

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Persistenz der DNA-Addukte des Luftschadstoffes  
3-Nitrobenzanthron in der Ratte**

H.H. Schmeiser, C.A. Bieler, M. Cornelius, V.M. Arlt, R. Klein und M.  
Wiessler

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung Molekulare  
Toxikologie, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg

Förderkennzeichen: BWR 22009

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit Mitteln des  
Landes Baden-Württemberg gefördert

November 2004

## Abschlußbericht zum Projekt BWR 22009:

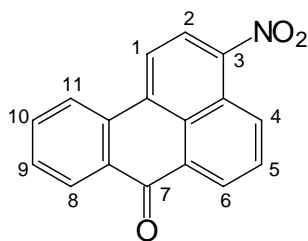
### Persistenz der DNA-Addukte des Luftschadstoffes 3-Nitrobenzanthron in der Ratte

H.H. Schmeiser, C.A. Bieler, M. Cornelius, V.M. Arlt, R. Klein und M. Wiessler

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung Molekulare Toxikologie, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg

#### 1. Einleitung

Polyzyklische Nitroaromaten (Nitro-PAK) sind ubiquitäre Umweltschadstoffe, die sowohl in den Extrakten der Abgase von Diesel- und Benzinmotoren als auch auf der Oberfläche von Luftstaub auftreten (Purohit & Basu, 2000; EPA 2002). Eine mutagene Aktivität in bakteriellen und Säugerzellsystemen als auch eine krebsauslösende Wirkung im Tierversuch sind von einigen Vertretern dieser Stoffklasse eindeutig belegt. Obwohl die Bedeutung der Nitro-PAK für die Krebsentstehung beim Menschen zur Zeit nicht geklärt ist, hat ihre Korrelation mit der Lungenkrebsrate in verkehrsbelasteten Gebieten und ihr direkter Nachweis im Gewebe von Lungenkrebspatienten (Tokiwa et al., 1993) zu einem beträchtlichen Interesse an einer Risikoabschätzung geführt. Epidemiologische Studien zeigten, dass eine berufsbedingte Exposition mit Dieselabgasen mit einem erhöhten Lungenkrebs-Risiko verbunden ist (Brüske-Hohlfeld et al., 1999; Boffetta et al., 2001) und führten dazu, dass die IARC Dieselabgas als wahrscheinlich carcinogen für den Menschen (group 2A) eingestuft hat (IARC, 1989). Nach einer aktuellen Studie des Umweltbundesamtes (2003) ließen sich in Deutschland jährlich ca. 2000 Todesfälle durch Lungenkrebs vermeiden, wenn alle Dieselfahrzeuge Partikelfilter hätten. Für den Menschen stellt der Ruß des Dieselabgases die Hauptexpositionsquelle mit Nitro-PAK dar, wobei 1-Nitropyren die Hauptkomponente ist (ca. 200 ppm).



3-Nitrobenzanthron (3-NBA)  
3-Nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on

Vor wenigen Jahren (Enya et al., 1997) wurde in Dieselabgasen und in Luftstaub-Extrakten ein neuer Vertreter dieser Stoffklasse entdeckt -3-Nitrobenzanthron- (3-NBA, 3-Nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on). Erst kürzlich wurde 3-NBA auch an der Oberfläche von Böden und im Regenwasser gefunden (Murahashi et al., 2003), was eine ubiquitäre Verbreitung nahe legt. Obwohl es nur in geringen Mengen (0,6-6,6 µg/g Partikel) vorkommt, ist dieses aromatische Nitroketon toxikologisch relevant, da es eines der stärksten im Ames-Test getesteten Mutagene darstellt und im Verdacht steht beim Menschen carcinogen zu wirken (Enya et al., 1997; Adachi et al., 2000). Die Genotoxizität dieses potentiellen Carcinogens wurde durch Mikrokern-Induktion in der Maus und humanen Zellen als auch im Comet-Assay und durch die Induktion von Mutationen in humanen Zellen belegt (Enya et al., 1997; Phousongphoung et al., 2000; Lamy et al., 2004).

