

ARBETSMILJÖ FONDENS SAMMANFATTNINGAR

1103

Industrikemikaliers genotoxicitet

En djurexperimentell test

För innehållet i sammanfattningen svarar Björn Hellman, Kemikalieinspektionen, Vetenskaplig utredning och dokumentation, Box 1384, 171 27 Solna, tel 08-730 57 00.

Pnr 80-1030 Kemiska problemområden, allmänt (10)

Oktober 1987

Bakgrund

Prövning av kemikaliers förmåga att skada arvsmassan (genotoxicitet) tillhör en av de mer betydelsefulla delarna i en toxikologisk utvärdering. Detta beror på det nära samband som visats råda mellan skador på arvsmassan och uppkomst av tumörer, foster-skador och ärftliga sjukdomar.

Genotoxicitet är ett relativt vitt begrepp som omfattar många olika typer av effekter på det genetiska materialet. Sålunda finns testsystem som registrerar bestående förändringar i cellernas arvs massa (mutationer), både på DNA-molekyl- och kromosomnivå. Andra testsystem registrerar primära DNA-skador. Exempel på sådana är DNA-basförändringar, dimerbildning, "crosslinks" och brott på DNA-strängen. De primära DNA-skadorna kan, till skillnad från mutationerna, repareras av cellerna. Om detta sker på ett korrekt sätt innan cellerna delat på sig, förblir arvsmassan in-

takt. I annat fall kan DNA-skadorna ge upphov till celldöd eller mutationer.

De testsystem som finns för påvisande av genotoxicitet omfattar en mångfald olika testorganismer, alltifrån bakterier, jästsvampar, insekter och odlade däggdjursceller till intakta försöksdjur. Alla testsystem har sina för- och nackdelar. Det är inte ovanligt att en kemikalie som är en kraftig mutagen i ett test visar sig vara svagt genotoxisk i ett annat och helt sakna effekt i ett tredje testsystem. Vid en prövning av kemikaliers genotoxicitet (och därmed eventuell carcinogenicitet) används därför ofta ett batteri av olika typer av korttidstester.

Den djurexperimentella metod som prövats vid Institutionen för toxikologi, Uppsala universitet, är avsedd att vara ett komplement till andra typer av korttidstester vid utvärderingen av kemikaliers genotoxicitet. Den allmänna principen för metoden är att undersöka om ett skadligt ämne

åstadkommer en påverkan på DNA-syntesen i olika vävnader hos intakta försöksdjur (mus eller råtta). Vid försöken tillförs radioaktivt märkt tymidin (^3H -tymidin) dels kontrolldjur, dels djur som förbehandlats med en relativt låg dos av testsubstansen. Tymidin omvandlas i cellerna och byggs selektivt in i DNA. Påverkan på ^3H -tymidinupptaget (DNA-syntesen) i olika vävnader hos behandlade djur och kontroller registreras sedan med vätskeskintillationsmätning och/eller helkroppsautoradiografi. Som ett indirekt mått på en primär DNA-skada erhålls en nedgång i inbyggnaden av det radioaktivt märkta tymidinet.

Våra undersökningar har omfattat dels ren metodutveckling, dels studier av olika typer av modellsubstansers effekter på inkorporeringen av ^3H -tymidin. Syftet med utvecklingsarbetet har främst varit att maximalt standardisera försöksbetingelserna samt att jämföra och pröva olika analysmetoder. Vi har även studerat betydelsen av olika testparametrar, såsom överlevnadstid mellan tymidininjektion och avlivandet av djuret.

Försöksuppläggning och använda metoder

De olika testsubstanserna har i allmänhet tillförts i låga doser, som valts så att djurens allmäntillstånd förblivit opåverkat. Som en standardrutin har vi valt att studera de olika kemikaliernas effekter 24 timmar efter given injektion. ^3H -tymidinet ges alltid två timmar innan djuret avlivas. Det kvantitativt bästa sättet att registrera mängden inkorporerat ^3H -tymidin är genom vätskeskintillationsmätning. Efter det att de utvalda organen dissekerats fram från det döda djuret, isoleras en DNA-fraktion (alternativt en syraolöslig fraktion). Mängden radioaktivitet bestäms därefter i en impulsräknare som förmår registrera β -strålningen från tritiumet.

Resultat

I det föreslagna djurexperimentella testet för påvisande av genotoxicitet har ett flertal olika grupper av kemikalier undersökts: po-

lycykliska aromatiska kolväten, *N*-nitrosoföreningar, halogenerade alifatiska kolväten, cytostatika av olika slag samt tungmetallen kadmium.

