alleine beobachtet (rechts im Diagramm).

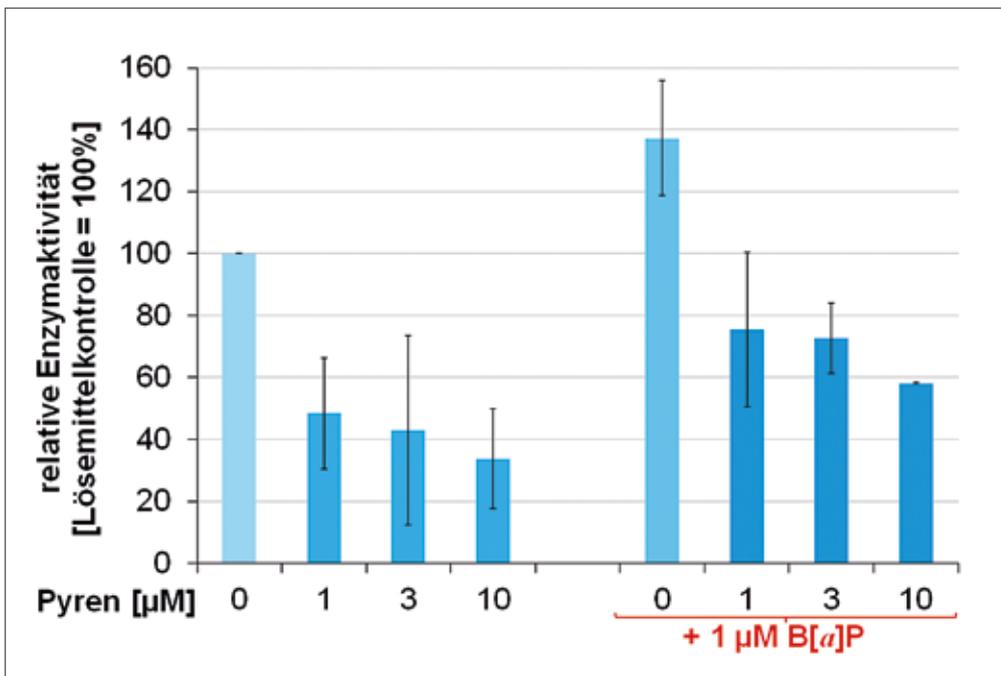


Abb. 4: Relative CYP1A1/CYP1B1-Enzymaktivitäten in A549-Zellen wurden mit Hilfe eines Lumineszenz-basierten Tests gemessen. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit verschiedenen Pyren-Konzentrationen nahm die Enzymaktivität im Vergleich mit Kontrollzellen ab (links im Diagramm). Nach 24-stündiger Inkubation mit 1 µM B[a]P nahm die Enzymaktivität im Vergleich mit Kontrollzellen (0 µM Pyren) zu. Bei einer Co-Inkubation der Zellen mit 1 µM B[a]P (konstant) und verschiedenen Pyren-Konzentrationen war die Enzymaktivität reduziert (rechts im Diagramm).

te des Benzo[a]pyrens handelt (Abb. 3). Im Enzymaktivitätstest konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung der Zellen mit Pyren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer Reduktion der Enzymaktivität führte (Abb. 4). Nach Co-Exposition der Zellen mit einer konstanten B[a]P-Konzentration aber unterschiedlichen Pyren-Konzentrationen nahmen die BPDE-DNA-Adduktrate im Vergleich zu B[a]P alleine stetig ab (Abb. 3). Die beobachtete Reduktion der BPDE-DNA-Addukte durch Pyren im binären Gemisch (B[a]P konstant + Pyren) war dabei mit entsprechenden Veränderungen der relativen CYP1A1/CYP1B1-Enzymaktivitäten assoziiert (Abb. 4).

Die Ergebnisse mit zwei typischen PAK-Vertretern am Arbeitsplatz zeigen bereits, dass die genotoxische Wirkung von B[a]P durch Pyren reduziert wird und dass dies mit den entsprechenden Veränderungen der Enzymaktivitäten einhergeht. Aktuell laufen weitere Untersuchungen, in denen noch geringere Konzentrationen der beiden PAK verwendet werden. Zukünftig sollen die Untersuchungen weiter ausgedehnt werden, unter anderem auf weitere Endpunkte und andere Gemische mit zunehmender Komplexität, um die wissenschaftlichen Erkenntnisse über Kombinationswirkungen von Gefahrstoffen zu erweitern.

