

ARBETSMILJÖ FONDENS SAMMANFATTNINGAR

1205

Formaldehydens genotoxicitet i humana celler

För innehållet i sammanfattningen svarar Roland C. Grafström, Institutionen för Toxikologi, Karolinska Institutet, Box 60400, 104 01 Stockholm

Pnr 84-0828 Kemiska problemområden, allmänt (10) Undersökningar kring enskilda kemiska ämnen (26) September 1988

Bakgrund

Metoder för extrapolering av försöksdjursdata till människan

Extrapolering av toxikologiska data från försöksdjur innebär en osäker uppskattning av risker för människan. Traditionell biomedicinsk forskning använder laboratoriedjur, dvs framför allt råttor och möss, för att undersöka den toxiska och carcinogena potentialen hos kroppsfrämmande ämnen. För människan kan olika riskfaktorer påvisas genom epidemiologiska undersökningar, tex genom att människor som exponerats för vissa ämnen i arbetslivet följs retrospektivt. För att möjliggöra ytterligare experimentell forskning kring problemen med extrapolering av försöksdjursdata till människan har tekniker utvecklats för att in vitro (latin, i provrör dvs utanför kroppen) odla vävnader och celler från både mänskliga och djur. Försöksdjur och människa kan

genom detta studeras sida vid sida och jämföras under vetenskapligt kontrollerade betingelser. En viktig aspekt är att en parallell extrapolering av resultat på olika nivåer av biologisk organisation, dvs från molekyllär nivå, via organeller, celler, till vävnadsdelar möjliggörs. På organnivå kan små vävnadsdelar användas och hållas levande i sterila odlingskärl. På liknande sätt kan isolerade celler som växer i suspension eller på ytor studeras. Cellens beståndsdelar kan också fraktioneras och användas. Denna typ av parallella jämförelser in vitro underlättar en extrapolering till den intakta organismen och mellan människan och olika djurarter.

Det är framför allt resurser till den experimentella cancerforskningen som bidragit till etableringen av vävnads- och cellodlingstekniker med mänskligt material. Tumörömvandling hos människan sker till 90 % i epitelet och stor vikt har därför lagts till metodutveckling för odling av just epi-

teliala vävnader och celler. Man frågar sig därför hur växt och differentiering, dvs delnings- och mognadsprocessen, hos framför allt epitelceller förändras vid canceromvandling (carcinogenes). Denna process är mycket komplicerad hos människan, och antas ske i flera steg under en genomsnittstid av ca 35 år.

Mekanismer för canceromvandling

Det första steget innebär *initiering* av canceromvandlingen. Vid initieringen kan skador i det genetiska materialet, dvs deoxiribonukleinsyran (DNA), uppkomma i en cell genom påverkan från kemikalier, strålning eller virus. Genom celledelning uppkommer en permanent genetisk förändring dvs en mutation i dottercellen. Forskningen runt sk cancergener eller onkogener, visar att punktmutationer kan uppkomma i normala gener som sedan kan involveras i canceromvandlingen. En initierad cell liknar till det yttre den normala cellen och kan något förenklat liknas vid en sovande och outvecklad cancercell. Det andra delsteget vid canceromvandlingen som kan urskiljas kallas *promotion*. Promotionen innebär egentligen att den initierade cellen får en möjlighet att expandera och växa på de omgivande normala cellernas bekostnad. Cellen genomgår en selektiv klonal expansion under bildning av en godartad tumör. Man talar om den monoklonala uppkomsthypotesen, dvs alla celler i den godartade tumören har uppkommit ur en cell. Att en cell klonas innebär alltså att en sk moder-cell blir till många fler dotterceller, som är identiskt lika ursprungscellen. Inom cancerforskningen undersöks bakgrunden till denna process; varför kan den initierade cellen dela sig oftare än de omgivande normala cellerna? Vad är det som gör att den latent cancercellen inte lika lätt genomgår differentiering dvs den mognadsprocess som normala epitelceller genomgår innan de avstöts och ersätts av nya celler?