Eine weitere Bestätigung der genotoxischen Wirkung von 3-NBA lieferte der Nachweis von 3-NBA-spezifischen DNA-Addukten *in vitro* nach Aktivierung mit Xanthin Oxidase, einer Säuger-Nitroreduktase, oder Rattenleber S9 (Bieler et al., 1999) und *in vivo* in Ratten (Arlt et al., 2001) und Mäusen (Arlt et al., 2004). Die DNA-Addukte, die nach Aktivierung von 3-NBA mit Xanthin Oxidase entstehen, sind Reaktionsprodukte aus reduktiven Metaboliten mit Purinbasen. Obwohl ihre Strukturen noch aufzuklären sind, konnten wir zeigen, dass die Reduktion der Nitrogruppe der verantwortliche Aktivierungsweg für die Bildung dieser 3-NBA-DNA-Addukte *in vivo* in der Ratte ist (Arlt et al., 2001).

In Inkubationen von Lungen-Alveolar-Zellen der Ratte mit 3-NBA wurde 3-Aminobenzanthron (3-ABA) als Hauptmetabolit identifiziert (Borlak et al., 2000). Kürzlich konnten Seidel et al. (2002) durch die Bestimmung von 3-ABA im Urin von Salzbergwerksarbeitern, die beruflich mit Dieselabgas exponiert waren, die Aufnahme von 3-NBA beim Menschen belegen und beweisen, dass diese Exposition auch nachweisbar ist.

Eine Vielzahl von experimentellen Daten deuten darauf hin, dass die Bildung von DNA-Addukten einen für die Initiation der chemischen Carcinogenese kritischen Schritt darstellt (Poirier et al., 2000). Ferner sind DNA-Addukte äußerst nützliche Biomarker zum Nachweis von Expositionen gegenüber genotoxischen Verbindungen wie sie in Dieselabgasen vorkommen (Perera, 1990). Mehrere Studien konnten durch die Detektion von DNA-Addukten mit dem hochempfindlichen <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahren höhere Spiegel von sperrigen (bulky) DNA-Addukten in Personen, welche stark mit Dieselabgas exponiert waren, nachweisen (Nielsen et al., 1996, Palli et al., 2001). Daher könnten DNA-Addukte auch als Biomarker zur Vorhersage eines Krebs-Risikos dienen.

Carcinogene Nitro-PAK müssen zu elektrophilen Zwischenstufen metabolisiert werden um ihre genotoxische und carcinogene Wirkung über die Bildung von DNA-Addukten entfalten zu können. Diese metabolische Aktivierung führt entweder über eine Reduktion der Nitrogruppe oder bzw. und eine Oxidation am Ringsystem (Purohit & Basu, 2000). Katalysiert wird die Nitroreduktion sowohl durch cytosolische als auch durch mikrosomale Enzyme wie Aldehyd-Oxidase, Xanthin Oxidase, DT-Diaphorase und die Cytochrom P450 Enzyme. Weitere Biotransformationen durch Phase II-Enzyme wie *N,O*-Acetyltransferasen (NATs) oder Sulfotransferasen (SULTs), die zu reaktiven Estern führen, die durch Hydrolyse zu elektrophilen adduktbildenden Nitreniumionen zerfallen, sind ebenfalls möglich. Kürzlich konnten wir zeigen, dass sowohl *O*-Acetylierung durch humane NAT1 und NAT2 als auch *O*-Sulfonierung durch humane SULT1A1 und humane SULT1A2 erheblich zu der starken genotoxischen und mutagenen Wirkung von 3-NBA beitragen (Arlt et al., 2002; Arlt et al., 2003).

Da viele Gene der Enzyme des Fremdstoffmetabolismus in verschiedenen Varianten existieren und dadurch unterschiedliche Enzymaktivitäten aufweisen, ist zur Abschätzung der individuellen Suszeptibilität gegenüber 3-NBA die Bestimmung derjenigen humanen Enzyme nötig, welche an der Aktivierung von 3-NBA beteiligt sind. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie untersucht in wieweit der Mensch in der Lage ist 3-NBA zu aktivieren und versucht, die Enzyme, die an der DNA-Adduktbildung von 3-NBA beteiligt sind, zu identifizieren.