I tymidintestet hade de carcinogena polycykliska aromatiska kolvätena 7,12-dimetylbens(a)antracen, bens(a)pyren och 3-metylkolantren relativt kraftiga effekter och hämmade ^3H -tymidininkorporeringen i ett flertal olika organ. Det icke-carcinogena polycykliska kolvätet antracen saknade däremot effekt.

Till skillnad från de polycykliska aromatiska kolvätena gav de fyra carcinogena *N*-nitrosaminer vi prövat [dimetylnitrosamin, *N*-nitrosornikotin, 4-(*N*-metyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon och *N*-nitrosopyrrolidin] ett hämmat upptag av ^3H -tymidin endast i ett fåtal av de undersökta organen. Dessa överensstämde väl med dem som rapporterats vara målorgan både för deras tumörframkallande effekter och för deras metabolism. En icke-carcinogen *N*-nitrosoförening (*N*-nitrosoprolin) saknade effekt i testet. Mot bakgrund av de rapporter som visar att långtidstillförsel av etanol kan öka tumörfrekvensen hos djur som behandlas med carcinogena nitrosaminer, prövades om alkohol även kunde påverka en genotoxisk nitrosamins (*N*-nitrosopyrrolidin) tymidinhämmande effekt. Förbehandlingen med etanol förstärkte *N*-nitrosopyrrolidins tymidinhämmande förmåga i två av dess tre målorgan (nässlemhinna och lunga).

De flyktiga carcinogenerna 1,2-dibrometan och 1,2-dikloretan gav ett hämmat ^3H -tymidinupptag i målorganen för cancer – förmage och nässlemhinna –, men också i en del andra organ. De kemiskt närbesläktade kemikalierna skilde sig åt på ett slående sätt vad beträffar tymidininkorporeringen i tymus. Medan 1,2-dibrometan gav ett kraftigt reducerat ^3H -tymidinupptag, saknade 1,2-dikloretan effekt.

Cytostatika utgör utmärkta modellsubstanser vid utprovning av olika testparametrar, då de för att utöva sina tumörhämmande effekter ofta verkar genom att på olika sätt skada DNA. Eftersom många cytostatika genom sina DNA-skadande effekter är kemiska carcinogener, utgör de ar-

betsmiljöproblem inom sjukvården. Tre olika cytostatiskt verksamma substanser har prövats i tymidintestet: adriamycin, amsacrin och podofyllotoxin. Alla gav relativt kraftiga effekter på ³H-tymidininkorporeringen utan att påverka mössens allmän-tillstånd.

Kadmium skilde sig från ovan nämnda kemiska carcinogener genom att hämma ³H-tymidinupptaget endast då en hög dos injicerades. Den mest påtagliga effekten av kadmium var annars ett ökat upptag av ³H-tymidin i vissa organ. Det ökade tymidinupptaget var kopplat både till ett högt organupptag av kadmium och till höga halter av ett kadmiuminducerat protein, metallothionein.

Allmän slutsats

I vår tillämpning av metoden att använda DNA-synteshämning som ett enkelt sätt att spåra genotoxiska ämnen har vi valt att registrera en eventuell påverkan i ett flertal olika organ samtidigt. Fördelarna med detta förfarande är uppenbara. Testsubstansen tillåts att fördelas och metaboliseras (omvandlas) i ett intakt försöksdjur. Inte minst metabolismen är en viktig parameter, eftersom de flesta genotoxiskt aktiva kemikalier

förutsätter metabolisk bioaktivering för att utöva sina DNA-skadande effekter. I testet erhålls kvantitativa svar på substansernas effekter, och eventuella målorgan kan spåras.

Trots att tymidintestet är ospecifikt på så sätt att man generellt inte kan fastslå om den avlästa effekten (minskad inkorporering av ³H-tymidin) beror på en direkt DNA-skada eller på en mer ospecifik effekt på cellerna, kan det sammanfattningsvis konstateras att erfarenheterna från den av oss använda metoden varit goda. Det framstår som meningsfullt att också fortsättningsvis utnyttja registrering av störning i DNA-syntes i olika organ hos intakta försöksdjur, som ett komplement till andra korttidstester, för att öka våra kunskaper om kemikaliers toxicitet/genotoxicitet.

Rapporten

En djurexperimentell test av industrikemikaliers genotoxiska effekter. Registrering av störning i DNA-syntes (20 sid) kan beställas vid Institutionen för toxikologi, Uppsala universitet, Biomedicum, Box 594, 751 24 Uppsala, tel 018-174249. Pris: 40 kr.

Arbetsmiljofonden

Box 1122, 111 81 Stockholm
Tel 08-796 47 00 (vx)