Ytterligare genetiska förändringar antas behövas ske under nästa fas för att en godartad tumör skall övergå till att bli elakartad, sk *konvertering*. Genernas stabilitet anses under denna fas successivt minska och cellerna genomgår sk fenotypisk drift,

de förändras genom den omgivande vävnadens påverkan och selektionstryck. Under den fortsatta canceromvandlingen sk *progression*, avregleras cellens funktioner och genernas konfiguration sedan i allt högre grad. Den gradvis ökande överlevnadsförmåga och autonomi från den normala tillväxtregleringen som cellerna uppvisar, innebär också en förklaring till den ökande heterogenicitet som oftast uppstår i elakartade tumörer, dvs ett flertal olika cellpopulationer med skilda egenskaper, uppkommer trots att de alla anses ha sitt ursprung från den första initierade cellen. Canceromvandlingen är en mycket komplex process, som det är och ännu förblir en stor utmaning att försöka utreda.

Användning samt biologiska effekter av formaldehyd

Formaldehydens potential att orsaka toxiska effekter hos människan, har under senare år rönt en avsevärd uppmärksamhet. Exponeringsmöjligheterna är stora både inom och utom arbetslivet. Formaldehyd används framför allt i kemisk- och byggnadsindustri för framställning av tex plaster, färg, lim, konstmaterial, gummiprodukter, biocider, spånplattor och isoleringsmaterial. Formaldehydens konserverande egenskaper utnyttjas sedan gammalt i laboratorier men också för framställning av kosmetika, vacciner, läkemedel, desinfektionsmedel och olika typer av dentala ersättningsar. Att formaldehyd dessutom bildas i tobaksrök, bensin och dieselavgaser samt frigörs från många halvfabrikat som isolerings- och byggmaterial, skapar en potentiell risksituation för människan. Inom trä-, textil-, gummi- och läderindustrin och i tandtekniska laboratorier har många klagat över formaldehydens irriterande effekter i ögon, näsa, hals och på huden som resulterat i akuta besvär av typen rethostä, andnöd, kväljningskänslor, huvudvärk samt rodnader och eksem på huden. För närvarande är det framför allt formaldehydens irriterande och sensibiliserande effekter som ligger till grund för det hygieniska gränsvärdet.

Senare års oro kring formaldehydens användning relaterar framför allt till studier

av carcinogeniciteten där formaldehyd funnits orsaka skivepitelcancer i näshåleslemhinnan på råttan. Induktionen av denna sällsynta cancerform hos råttan är dosberoende (dock ej linjärt dosberoende) och ca hälften av råttorna får tumörer vid dosen 15 ppm (18.5 mg/m³). Ur arbetsmiljösynvinkel är det intressant att notera att många arbetare inom industrin exponerats för åtminstone 10-delen av 15 ppm. Tolerans för formaldehydens irriterande effekter varierar också avsevärt mellan individer och en exponeringsnivå av 15 ppm kan accepteras av vissa. Tillförlitligheten av genomförda och pågående epidemiologiska studier av cancerrisken från formaldehydexposition försvåras av det faktum att individer som exponerats för formaldehyd också exponerats för andra misstänkta cancerframkallande ämnen. De organ i vilka formaldehyd kan misstänkas orsaka tumörer, framför allt övre och nedre luftvägarna, representerar också vävnader i vilka malignitet ofta uppstår. Flera undersökningar med varierande statistisk styrka har indikerat ökning av cancerrisken i andningsvägarna.