Ein weiteres Ziel dieses Projektes war, die genotoxische Wirkung von 3-NBA *in vivo* nach Applikation in die Lunge an Ratten zu untersuchen. Hierzu wurde die DNA-Adduktbildung von 3-NBA nach intratrachealer Instillation mit dem <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahren in mehreren Organen und im Blut der Ratte bestimmt. Ferner wurde die Persistenz der gebildeten 3-NBA-DNA-Addukte mit dem gleichen Verfahren ermittelt. Die DNA-Adduktbildung von 3-NBA in der Ratte nach oraler oder intraperitonealer Gabe wurde von uns bereits studiert (Arlt et al., 2001; Arlt et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigten, dass das gleiche DNA-

Adduktmuster, bestehend aus mehreren 3-NBA spezifischen DNA-Addukten, in verschiedenen Organen der Ratte sowohl nach oraler als auch nach intraperitonealer Applikation gebildet wird. Da aber Luftschadstoffe wie 3-NBA hauptsächlich durch Inhalation aufgenommen werden, war eine Applikation in die Lunge zur Simulierung der humanen Expositionssituation angebracht. Die Exposition durch Inhalation ist am besten geeignet die humane Situation nachzustellen, benötigt aber eine spezielle Ausrüstung um eine Expositions-Atmosphäre zu erzeugen. Deshalb wurde von uns die direkte Instillation in die Lunge wie in vielen anderen Studien auch als Alternative zur Inhalation gewählt (Driscoll et al., 2000). Ein entscheidender Vorteil der Instillation gegenüber der Inhalation ist, dass die tatsächlich in die Lunge applizierte Dosis bekannt ist.

Durch die Bestimmung des genotoxischen Potentials, DNA-Adduktbildung und Addukt-Persistenz, von 3-NBA im Säugerorganismus nach intratrachealer Instillation, sowie die Aufklärung des zugrunde liegenden molekularen Aktivierungsmechanismus sollten unsere Untersuchungen dazu dienen ein mögliches Krebsrisiko durch 3-NBA-Exposition besser abschätzen zu können.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Mikrosomen Herstellung und Inkubationen**

3-NBA wurde wie beschrieben hergestellt (Arlt et al., 2002). Leber-Mikrosomen von 8 Personen, die durch Unfälle ums Leben kamen, waren ein Geschenk von Dr. Szotakova (Prag). Alle Angaben zu den Spendern finden sich bei Arlt et al., 2003. Supersomes waren von Gentest Corp. Konzentrationsbestimmungen von Protein, Cytochrom P450 und Aktivitätsbestimmungen verschiedener Enzyme in den mikrosomalen Inkubationen wurden wie beschrieben durchgeführt (Arlt et al., 2003). Die mit Argon gesättigten Inkubationsmischungen bestanden aus 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4, 1 mM NADPH, 0,1-1 mg mikrosomales Protein, 0,3 mM 3-NBA in DMSO und 0,5 mg Kalbsthymus DNA. Inkubationen bei 37°C wurden durch Zugabe von 3-NBA gestartet und nach 2h beendet. Danach wurde die DNA wie beschrieben isoliert (Arlt et al., 2003).

### **2.2. Herstellung der Referenzverbindungen**

Desoxyadenosin- und Desoxyguanosin 3'-Monophosphat (4 µmol/ml) oder Kalbsthymus DNA wurden mit 3-NBA (300 µM) und Xanthin-Oxidase (1 U/ml) umgesetzt und 20 µl Aliquots der Inkubation direkt wie beschrieben (Arlt et al., 2003) mit der Butanol-Extraktions-Anreicherungsmethode des <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahrens untersucht.

### **2.3. <sup>32</sup>P-postlabeling und statistische Analysen**

<sup>32</sup>P-postlabeling und statistische Analysen wurden wie beschrieben durchgeführt (Arlt et al., 2003).

### **2.4. Co-Chromatographische Analyse von <sup>32</sup>P-markierten 3',5'-Desoxyribonukleosid-Bisphosphaten mit Dünnschicht-Chromatographie und HPLC**

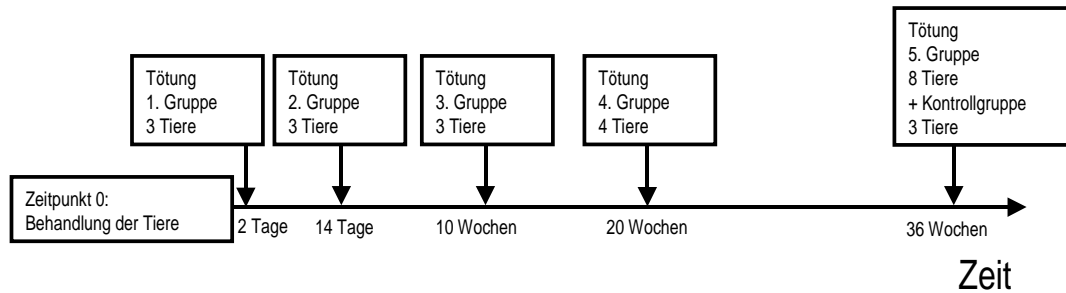
Die beim <sup>32</sup>P-postlabeling detektierten Addukt-Flecken wurden aus den TLC-Platten ausgeschnitten, extrahiert und mit den Referenz-Bisphosphat-Addukten wie beschrieben (ARLT et al., 2001) cochromatographiert. Die HPLC-Analysen wurden auch wie dort beschrieben durchgeführt.

