

Zusammenwirken von PAK und aromatischen Aminen

Untersuchungen zur Beeinflussung von toxischen Wirkungen in Zellkulturen



Sabine Plöttner, Heiko U. Käfferlein, Thomas Brüning

Mischexpositionen gegenüber Gefahrstoffen können an vielen Arbeitsplätzen vorkommen und Gefährdungsanalysen erschweren. Von besonderer Bedeutung ist die Frage nach dem Zusammenwirken von aromatischen Aminen und polzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) bei der Krebsentstehung, da Mischexpositionen gegenüber diesen Substanzklassen sowohl am Arbeitsplatz (z.B. in Kokereien) als auch in der Umwelt (u.a. Bestandteile des Tabakrauchs) vorkommen können. Bislang ist nur wenig darüber bekannt, ob und wie sich die Substanzen spezifisch im Zielorgan Harnblase bei einer Ko-Exposition gegenseitig in ihren Wirkungen beeinflussen, beispielweise verstärken können. Im IPA wird daher spezifisch der Frage nach dem Zusammenwirken aromatischer Amine und PAK mit Hilfe eines Zellkulturmodells der Harnblase und unter standardisierten Bedingungen nachgegangen.

Der Zusammenhang zwischen der Entstehung von Harnblasenkrebs und Expositionen gegenüber bestimmten aromatischen Aminen (Arylaminen) ist seit Langem bekannt. Erste Beobachtungen in diesem Kontext wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts veröffentlicht. Zahlreiche aromatische Amine sind gemäß der GHS-Verordnung (EG) 1272/2008 in die Gefahrenkategorien 1A (krebserzeugend für den Menschen) und 1B (krebserzeugend im Tierversuch) für karzinogene Stoffe eingestuft oder gelten als krebserzeugend (Kategorie 2). „Schleimhautveränderungen, Krebs oder andere Neubildungen der Harnwege durch aromatische Amine“ können in Deutschland als Berufskrankheit Nr. 1301 anerkannt werden. Die aromatischen Amine 2-Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl, 4-Chlor-o-toluidin, Benzidin und o-Toluidin gelten dabei als geeignet, beim Menschen Harnblasenkrebs auszulösen.

Aromatische Amine spielen in verschiedenen Industriezweigen eine wichtige Rolle unter anderem als Ausgangsstoffe oder Zwischenprodukte bei der Herstellung von Farbstoffen und Pigmenten, der Synthese von Pestiziden oder Arzneimitteln, sowie bei der Verarbeitung von Kunststoffen. Von besonderer Bedeutung sind an heutigen Arbeitsplätzen vor allem Expositionen gegenüber beim Menschen als krebserzeugend eingestuften aromatischen Aminen beziehungsweise ihrer entsprechenden Nitro-, Isocyanat- oder Azo-

verbindungen. Mehr als 50 dieser Gefahrstoffe sind derzeit in den Kategorien 2 bis 5 seitens der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (MAK-Kommission) eingestuft. Diese Substanzen sind also entweder krebserzeugend im Tierversuch (Kat. 2), geben aufgrund erwiesener oder möglicher krebserzeugender Wirkung Anlass zur Besorgnis (Kat. 3A oder B) oder es muss – bei Überschreitung eines vorliegenden MAK- oder BAT-Wertes – mit einer Erhöhung des Krebsrisikos gerechnet werden (Kat. 4 beziehungsweise 5, je nach Wirkmechanismus). Daher ist die Überwachung der Exposition und der Gesundheit bei den mit diesen Stoffen umgehenden Beschäftigten von besonderer Relevanz.

Der Wirkmechanismus, über den aromatische Amine Harnblasenkrebs erzeugen können, ist gut untersucht. Dabei spielt ihre sogenannte metabolische Aktivierung, das heißt die Überführung einer reaktionsträgen Ausgangsverbindung in ein reaktives Zwischenprodukt (Metabolit), eine wichtige Rolle. Die zentralen Schritte, wie die N-Hydroxylierung über das Enzym Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2), finden vor allem in der Leber statt. Das Harnblasenepithel (Urothel) stellt hierbei vorwiegend ein passives Ziel für die genotoxischen Wirkungen dieser reaktiven Metaboliten dar, die von der Leber über den Blutkreislauf in die Nieren und von dort aus in den Urin gelangen.

