

In vitro-Modelle zur Erfassung des tumorpromovierenden Potentials von Gemischen aus 2,3,7,8-TCDD mit 2,2',4,4',5,5'-HexaCB (PCB153) oder α -Hexachlorcyclohexan.

D. Wölffe¹, K. Möller², S. Marotzki¹, H. Hühnerfuss² und H. Marquardt¹

1) Abteilung für Allgemeine Toxikologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Grindelallee 117 und 2) Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg.

Chlorierte aromatische Kohlenwasserstoffe akkumulieren als persistente Umweltchemikalien in Nahrungsketten und sind daher für die menschliche Gesundheit als Risikofaktoren anzusehen. Die Toxizität von Substanzen mit Dioxin-artiger Wirkung kann anhand von Toxizitätsäquivalenz-Faktoren (TEF) beurteilt werden (1, 2). Voraussetzung für die Anwendung von TEF-Werten auf Substanzgemische ist neben einer guten chemischen Probenanalytik auch die strikte Additivität der Substanzwirkungen. Verschiedene *in vivo*-Experimente z. B. mit definierten PCB-Gemischen ergaben jedoch ein nicht-additives Verhalten bei chronisch toxischen Wirkungen wie Immunsuppression (3), Teratogenität (4) oder Tumorpromotion (5). Zur Ermittlung des chronisch toxischen Potentials einer Umweltprobe wäre daher die Verwendung geeigneter *in vitro*-Testsysteme vorteilhaft. In der vorliegenden Studie wurden als Effekte, die *in vivo* mit Tumorpromotion assoziiert sind, 1. die Wachstumsstimulation von primären Rattenhepatozyten und 2. die Erhöhung der durch initiiierende Kanzerogene induzierten malignen Transformationsrate von Mausfibroblasten (C3H/M2-Zelllinie) nach Tumorpromoter-Behandlung untersucht. In diesen Zellkultur-Modellen waren die bekannten Tumorpromotoren 2,3,7,8-TCDD (6), 2,2',4,4',5,5'-HexaCB (HxCB = PCB153; 7) und α -Hexachlorcyclohexan (α -HCH; 8) als Reinsubstanzen in sehr geringen Konzentrationen promovierend wirksam. Mit definierten Gemischen von TCDD und HxCB wurden antagonistische, mit sehr niedrigen Konzentrationen von TCDD plus α -HCH synergistische Wirkungen beobachtet.

MATERIAL UND METHODEN

TCDD und HxCB wurden von der Fa. Ökometric (Bayreuth, Deutschland) und α -HCH von der Fa. Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland) bezogen. TCDD und HxCB hatten eine Reinheit von mehr als 99%, α -HCH war 98% rein. Die Substanzen wurden in DMSO (für die UV-Spektroskopie, Fa. Fluka) gelöst. Hepatozyten wurden durch Collagenase-Perfusion aus adulten männlichen Wistar-Ratten isoliert und in Kultur 2 Tage mit Tumorpromotoren oder nur mit dem Lösungsmittel DMSO (Kontrollen), wie kürzlich beschrieben, behandelt (9). Am zweiten Tag nach dem Ausplattieren wurden die Zellen nach Colchizin (0,1 mM)-Exposition fixiert und der Mitose-Index mikroskopisch bestimmt. Der Transformationstest mit C3H/M2-Mausfibroblasten wurde nach einem Tumorpromotions-Protokoll wie beschrieben durchgeführt (10). In Kürze: Die Zellen wurden einen Tag nach dem Ausplattieren für 24 h mit dem initiiierenden Kanzerogen Methylcholanthren (MCA, 1mg/ml) oder DMSO (0,5%) behandelt. Nach weiteren 5 Tagen wurde die Tumorpromotor-Behandlung begonnen und bis zum Ende des Experiments fortgesetzt. Nach 8 Wochen wurden die Zellen fixiert und die Transformationsrate (maligne Zellklone/ behandelte Platten) bestimmt.

ERGEBNISSE

Antagonismus von TCDD und HxCB

In primären Rattenhepatozyten wurde bei Behandlung mit sehr geringen Konzentrationen von TCDD (10^{-14} M bis 10^{-12} M) oder HxCB (10^{-7} M) eine geringe, aber signifikante Stimulation der Mitoserate beobachtet (Abb. 1).