### **2.5. Tierversuche**

Weibliche Sprague-Dawley Ratten (mittleres Gewicht ca. 350 g, sog. „Ex-Breeder“) wurden durch intratracheale Instillation mit einer Einzeldosis 3-NBA, 2 mg/kg oder 0,2 mg/kg

Körpergewicht behandelt. 3-NBA war in Tricaprylin (4 mg/ml bzw. 0,4 mg/ml) gelöst, die Tiere erhielten daher 150 µl bis 200 µl der 3-NBA-Lösung. Kontrolltiere erhielten nur entsprechende Mengen Tricaprylin. Die Tiere wurden nach angegebenem Schema behandelt und getötet, Blut entnommen, die Organe entfernt, sofort in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert und bis zur DNA-Isolierung bei -80°C tiefgefroren. DNA wurde mittels Qiagen-DNA Kit aus Gewebe bzw. mit Hilfe des Paxgene Blood DNA-Kits aus Blut isoliert.

#### Behandlungs-Schema für die intratracheale Instillation von Ratten mit 3-NBA



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Aktivierung von 3-NBA durch humane Mikrosomen

Wir untersuchten die Bildung von DNA-Addukten durch 3-NBA in Kalbsthymus DNA in Gegenwart von Mikrosomen, die aus acht verschiedenen humanen Lebern isoliert worden waren. Alle hepatischen humanen Mikrosomen waren fähig 3-NBA zur Bildung von DNA-Addukten zu aktivieren. Das Addukt-Muster bestand aus 4 Haupt-Addukt-Flecken (Flecken 1-4 in Abb.1), wenn mit der Anreicherung durch Butanol-Extraktion des  $^{32}$ P-postlabeling Verfahrens untersucht wurde, aus 3 Haupt-Addukt-Flecken (Flecken 1-3 in Abb.1) nach Anreicherung durch Nuklease P1-Verdau. Ähnliche Addukt-Muster wurden *in vivo* in Ratten beobachtet (Arlt et al., 2001). Im Gegensatz zu Inkubationen mit Rattenleber-Mikrosomen wurde ein zusätzlicher Addukt-Fleck (Fleck 7, Abb. 1D) in den Inkubationen mit humanen Mikrosomen entdeckt. Ein ähnlicher Addukt-Fleck war von uns zuvor in Inkubationen mit Kalbsthymus DNA und Aktivierung von 3-NBA durch Zink beobachtet worden (Bieler et al., 1999). Kontroll-Inkubationen zeigten keine solchen Addukt-Flecken. Cochromatographische Analysen durch HPLC bestätigten, dass die, durch humane Mikrosomen gebildeten Addukt-Flecken 1-4 nach Nitroreduktion von 3-NBA entstehen.

Daher ist klar, dass die eingesetzten Mikrosomen enzymatische Systeme enthalten, die die reduktive Aktivierung von 3-NBA katalysieren. Mögliche Kandidaten für diese reduktive Aktivierung sind NADPH:P450 Reduktase, NADH:Cytochrom  $b_5$  und P450 Enzyme. Um diese Möglichkeiten zu testen, wurde der Einfluss verschiedener Kofaktoren auf die DNA-Adduktbildung durch 3-NBA in humanen Mikrosomen ermittelt. Die Adduktbildung durch 3-NBA war eindeutig abhängig von NADPH, während NADH nur einen geringen Einfluss hatte. Dies deutet an, dass NADH:Cytochrom  $b_5$  einen schwachen, aber detektierbaren Effekt auf die 3-NBA-Aktivierung hat, dass aber NADPH:P450 Reduktase oder die P450 Enzyme für diese Aktivierung bedeutender sind (Arlt et al., 2003).