Fazit und Ausblick

Mit Hilfe von *In-vitro*-Zellsystemen können gezielt Wirkungen und Prozesse untersucht werden, die für die Krebsentstehung relevant sind. Auch wenn die hier verwendete Lungenzelllinie A549 ein stark vereinfachtes Untersuchungs-

modell ist, kann mit ihrer Hilfe gezielt untersucht werden, wie Gemische bekannter Zusammensetzung im Vergleich zu Einzelstoffen auf zellulärer Ebene wirken. Bei Einwirkung von mehreren Stoffen muss es dabei – wie hier für eine Kombination aus zwei PAK gezeigt – nicht notwendigerweise zu einer Verstärkung der Einzelstoff-Wirkung kommen. Das Ausmaß der Effekte hängt vielmehr von der Art und Konzentration der jeweils beteiligten Partner im Gemisch ab.

Die Anzahl der Stoffe, die mit zellbiologischen Verfahren untersucht werden kann, ist theoretisch unendlich. Allerdings muss man sich bewusst machen, dass insbesondere bei der Substanzklasse der PAK, die aus mehreren hundert Einzelverbindungen besteht, nur eine endliche Auswahl an Substanzen und Substanzkombinationen untersucht werden kann. Insofern ist es sowohl unter Forschungsaspekten wie auch aus Gründen der praktischen Relevanz sinnvoll, sich zunächst auf die Untersuchung von Kombinationswirkungen ausgewählter arbeitsplatzrelevanter Vertreter von Gefahrstoffen zu fokussieren.

Die Kombinationswirkungen zwischen B[a]P und Pyren sind für die Unfallversicherungsträger damit wohl nur ein Beispiel unter vielen, welches zeigt, dass mit standardisierten und qualitätskontrollierten wissenschaftlichen Daten aus zellbiologischen Untersuchungen ein Beitrag zur Gefährdungs- und Risikobeurteilung und damit zur Ableitung von Präventionsmaßnahmen am Arbeitsplatz geleistet werden kann.

Die Autoren
 Prof. Dr. Thomas Brüning,
 Dr. Heiko U. Käfferlein,
 Dr. Sabine Plöttner, Peter Welge
 IPA

Beitrag als PDF



Literatur

1. AGS (2010) ERB (Exposition-Risiko-Beziehung)-Begründung zu Benzo[a]pyren in BekGS 910. www.ipa-dguv.de/Links Linkcode: 122
2. Castell JV et al. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pharmacol* 2005; 57 Suppl 1: 189-204
3. DFG: Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH). Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten. 45. Lieferung. 2008; Wiley-VCH, Weinheim
4. Merkblatt zu BK Nr. 4110 Bösartige Neubildungen der Atemwege durch Kokereirohgase. *BArbl* 1990; 2: 135
5. Merkblatt zu BK Nr. 4113 Lungenkrebs durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe bei Nachweis der Einwirkung einer kumulativen Dosis von 100 Benzo[a]pyren-Jahren [(Mikrogramm/m³) x Jahre]. *BArbl* 2010; 5/6: 105
6. Merkblatt zu BK Nr. 4114 Lungenkrebs durch das Zusammenwirken von Asbestfaserstaub und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen bei Nachweis der Einwirkung einer kumulativen Dosis, die einer Verursachungswahrscheinlichkeit von mindestens 50 Prozent nach der Anlage 2 entspricht. *BArbl* 2010; 5/6: 107
7. Miller KP, Ramos KS: Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab Rev* 2001; 33: 1-35
8. Plöttner S et al.: Cytochrome P450 1A1/1B1-activities and anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide DNA-adducts in A549 lung carcinoma cells after B[a]P-incubation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2012; 385 Suppl 1: 69.
9. Plöttner S et al.: Beeinflussung von CYP1A1/1B1-Enzymaktivitäten und der Bildung von anti-BPDE-DNA-Addukten in A549-Lungenkarzinomzellen durch Exposition gegenüber binären PAK-Gemischen. Abstraktband der 53. Wissenschaftlichen Jahrestagung der DGAUM, Jahrestagung der ÖGA und Frühjahrstagung der SGARM 2013; Gentner Verlag: 34