

Nutzen von Zellkulturen für die Bewertung von Gefahrstoffen

Wirkmechanismen von Substanzen und Gemischen gezielt erforschen



Sabine Plöttner, Peter Welge

Um Beschäftigte effektiv vor möglichen Gefährdungen durch Chemikalienexposition zu schützen, müssen Art und Ausmaß von Risiken durch Gefahrstoffe am Arbeitsplatz abgeschätzt werden. Wichtige Informationsquellen sind epidemiologische Studien, aber auch tierexperimentelle Ergebnisse. Oft bleiben dabei Fragen offen, z. B. nach dem Wirkmechanismus der Substanz. Zellkulturexperimente, wie sie auch am IPA durchgeführt werden, in denen Zellen unter definierten und kontrollierten Bedingungen mit Gefahrstoffen behandelt werden, können hier wichtige Informationen liefern.

In-vitro-Experimente werden an Zellkulturen durchgeführt, die meist tierischen oder – idealerweise – humanen Ursprungs sind, um möglichst gut auf den Menschen übertragbare Ergebnisse zu erzielen. Dabei unterscheidet man zwischen permanenten und primären Zellkulturen. Permanente, „unsterbliche“ Zelllinien entstammen häufig Tumorgewebe. Die Zellen können sich quasi unendlich vermehren und stehen so in großer Menge zur Verfügung. Im Gegensatz dazu werden primäre Zellen frisch aus einem intakten Gewebe, z. B. aus Lunge oder Leber, isoliert. Sie sind deshalb nur in begrenztem Umfang verfügbar und können zudem nur für eine beschränkte Zeit kultiviert werden, ohne sich wesentlich zu verändern. Die Zellen ähneln in ihren Eigenschaften, z. B. in ihrer Stoffwechselkapazität, noch eine Zeitlang denen im Organismus. Dies ist wichtig, da bei zahlreichen Gefahrstoffen erst ihre im Körper gebildeten Stoffwechselprodukte toxisch wirken. Viele permanente Zelllinien sind hingegen nur noch in geringem Maße oder gar nicht mehr in der Lage, solch eine Metabolisierung durchzuführen. Da beide Zellkultursysteme sowohl Vor- als auch Nachteile besitzen, gilt es für die jeweilige Fragestellung abzuwägen, welches Modell am besten geeignet ist.

Erforschung komplexer Veränderungen

Um die komplexen biochemischen Veränderungen in einer Zelle zu erforschen, die Folge einer Gefahrstoffexposition sein können, wurden in der Abteilung Zellbiologie des Kompetenz-Zentrums Toxikologie im IPA verschiedene Untersuchungsmethoden etabliert. Hierzu gehören z. B. die Messung der stoffabhängigen Veränderung der Aktivitäten von für den Fremdstoffmetabolismus relevanten Enzymen oder aber der Beeinflussung des Zellzyklus und der Induktion von Apoptose, des sog. programmierten Zelltodes. Besonders

interessant sind die Abhängigkeit dieser Parameter von der eingesetzten Gefahrstoffkonzentration und der Expositionsdauer sowie die Veränderung im zeitlichen Verlauf. Für die Untersuchungen werden dabei Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, Immunoblotting, durchflusszytometrische Analysen, photometrische und luminometrische Messungen eingesetzt. In enger Zusammenarbeit mit der Abteilung Gentoxykologie wird zusätzlich untersucht, ob und gegebenenfalls unter welchen Bedingungen die Gefahrstoffexposition auch gentoxische Effekte zur Folge hat. Hier spielen insbesondere die Bestimmung von DNA-Addukten (d. h. kovalente Bindung von Schadstoffen oder ihren Metaboliten an die DNA), der Nachweis von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden mittels Comet Assay oder die Detektion zytogenetischer Schäden mit Hilfe des Mikrokerntests eine Rolle.

Effekte von Gefahrstoffgemischen erkennen

Am Arbeitsplatz, aber auch durch die Umwelt und durch Lebensstil-Einflüsse sind Beschäftigte häufig gegenüber Gemischen aus verschiedenen Substanzen exponiert. Die meisten toxikologischen Erkenntnisse liegen jedoch zur Wirkung von Einzelsubstanzen vor. Da die Effekte von Gemischen auch größer (synergistisch) oder kleiner (antagonistisch) sein können als aufgrund der Einzelstoffeffekte erwartet, sind bessere Kenntnisse über die Wirkung von Gemischen für die Risikoabschätzung wichtig.

Im IPA werden unter anderem menschliche A549-Lungenkarzinomzellen verwendet, um Effekte von Einzelsubstanzen oder Gemischen auf die Lunge zu untersuchen. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, weil sie aus Typ-II-Epithelzellen der Lunge entstammt und es bereits publizierte Daten zu ihrer Stoffwechselkapazität gibt (Castell et al. 2005).

Im Mittelpunkt der aktuellen Forschung stehen zurzeit polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), die stets in Gemischen variabler Zusammensetzung vorkommen und für die das krebserzeugende Benzo[a]pyren (B[a]P), dessen Wirkmechanismus gut untersucht ist, als Leitsubstanz gilt. In einer Pilotstudie wurde vom IPA gezeigt, dass die Inkubation mit B[a]P auch in A549-Zellen zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Zunahme von *anti*-Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid-DNA-Addukten führt. Diese kovalent an die DNA gebundenen Stoffwechselprodukte des B[a]P können Mutationen auslösen. In Übereinstimmung damit wurde in diesen Zellen auch eine Veränderung der Stoffwechselaktivität von Enzymen, die bei der Bioaktivierung des B[a]P zu den letztlich krebserzeugenden Stoffwechselprodukten eine Rolle spielen, nach B[a]P-Behandlung beobachtet. Diese Daten sprechen für eine Eignung des verwendeten Zellkulturmodells und dienen als Basis, um das Zusammenwirken von B[a]P mit anderen PAK, wie es der Situation am Arbeitsplatz entspricht, zu untersuchen. Die Ergebnisse können zur Klärung potenzieller synkanzergenereffekte beitragen.