Kurz gefasst

- Mischexpositionen mit aromatischen Aminen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) kommen an verschiedenen Arbeitsplätzen vor. Insbesondere von einzelnen aromatischen Aminen weiß man, dass sie Harnblasenkrebs hervorrufen können.
- Am IPA wurde mithilfe einer menschlichen Zelllinie aus dem Harnblasenepithel untersucht, wie sich aromatische Amine auf die genotoxische Wirkung des PAK Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) auswirken.
- Anhand der Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass die aromatischen Amine – neben ihren eigenständigen DNA-schädigenden Eigenschaften – zusätzlich auch noch die genotoxischen Eigenschaften des B[*a*]P erhöhen können und somit in einem Gemisch bestehend aus aromatischen Aminen und PAK die deutlich kritischeren Substanzen für die Entwicklung von Harnblasenkrebs darstellen.
- Präventionsmaßnahmen beim Vorliegen von Mischexpositionen sollten vorrangig auf die Vermeidung einer Exposition gegenüber aromatischen Aminen und wenn möglich auch gegen PAK ausgerichtet sein.
- Mithilfe von Zellkultur-Experimenten kann die Wirkung von Mischexpositionen gut unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen untersucht werden.

Zu den genotoxischen Wirkungen gehören zum Beispiel Bindungen der reaktiven Metaboliten an die Erbsubstanz (DNA) in Urothelzellen und daraus resultierende Mutationen, die an der Entstehung von Harnblasenkrebs beteiligt sein können.

PAK und Harnblasenkrebs

Neben aromatischen Aminen wird auch die berufliche Exposition gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) als Risikofaktor für die Entstehung von Harnblasenkrebs beim Menschen diskutiert. Die Zusammenhänge zwischen PAK und Harnblasenkrebs sind hierbei jedoch aus epidemiologischen Studien schwerer abzuleiten als für aromatische Amine, da an Arbeitsplätzen mit Expositionen gegenüber PAK oftmals auch Expositionen gegenüber bekanntermaßen Harnblasenkrebs erzeugenden aromatischen Aminen vorliegen. Der durch PAK verursachte Beitrag zum Harnblasenkrebsrisiko kann daher nur sehr schwer von demjenigen der aromatischen Amine abgegrenzt werden. Im vergangenen Jahr hat der Ärztliche Sachverständigenbeirat „Berufskrankheiten“ beim Bundesministerium für Arbeit und Soziales (BMAS) empfohlen,

eine neue Berufskrankheit „Schleimhautveränderungen, Krebs oder andere Neubildungen der Harnwege durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe bei Nachweis der Einwirkung einer kumulativen Dosis von mindestens 80 Benzo(*a*)pyren-Jahren [$(\mu\text{g}/\text{m}^3) \times \text{Jahre}$]“ in die Anlage 1 der Berufskrankheiten-Verordnung aufzunehmen (BMAS 2016).

PAK entstehen (wie auch aromatische Amine) durch Pyrolyse oder unvollständige Verbrennung aus organischem Material und kommen daher stets als Gemisch verschiedener PAK vor. Expositionen gegenüber PAK finden ubiquitär statt. Die Substanzgruppe der PAK umfasst mehrere hundert Vertreter, von denen zahlreiche krebserzeugend im Tierversuch sind (Kategorie 1B gemäß GHS-Verordnung (EG) 1272/2008 beziehungsweise Kategorie 2 gemäß MAK-Kommission). Einzelne PAK sind hinsichtlich ihres Wirkmechanismus sehr gut untersucht. Auch hier steht die metabolische Aktivierung reaktionsträger Ausgangssubstanzen in reaktive Metaboliten und daraus resultierende genotoxische und krebserzeugende Wirkungen im Vordergrund. Der am besten untersuchte Vertreter der PAK ist das Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P), das auch als Leitsubstanz für die Risikoabschätzung bei PAK-Expositionen herangezogen wird.