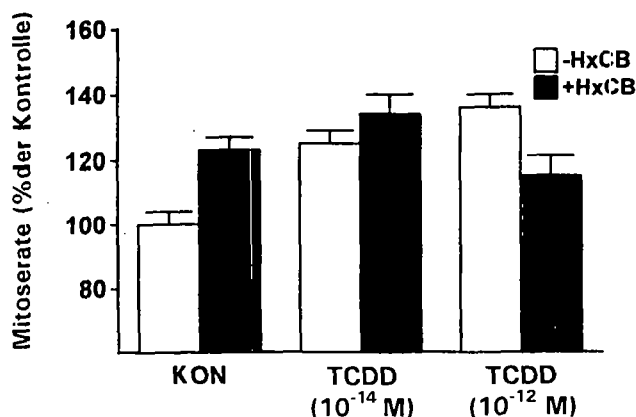


Abb.1: Interaktion von TCDD und HxCB bei der Stimulation der Mitose in primären Rattenhepatozyten. Die Zellen wurden 2 Tage mit den angegebenen TCDD-Konzentrationen in Abwesenheit oder in Gegenwart von HxCB (10^{-7} M) behandelt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 Experimenten mit je 3 Parallelen.

Höhere Konzentrationen von TCDD (bis 10^{-9} M) oder HxCB (10^{-6} M) hatten zwar keinen mikroskopisch erfaßbaren toxischen Effekt, aber geringere Mitoseraten zur Folge (9). Eine gleichzeitige HxCB(10^{-7} M)-Behandlung hatte keinen Einfluß auf die Stimulation durch 10^{-14} M TCDD, antagonisierte aber den Effekt von 10^{-12} M TCDD (Abb. 1). Synergistische Wirkungen sehr geringer Konzentrationen von TCDD (10^{-16} M, 10^{-15} M) und HxCB (10^{-10} M, 10^{-9} M) wurden nicht beobachtet.

Die Ausbeute an maligne transformierten Zellklonen von C3H/M2 Mausfibroblasten nach Initiation mit einer suboptimalen MCA-Konzentration wurde durch Langzeit-Behandlung mit TCDD oder HxCB dreifach erhöht ("Promotion" der Transformation). Die maximal wirksamen Konzentrationen, d.h. $1,5 \times 10^{-12}$ M TCDD und 3×10^{-8} M HxCB, lagen in demselben Bereich wie bei der Mitose-Stimulation von Rattenhepatozyten. Die Abnahme der Promotionswirkung bei höheren TCDD- oder HxCB-Konzentrationen erfolgte ohne Zeichen einer zytotoxischen Wirkung, d.h. die Plattierungseffizienz der Zellen blieb konstant. Die Transformationsrate der Fibroblasten wurde nach Behandlung mit einem definierten Gemisch von TCDD mit 3×10^{-9} M HxCB teilweise und mit 3×10^{-8} M HxCB vollständig gehemmt (Tab. 1).

Tabelle 1: Promotion der malignen Transformation durch TCDD und HxCB

Die Daten sind die Summe aus 3 Experimenten. Die Kulturen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO oder mit dem Initiator MCA vorbehandelt. Danach erfolgte die Langzeit-Behandlung mit den Tumorpromotoren.

	DMSO	MCA
Kontrolle (DMSO)	0 / 19 ^a (0.00) ^b	2 / 25 (0.08)
HxCB (3×10^{-9} M)	0 / 30 (0.00)	3 / 36 (0.08)
HxCB (3×10^{-8} M)	0 / 33 (0.00)	6 / 37 (0.16)
TCDD ($1,5 \times 10^{-12}$ M)	0 / 28 (0.00)	7 / 34 (0.21)
TCDD + HxCB (3×10^{-9} M)	0 / 30 (0.00)	4 / 33 (0.12)
TCDD + HxCB (3×10^{-8} M)	0 / 16 (0.00)	1 / 18 (0.06)

a) Zahl der maligne transformierten Zellklone/ untersuchte Platten.

b) Numerisches Verhältnis, in Klammern.