Formaldehyden orsakar en rad olika och väl dokumenterade genotoxiska effekter, tex enkelsträngsbrott i DNA, korsbindning mellan DNA och protein, kromosomabberationer, systerkromatidutbyte och mutationer, vilka har studerats i bakterier, svampar, bananflugor och däggdjursceller in vitro. Cellkulturer från möss har transformerats av formaldehyd som kan verka både initierande och promotivt på transformeringsprocessen. Till skillnad från ovan nämnda in vitro studier, har många in vivo studier av formaldehydens genotoxicitet tex dominant letal test, mikrokärntest och induktion av kromosomabberationer och systerkromatidutbyte i allmänhet visat negativa resultat. Formaldehyd har dock på basis av laboratorieexperiment (där den i försöksdjur visats vara en av de mest potentiellt kända carcinogenerna), exponeringsstudier av människa samt epidemiologiska undersökningar, nyligen klassats som en trolig human carcinogen av den svenska Kemikalieinspektionen. Här kan också framhållas att formaldehyd därvid räknas som en *fullständig* carcinogen, dvs orsakar samtliga de

biologiska effekter som krävs för att en normal cell skall transformeras till en cancer-cell.

Uppläggning

Avsikten med denna studie var att karakterisera formaldehydens genotoxicitet i humana celler. Detta innefattar studier av vilka typer av DNA skador som bildas, hur dessa skador repareras och vilka konsekvenser skadorna har för uppkomst av mutationer och för cellernas tillväxt. Vidare avsågs att studera vilka cellbiologiska effekter som erhålls vid samtidig exponering för formaldehyd och andra toxiska, mutagena och carcinogena agens. Slutligen avsågs att utvärdera om formaldehyd, helt eller delvis, kan orsaka effekter som anses vara av betydelse för den flerstegs-omvandling som cancerutveckling innebär.

Resultat

Uppkomst och reparation av olika typer av DNA skador från formaldehyd studerades i normala humana epitelceller och fibroblaster samt i Xeroderma pigmentosumfibroblaster, som jämfört med normala celler har ca 100-faldigt minskad kapacitet för excisionsreparation av DNA. Formaldehyden befanns vara mycket *genotoxiskt* i olika humana celltyper dvs formaldehyd var endast måttligt *cytotoxiskt* vid doser som orsakar ett stort antal DNA skador. Framför allt erhöles skador av typen korsbindning mellan DNA och protein i samtliga testade celltyper. Denna skadetyper befanns kunna repareras med en halveringstid av 2-3 tim. Formaldehyd orsakade också enkelsträngsbrott i DNA. Denna skada uppkom i högre grad i normala celler än i celler med nedsatt DNA reparationskapacitet. Dessa studier visade alltså att formaldehyden orsakar flera typer av DNA skador varav vissa kan repareras genom excisionsreparation i normala celler.

Formaldehydens cytotoxicitet i bronkepitelceller undersöktes också i närvaro av den carcinogena och alkylerande substansen, metylnitrosourinämne, samt efter exponering för joniserande strålning. Därvid

befanns formaldehyd kunna verka i synergi med bägge dessa agens, dvs respektive kombination med formaldehyd gav högre grad av cytotoxicitet än summan av de enskilda ämnenas effekter. Dessa synergieffekter kunde för formaldehyd och strålning sammankopplas med tidigare fynd som visade att formaldehyd hämmar reparationen av enkelsträngsbrott i DNA, uppkomna från joniserande strålning. Därför undersöktes också effekten av formaldehyd på reparation av O⁶-metylguanin i DNA, en typ av skada som orsakas av metylnitrosourinämne. Formaldehyd befanns hämma också denna reparationsprocess, och effekten kunde korreleras till en potentierad förhöjning av mutationsfrekvensen av metylnitrosourinämne. I detta sammanhang visades också för första gången att formaldehyd är mutagen i normala humana celler. Formaldehyd befanns därvid vara lika mutationsframkallande som metylnitrosourinämne dvs ett cancerframkallande ämne som enligt Arbetarskyddsstyrelsens föreskrifter ej får hanteras i arbetsmiljön. Fortsatta studier av även andra aldehyders effekter direkt på enzymet som reparerar O⁶-alkylguaninskadan dvs O⁶-metylguaninmetyltransferas, indikerade att reaktiva aldehyder kunde hämma aktiviteten genom att sannolikt reagera direkt med en cysteinmolekyl i enzymets katalytiska centrum. Formaldehydens förmåga att verka genotoxiskt genom att hämma DNA reparationsprocesser samt att potentiära effekter av andra toxiska och mutagena substanser får genom ovannämnda studier anses vara väl etablerat. Detta innebär troligen att formaldehyd också hämmar reparationen av direkta DNA skador som ämnet självt kan orsaka. Dessutom indikerade dessa studier att bildning av aldehyder vid metabolismen av N-nitrosoföreningar kan bidra till de genotoxiska effekterna av denna betydelsefulla grupp carcinogener. Formaldehyd visades också kunna minska humana cellers totala tiolinnehåll. Denna effekt innebär ytterligare en mekanism för hur cellens känslighet för andra toxiska och mutagena agens kan öka. Sålunda kan formaldehyd tänkas verka som en kocarcinogen genom ett flertal mekanismer.