In Abb. 1 sind am Beispiel des B[*a*]P die wichtigsten Schritte der metabolischen Aktivierung zum hochreaktiven Diol-Epoxid, welches unter anderem mit der DNA reagiert und Addukte bildet, schematisch dargestellt. Hierbei kommt dem Enzym CYP1A1, das auch in Organen außerhalb der Leber häufig vorkommt, eine sehr wichtige Rolle zu. Darüber hinaus werden PAK nicht nur über CYP1A1 metabolisch aktiviert, sondern sie sind über bestimmte molekulare Mechanismen zusätzlich in der Lage, eine vermehrte Bildung (Induktion) dieses Enzyms zu bewirken. Sie können folglich ihre eigene metabolische Aktivierung verstärken, unter anderem dahingehend, dass mehr genotoxische Metaboliten gebildet werden, die wiederum Einfluss auf die Krebsentstehung nehmen.

Die genauen Mechanismen zum PAK-induzierten Harnblasenkrebs sind insgesamt weniger gut untersucht als für aromatische Amine. Neben der Metabolisierung von PAK außerhalb der Blase scheinen zusätzlich auch direkt lokale Effekte in den Zellen des Harnblasenepithels von zentraler Bedeutung zu sein (Bolt 2014). Zum einen wurden unmetabolisierte PAK im Urin beruflich Beschäftigter mit hoher PAK-Exposition gefunden (z.B. Campo et al. 2014). Zum anderen deuten verschiedene Untersuchungen darauf hin, dass die entscheidenden Schritte zur Generierung von reaktiven genotoxischen Zwischenprodukten aus den unveränderten PAK auch im Uro-

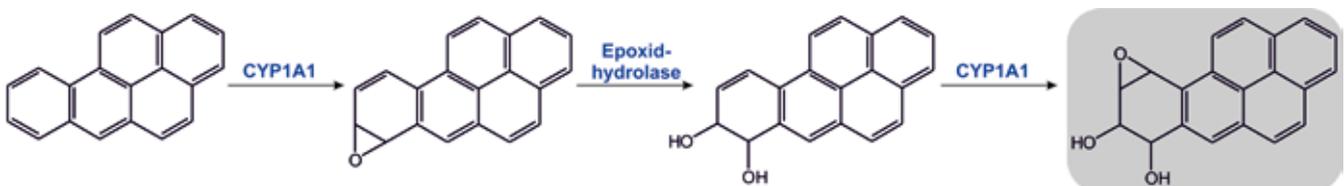


Abb. 1: Vereinfachtes Schema zur metabolischen Aktivierung des Benzo[*a*]pyrens über verschiedene Zwischenprodukte zu einem hochreaktiven Diol-Epoxid (grau hinterlegt), welches unter anderem mit der Erbsubstanz reagiert und DNA-Addukte bildet.

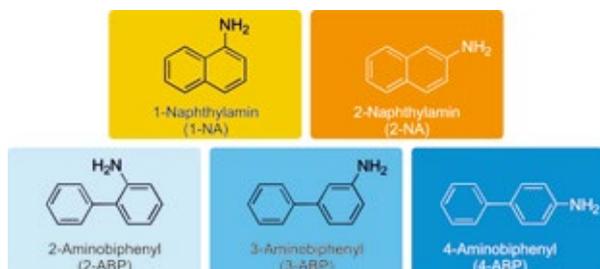


Abb. 2: Strukturformeln der für die Untersuchungen verwendeten Substanzen. Zwei der insgesamt fünf getesteten aromatischen Amine sind als eindeutig krebserzeugend für den Menschen eingestuft (Kat. 1A gemäß GHS-Verordnung bzw. Kat. 1 gemäß MAK-Kommission, weiß dargestellte Strukturformel und Beschriftung).