Synergismus von TCDD und α -HCH

Die Mitoserate von primären Hepatozyten wurde durch 10^{-6} M α -HCH noch nicht, durch 10^{-5} M α -HCH bereits maximal stimuliert; höhere α -HCH-Konzentrationen waren zytotoxisch. Zusätzliche Behandlung mit 10^{-12} M TCDD führte zu keiner Veränderung der Mitose-Stimulation durch 10^{-5} M α -HCH. Dagegen trat bei einer gleichzeitigen Behandlung mit 10^{-6} M α -HCH und 10^{-16} M TCDD eine deutlich synergistische Wirkung auf (Abb. 2).

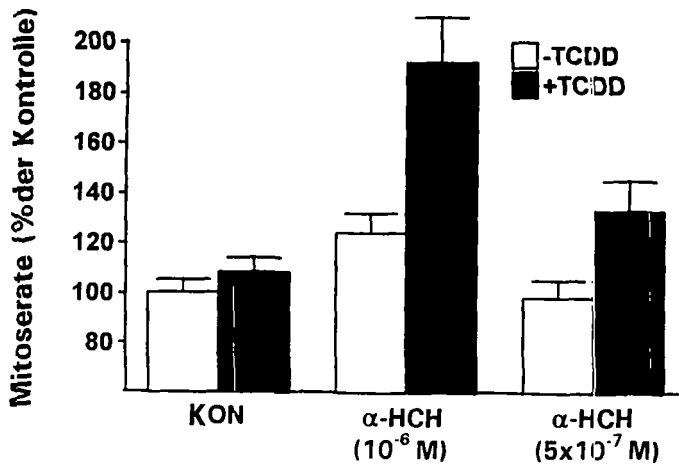


Abb.2: Interaktion von TCDD und α -HCH bei der Stimulation der Mitose in primären Rattenhepatozyten. Die Zellen wurden 2 Tage mit den angegebenen α -HCH-Konzentrationen in Abwesenheit oder Gegenwart von TCDD (10^{-16} M) behandelt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 Experimenten mit je 3 Parallelen.

DISKUSSION

TCDD und HxCB sind als Tumorpromotoren der Rattenleber bekannt; aufgrund der Promotionsindices ist TCDD 400.000fach stärker wirksam als HxCB (7). Ein Vergleich der in dieser *in vitro*-Studie zur Steigerung der Mitoserate in Hepatozyten bzw. der Transformationsrate in Mausfibroblasten maximal effektiven Konzentrationen von TCDD und HxCB ergibt einen Unterschied um den Faktor 500.000. Auch für die Tumorpromotoren PCB 77 und PCB 126 korrelieren die

effektiven Konzentrationen in diesen *in vitro*-Tests (11) mit den Tumorpromotionsindices aus *in vivo*-Experimenten an der Rattenleber (5, 7). Bei der Behandlung der Zellkulturen mit definierten Gemischen aus TCDD und HxCB in Konzentrationsverhältnissen zwischen 1 : 10³ (Tab. 1) und 1 : 10⁷ (Abb. 1) ergeben sich antagonistische Effekte. Diese *in vitro*-Ergebnisse sind im Einklang mit der *in vivo* beobachteten Hemmung TCDD-induzierter immunsuppressiver (3) oder teratogener Effekte (4) bei Mäusen durch gleichzeitige Behandlung mit 10⁴- bis 10⁵mal höheren HxCB-Konzentrationen. Der Mechanismus der Interaktion zwischen TCDD und HxCB ist noch unklar. HxCB könnte in hohen Konzentrationen durch Bindung am Ah-Rezeptor die TCDD-induzierten Effekte hemmen. Allerdings wird diese Hemmung durch HxCB nicht bei der Ah-Rezeptor-abhängigen TCDD-Induktion von Cytochrom 1A1 beobachtet (12). Daher spielen bei der Tumorpromotionswirkung offenbar auch Ah-Rezeptor-unabhängige Mechanismen, die eine Interferenz von TCDD und HxCB ermöglichen, eine Rolle. Aufgrund relativ hoher HxCB-Konzentrationen in Umweltproben (12) könnte der Antagonismus von HxCB mit starken Ah-Rezeptor-Agonisten für chronisch toxische Effekte durchaus relevant sein. Unter dieser Prämisse würde beispielsweise das tumorpromovierende Potential PCB-haltiger Proben bei Anwendung des TEF-Konzepts überschätzt. Andererseits könnte das Risiko von Tumorpromotion für Ah-Rezeptor-Agonisten unterschätzt werden, wenn der potenzierende Effekt von nicht TCDD-/PCB-artigen, persistenten Umweltchemikalien unberücksichtigt bleibt. Eine wichtige Substanz in dieser Hinsicht ist α -HCH, das zusammen mit TCDD als Nebenprodukt industrieller Prozesse aufgetreten ist. Eine synergistische Wirkung mit niedrigen Konzentrationen von TCDD (10⁻¹⁶ M) und α -HCH (10⁻⁵ M) ist *in vitro* nachweisbar (Abb. 2).