Formaldehyd och andra aldehyders förmåga att påverka epitelcellers växt och differentiering studerades också. Därvid befanns formaldehyd inducera skvamös differentiering enligt två kriterier: minskad klonal växthastighet och ökad bildning av sk korsbindningshöljen. Motsvarande skadliga effekt i luftvägsepitelet sker hos försöksdjur som tillåts inhalera formaldehyd och kunde alltså i och med detta efterliknas *in vitro*. Eftersom djurexperimentella tumörpromotorer också orsakar en liknande skvamös differentiering av bronkepitelceller, indikerade dessa fynd att formaldehyd kan utöva promotorverkan i en human celltyp som misstänks kunna drabbas av formaldehydberoende hälsoeffekter.

I jämförande studier av andra aldehyder, som också misstänks kunna verka under canceromvandlingens första två faser, har formaldehyd kunnat rankas som mer genotoxiskt än tex acetaldehyd och akrolein. Därvid har distinkta spektra av cyto- och genotoxiska effekter kunnat urskiljas för respektive aldehyd. Uppföljningsstudier i humana bronkceller behöver inriktas på fortsatt utvärdering av formaldehydens cyto- och genotoxicitet samt effekter på tillväxt och differentiering, dels med avseende på cancerutvecklingen som en flerstegsprocess, dels för att försöka utvärdera om formaldehyd kan klassas som en fullständig carcinogen för människan.

Slutsats

Formaldehyd är mycket genotoxiskt i humana celler och orsakar enkelsträngsbrott i DNA, korsbindning mellan DNA och protein samt mutationer. Båda typerna av DNA skador kan repareras, samtidigt som formaldehyd-beroende enkelsträngsbrott kan bildas också indirekt genom DNA excisionsreparation. Formaldehyd kan dessutom verka genotoxiskt genom att hämma olika typer av DNA reparation; bla O⁶-alkylguanin-DNA alkyltransferasaktivitet som reparerar den nitrosaminberoende promutagena skadan O⁶-alkylguanin. Formaldehyd var lika mutationsframkallande i humana celler som det cancerframkallande ämnet metylnitrosourinämne. Dessutom

kan låga icke-signifikant mutagena doser av bägge dessa ämnen synergistiskt samverka och därigenom orsaka mutationer. Formaldehyd kan också påskynda skvamös differentiering av humana epitelceller i likhet med vad som sker i luftvägsepitel hos formaldehyd-exponerade försöksdjur. Eftersom ämnen som verkar som tumörpromotorer i djurförsök också orsakar skvamös differentiering av normalt epitel innebär dessa fynd att formaldehydens eventuella promotorverkan under carcinogenesen kan studeras mekanistiskt i humant epitel. Sammantaget blir slutsatsen att formaldehyd genom ovannämnda in vitro studier av

humant luftvägsepitel visats kunna orsaka ett flertal cytopatiska effekter som relaterar till cancerutvecklingens initierings- och promotionsfaser. Samtidigt har formaldehyd också visats kunna verka som en kocarcinogen genom att öka cellernas känslighet för andra kemiska och fysiska carcinogener.

Rapporten

Formaldehydens genotoxicitet i humana celler (7 sid) kan beställas från Institutionen för Toxikologi, Karolinska Institutet, Box 60400, 104 01 Stockholm. Pris 20 kr.

Arbetsmiljövonden

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