thel selbst stattfinden können. Beispielsweise wurden die für die metabolische Aktivierung von PAK notwendigen Enzyme in Urothelzellen des Menschen nachgewiesen (Brauers et al. 2000; Imaoka et al. 2000; Roos et al. 2006). Auch wurden in Urothel-Zellkulturen des Menschen und verschiedener, anderer Spezies genotoxische Wirkungen und verstärkte Induktion von CYP1A1 nach Exposition gegenüber B[a]P gefunden (Autrup et al. 1981; Plöttner et al. 2008; Stoner et al. 1982; Wolf et al. 2005).

In-vitro-Untersuchungen zur Ko-Exposition

Mischexpositionen gegenüber PAK und aromatischen Aminen können am Arbeitsplatz zum Beispiel bei der Kohlevergasung sowie durch Lifestyle-Einflüsse wie dem Zigarettenrauchen vorkommen. Klassische epidemiologische Untersuchungen zur Abgrenzung der von PAK verursachten Beiträge zum Harnblasenkrebsrisiko beim Menschen stoßen hier oftmals an Grenzen, da an diesen Arbeitsplätzen ebenfalls bekanntermaßen Blasenkrebs erzeugende aromatische Amine vorkommen und damit ein wesentlicher Confounder sind. Man kann also nicht beurteilen, ob oder in welchem Ausmaß die gefundenen Erhöhungen des Risikos für Harnblasenkrebs an PAK-Arbeitsplätzen

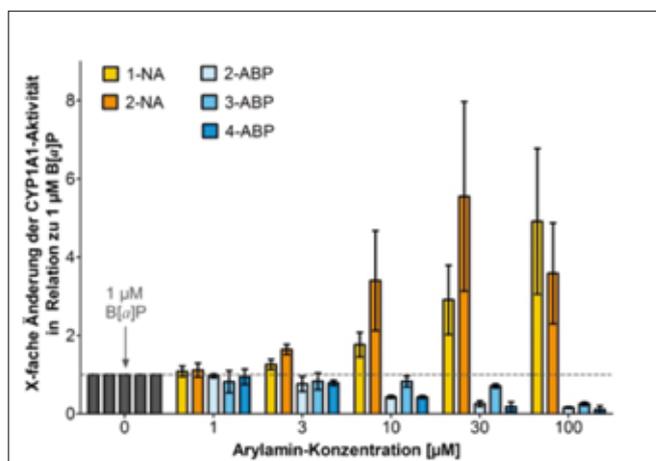


Abb. 3: Relative Änderung (Erhöhung oder Erniedrigung) der gemessenen Aktivitäten des Enzyms CYP1A1 in Harnblasenzellen nach Ko-Inkubation für 24 h mit 1 µM B[a]P (konstant) und 1-100 µM eines aromatischen Amins (1- oder 2-NA bzw. 2-, 3- oder 4-ABP) in drei unabhängigen Versuchen.

tatsächlich auf die PAK zurückzuführen sind. Die relativen Anteile beziehungsweise Beiträge zum Krebsrisiko lassen sich jedoch indirekt gut unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen sowie auf molekularer oder zellulärer Ebene untersuchen, unter anderem in Zellkulturexperimenten im Labor. Dabei werden unterschiedliche toxikologisch relevante Endpunkte wie die Enzyminduktion oder die Bildung spezifischer DNA-Addukte erfasst. Bislang wurden jedoch nur wenige derartige Untersuchungen durchgeführt. So haben einzelne *In-vitro*-Untersuchungen in Harnblasenzellen gezeigt, dass die Expression von an der metabolischen Aktivierung von PAK beteiligten Enzymen (u. a. CYP1A1) bei Ko-Exposition gegenüber B[a]P und kanzerogenen Arylaminen wie 2-Naphthylamin oder 4-Aminobiphenyl verstärkt wird (Borza et al. 2008).