SHE-Assay zur Vorhersage des kanzerogenen Potenzials

Mit einem etwas anderen Fokus – der Vorhersage des kanzerogenen Potenzials von Gefahrstoffen mit Hilfe eines einzelnen-Testverfahrens – wird der sogenannte SHE-Assay durchgeführt. In diesem Test werden primäre Hamsterembryonalzellen (SHE-Zellen) mit den jeweiligen Gefahrstoffen behandelt. Nach einer Woche wird die morphologische Veränderung (Transformation) von in Kolonien gewachsenen SHE-Zellen als Endpunkt erfasst. Dazu werden diese am Ende eines Versuches fixiert, gefärbt und hinsichtlich ihrer Morphologie („normal“ oder „transformiert“) beurteilt. Von einem positiven Ergebnis spricht man, wenn die Substanz bewirkt, dass im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen vermehrt transformierte Zellkolonien zu finden sind.

Der SHE-Assay wird als eine vielversprechende Alternativmethode angesehen, um das kanzerogene Potenzial von Gefahrstoffen vorherzusagen, da eine hohe Übereinstimmung zwischen den Endpunkten der Krebsentstehung *in vivo*, also Ergebnissen aus Kanzerogenitätsstudien mit Nagetieren, und der morphologischen Transformation *in vitro* beschrieben ist. Das gilt insbesondere für die Stoffgruppe der aromatischen Amine, für welche die Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Kanzerogenitätsstudien besonders hoch ist. Dagegen konnte eine mögliche krebserzeugende Wirkung von Vertretern dieser Stoffgruppe mit Genotoxizitäts- (u. a. Comet Assay, Mikrokerntest) oder Mutagenitätstests (Ames-Test) bislang nicht zufriedenstellend vorhergesagt werden (Combes et al 1999; Kerckaert et al.1998).

Mit Unterstützung der BG Rohstoffe und chemische Industrie (BG RCI) und in Kooperation mit der BASF SE wurde der SHE-Assay am IPA mit dem Ziel etabliert, die für die Unfallversicherungsträger bedeutende Stoffgruppe der aromatischen Amine besser hinsichtlich einer möglichen kanzerogenen Wirkung zu untersuchen. Nachdem der Test mit fünf aromatischen Aminen validiert wurde, von denen

drei als krebserzeugend und zwei als nicht krebserzeugend für den Menschen eingestuft sind, werden aktuell acht weitere aromatische Amine untersucht. Unter diesen sind auch einige Stoffe, die als krebbsverdächtig eingestuft sind, für die aber aufgrund der gegenwärtigen Datenlage noch keine endgültige Aussage hinsichtlich ihres kanzerogenen Potenzials möglich ist. Die Ergebnisse aus dem SHE-Assay können möglicherweise dazu beitragen, diese Datenlage zu verbessern.

Der Mensch ist mehr als die Summe seiner Zellen

Der Mensch ist weitaus mehr als die Summe seiner Zellen. Für die Wirkung von Gefahrstoffen am „Wirkort“ Zelle spielen viele Faktoren eine Rolle, die nicht in Zellkulturen überprüft werden können, beispielsweise die Bioverfügbarkeit eines Gefahrstoffes oder seiner Metaboliten im Zielorgan oder in der Zielzelle. Dennoch sind Zellkulturexperimente ein wichtiges Instrument, um die Wirkmechanismen von Gefahrstoffen an standardisierbaren, im Vergleich zum Gesamtorganismus einfachen Systemen unter definierten Bedingungen zu untersuchen und zu verstehen. Wenn man sich aktuelle MAK-Begründungen oder Ableitungen von Expositions-Risiko-Beziehungen durch den Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS) anschaut, stellt man fest, dass die Betrachtung von Wirkmechanismen – z. T. gestützt durch Zusatzinformationen – ein zentrales Element in der Risikoabschätzung ist, die Folgen für die Einstufung von Gefahrstoffen und die Festlegung von Grenzwerten hat.

Beitrag als PDF



Die Autoren:

Dr. Sabine Plöttner, Peter Welge
IPA

Literatur

1. Castell J V, Donato M T, Gomez-Lechon M J. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The *in vitro* cellular approach. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 57 Suppl. 1: 189-204
2. Combes, R, Balls M, Curren R, Fischbach M, Fusenig N, Kirkland D, Lasne C, Landolph J, LeBoeuf R, Marquardt H, McCormick J, Müller L, Rivedal E, Sabbioni E, Tanaka N, Vasseur P, Yamasaki H. Cell Transformation Assays as Predictors of Human Carcinogenicity. The Report and recommendations of ECVAM Workshop 39. *ATLA* 1999; 27: 745-767
3. Kerckaert G A, LeBoeuf RA, Isfort R J. Assessing the predictiveness of the Syrian hamster embryo cell transformation assay for determining the rodent carcinogenic potential of single ring aromatic/nitroaromatic amine compounds. *Toxicol. Sci.* 1998; 41: 189-197