Aufgrund dieser Ergebnisse könnten die ausgewählten *in vitro*-Modelle für eine toxikologische Bewertung von komplexen Substanzgemischen wie Extrakten aus Umweltproben geeignet sein.

REFERENZEN

- 1) Safe SH. Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. Crit.Rev.Toxicol. 1994; 24: 87-149.
- 2) Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, Brouwer A, Derks HJGM, Feeley M, Golor G, Hanberg A, Larsen JC, Liem AKD, Safe SH, Schlatter C, Waern F, Younes M, and Yrjänheikki E. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. Chemosphere 1994; 28: 1049-1067.
- 3) Biegel L, Harris M, Davis D, Rosengren R, Safe L, and Safe S. 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl as a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin antagonist in C57BL/6J mice. Toxicol. Appl.Pharmacol. 1989; 97: 561-571.
- 4) Nagao T, Golor G, Hagenmaier H, and Neubert D. Teratogenic potency of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran and of three mixtures of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in mice. Problems with risk assessment using TCDD toxic-equivalency factors. Arch.Toxicol. 1993; 67: 591-597.
- 5) Sargent L, Sattler GL, Roloff B, Xu Y, Sattler CA, Meisner L, and Pitot HC. Ploidy and specific karyotypic changes during promotion with phenobarbital, 2,5,2',5'-tetrachloro-biphenyl, and/or 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in rat liver. Cancer Res. 1992; 52: 955-962.
- 6) Pitot HC, Goldsworthy T, Campbell HA, and Poland A. Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. Cancer Res. 1980, 40: 3616-3620.
- 7) Hemming H, Flodström S, Wärngård L, Bergman A, Kronevi T, Nordgren I, Ahlborg UG. Relative tumor promoting activity of three polychlorinated biphenyls in rat liver. Eur.J.Pharmacol. 1993; 248: 163-174.
- 8) Schroter C, Parzefall W, Schroter H, and Schulte-Hermann R: Dose-response studies on the effects of alpha-, beta-, and gamma-hexachlorocyclohexane on putative preneoplastic foci, monooxygenases, and growth in rat liver. Cancer Res. 1987, 47: 80-88.
- 9) Wölfle D, Becker E, and Schmutte C. Growth stimulation of primary rat hepatocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Cell Biol.Toxicol. 1993; 9: 15-31.
- 10) Wölfle D, Schmutte C, Westendorf J, and Marquardt H. Hydroxyanthraquinones as tumor promoters: enhancement of malignant transformation of C3H mouse fibroblasts and growth stimulation of primary rat hepatocytes. Cancer Res. 1990; 50: 6540-6544.
- 11) Wölfle D, Kähler A, and Marquardt H. Assessment of the cytotoxic and tumor promoting potential of 2,3,7,8-TCDD and PCB congeners *in vitro*: Comparison of *in vitro*- and *in vivo*-data. Organohalogen Compounds, 1995, in press.
- 12) Leece B, Denomme MA, Towner R, Li A, and Landers J. Nonadditive interactive effects of polychlorinated biphenyl congeners in rats: role of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin receptor. Can.J.Physiol.Pharmacol. 1986, 65:1908-1912.