Im IPA werden daher weitergehende Untersuchungen zur möglichen Wechselwirkung zwischen PAK und aromatischen Aminen an humanen Urothelzellen durchgeführt, die unterschiedliche toxikologisch relevante Endpunkte der Krebsentstehung einschließen. Dazu zählt der Einfluss auf die Enzyminduktion und -aktivität sowie die genotoxische Wirkung des B[a]P in Gegenwart aromatischer Amine.

Untersuchungen im IPA

Für die Untersuchungen im IPA wird die Harnblasen-Zelllinie RT4 verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Papillom-Zelllinie des Menschen, für die sowohl das Vorhandensein der erforderlichen Enzyme als auch die konzentrationsabhängige Induktion von CYP1A1 durch B[a]P gezeigt werden konnte (Plöttner et al. 2016). RT4-Zellen werden unter standardisierten Bedingungen in Kultur gehalten und für die jeweiligen Experimente mit definierten Konzentrationen der Testsubstanzen für eine Dauer von 24 h inkubiert.

In den aktuellen Versuchen im IPA ging es zunächst darum zu klären, ob die durch das B[a]P ausgelösten und für die Toxizität relevanten Effekte auf der CYP1A1-Aktivitätsebene durch eine gleichzeitige Exposition gegenüber aromatischen Aminen verändert – vor allem verstärkt – werden können. Daher wurden in den Experimenten binäre Gemische bestehend aus einer konstanten Konzentration des B[a]P (1 µM) und unterschiedlichen Konzentrationen an aromatischen Aminen (1-100 µM) eingesetzt. Die Versuche wurden insgesamt mit fünf aromatischen Aminen durchgeführt (1- und 2-Naphthylamin [NA]) und 2-, 3- und 4-Aminobiphenyl [ABP]) (Abb. 2).

Nach 24-stündiger Ko-Exposition der Zellen gegenüber B[a]P und aromatischen Aminen wurde die Aktivität des Enzyms CYP1A1 bestimmt und die erhaltenen Ergebnisse verglichen mit denen, die bei alleiniger Exposition der Zellen mit B[a]P erhalten wurden. Dazu wurde der Faktor berechnet, um welchen sich die Aktivitäten nach jeweiliger Ko-Exposition im Vergleich zu B[a]P allein verändern.

Für die fünf in Kombination mit B[a]P untersuchten aromatischen Amine wurden zwei gegenläufige Effekte gefunden. Während die Isomere des Naphthylamins (1- und 2-NA) die durch B[a]P erzeugte Aktivität des CYP1A1 noch zusätzlich steigerten, wurde für die iso-

meren Aminobiphenyle genau der gegenteilige Effekt beobachtet. So erniedrigte sich die durch B[a]P induzierte Aktivität des CYP1A1 (Abb. 3). Man kann also schlussfolgern, dass Naphthylamine die genotoxische Wirkung des B[a]P verstärken, Aminobiphenyle jedoch diese Wirkung abschwächen.

Die beobachteten Auswirkungen auf die CYP1A1-Aktivität scheinen insgesamt eher auf strukturelle Besonderheiten der aromatischen Amine zurückzuführen sein als auf deren kanzerogenes Potenzial per se, da selbst eindeutig krebserzeugende aromatische Amine unterschiedliche Wirkungen zeigten (2-NA: aktivitätsfördernd; 4-ABP: aktivitätsmindernd). Bemerkenswert ist der besonders starke Einfluss des 2-NA (im Sinne einer Verstärkung in Richtung der genotoxischen Wirkung), welcher auch mit anderen Untersuchungen zur Wirkstärke des 2-NA übereinstimmt. So ist 2-NA das aromatische Amin mit dem höchsten Hämoglobinbindungsindex welcher als Maß für die genotoxische Wirkung herangezogen werden kann (Weiß et al. 2010).

Fazit

Die am IPA durchgeführten *In-vitro*-Untersuchungen zu Mischexpositionen von PAK und aromatischen Aminen an Harnblasenzellen, also den Zielzellen toxischer Wirkungen bei der Entstehung von Harnblasenkrebs, zeigen, dass in diesen Gemischen aromatische Amine einen bedeutenden Einfluss auf die Enzymaktivität und – in Folge dessen höchstwahrscheinlich auch auf die Genotoxizität des B[a]P nehmen können. Die Ergebnisse zeigen vor allem, dass in einem Gemisch bestehend aus PAK und aromatischen Aminen insbesondere die aromatischen Amine eine kritische Stellung einnehmen. So kann zum Beispiel eine Exposition gegenüber 2-Naphthylamin nicht nur für sich allein ein Risiko darstellen, an Harnblasenkrebs zu erkranken; in Gegenwart von PAK erhöht 2-NA darüber hinaus voraussichtlich auch noch die genotoxische Wirkung des B[a]P. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten in Situationen mit Mischexpositionen aus PAK und aromatischen Aminen primärpräventive Maßnahmen in erster Linie auf eine Minimierung des Anteils an aromatischen Aminen abzielen, unter anderem durch Substitution der aromatischen Amine, Verringerung der Gehalte an aromatischen Aminen in den Ausgangsmaterialien, Anpassung der Produktionsprozesse bis hin zur Entwicklung selektiver Filtermaterialien.

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

Literatur

1. Autrup H, Grafstrom RC, Christensen B, Kieler J: Metabolism of chemical carcinogens by cultured human and rat bladder epithelial cells. *Carcinogenesis* 1981; 2: 763-768
2. BMAS: Berufskrankheiten-Verordnung, hier: Empfehlung des Ärztlichen Sachverständigenbeirats „Berufskrankheiten“ – Harnblasenkrebs durch PAK – Bek. d. BMAS v. 1.7.2016. *GMBI* 33-34: 659-665
3. Bolt HM: Causation of human urothelial cancer: There are challenging new data! *Arch. Toxicol* 2014; 88: 1769-1770
4. Borza A et al.: Synergism of aromatic amines and benzo[a]pyrene in induction of Ah receptor-dependent genes. *Arch Toxicol* 2008; 82: 973-980
5. Brauers A et al.: Cytochrome P450 isoenzyme mRNA expression pattern in human urinary bladder malignancies and normal urothelium. *Cancer Detect Prev* 2000; 24: 356-363
6. Campo L et al.: Urinary carcinogenic 4-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in coke oven workers and in subjects belonging to the general population: role of occupational and environmental exposure. *Int J Hyg Environ Health* 2014; 217: 231-238
7. Plöttner S et al.: Evaluation of time-dependence and interindividual differences in benzo[a]pyrene-mediated CYP1A1 induction and genotoxicity in porcine urinary bladder cell cultures. *J Toxicol Environ Health A* 2008; 71: 969-975
8. Plöttner S et al.: Effects of benzo[a]pyrene, aromatic amines, and a combination of both on CYP1A1 activities in RT-4 human bladder papilloma cells. *J Toxicol Environ Health A* 2016; 79: 1106-1117
9. Roos PH et al.: Expression of cytochrome P450 enzymes CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 and CYP4B1 in cultured transitional cells from specimens of the human urinary tract and from urinary sediments. *Arch Toxicol* 2006; 80: 45-52
10. Stoner GD et al.: Metabolism and DNA binding of benzo[a]pyrene in cultured human bladder and bronchus. *Carcinogenesis* 1982; 3: 195-201
11. Weiß T et al.: Berufskrankheit 1301. Bewertung der beruflichen (Mit-) Verursachung von Harnblasenkrebskrankungen unter Berücksichtigung der quantitativen Abschätzung der Einwirkung der aromatischen Amine 2-Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl und o-Toluidin. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 2010; 45: 222-235
12. Wolf A et al. The effect of benzo[a]pyrene on porcine urinary bladder epithelial cells analyzed for the expression of selected genes and cellular toxicological endpoints. *Toxicology* 2005; 207: 255-269