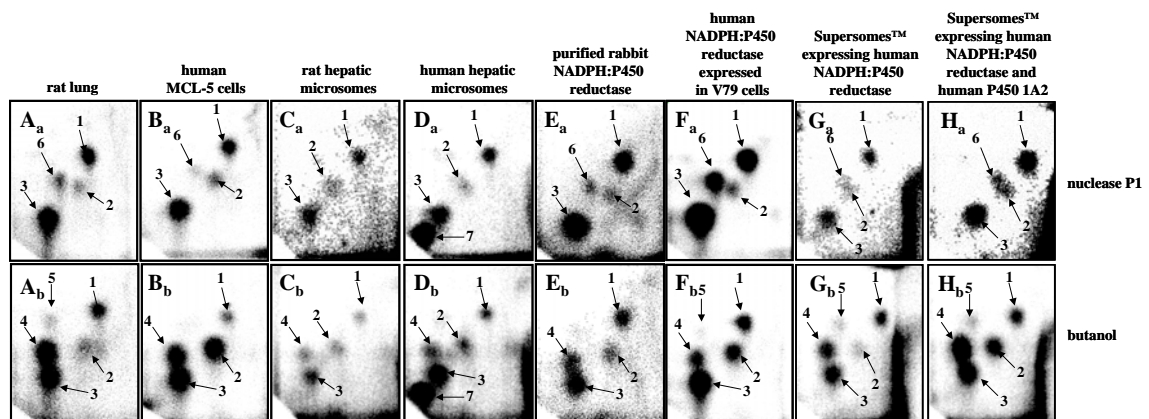


Abb.1.

Autoradiographische 3-NBA-DNA-Addukt Profile, erhalten aus Lungen-DNA von 3-NBA behandelten Ratten (2 mg/kg Körpergewicht) [diese Profile sind repräsentativ für andere Addukt Profile aus DNA von Ratten-Organen wie Leber, Niere, Milz, Herz und Darm (Arlt et al., 2003)] (A<sub>a</sub>, A<sub>b</sub>), von humanen MCL-5 Zellen behandelt mit 10  $\mu$ M 3-NBA (B<sub>a</sub>, B<sub>b</sub>), von Kalbsthymus DNA behandelt mit 3-NBA (300  $\mu$ M) nach Aktivierung durch hepatische Mikrosomen von der Ratte (C<sub>a</sub>, C<sub>b</sub>) oder durch humane hepatische Mikrosomen (D<sub>a</sub>, D<sub>b</sub>), von Kalbsthymus DNA behandelt mit 3-NBA (300  $\mu$ M) nach Aktivierung mit 100 pmol gereinigter Kaninchen NADPH:P450 Reduktase (E<sub>a</sub>, E<sub>b</sub>), mit V79MZ-hOR Zellen die humane rekombinante NADPH:P450 Reduktase exprimieren nach Exposition mit 0.1  $\mu$ M 3-NBA (F<sub>a</sub>, F<sub>b</sub>) und von Kalbsthymus DNA behandelt mit 3-NBA (300  $\mu$ M) nach Aktivierung mit Supersomes<sup>TM</sup>, die 25 pmol humane P450 1A2 (H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>) und

NADPH:P450 Reduktase oder NADPH:P450 Reduktase allein (control) (**G<sub>a</sub>**, **G<sub>b</sub>**) enthielten, Anreicherung durch Nuklease P1-Verdau (obere Reihe) oder Butanol-Extraktion (untere Reihe) des <sup>32</sup>P-postlabelling-Verfahrens.

Um abzuklären, welche mikrosomalen Enzyme hauptsächlich für die Aktivierung von 3-NBA verantwortlich sind, gingen wir folgendermaßen vor: 1. Korrelation von P450- und NADPH:P450 Reduktase-vermittelten Enzymaktivitäten mit der DNA-Adduktbildung durch 3-NBA in humanen hepatischen Mikrosomen, 2. selektive Enzym-Inhibierung in humanen Mikrosomen und 3. Verwendung von Mikrosomen (Supersomes), die durch heterologe Baculovirus Expressionssysteme humane P450s und NADPH:P450 Reduktase überexprimieren.

### **3.2. Korrelation der Enzymaktivitäten von P450-Cytochrom und NADPH:P450 Reduktase in humanen Mikrosomen mit der DNA-Adduktbildung durch 3-NBA**

Bekannte katalytische Aktivitäten, die mit bestimmten P450 Enzymen assoziiert sind (P450 1A1/2, -2A6, -2C9, -2D6, -2E1 und -3A4), wurden in allen acht humanen hepatischen Mikrosomen, bestimmt (Arlt et al., 2003). Die Enzym-Aktivität von NADPH:P450 Reduktase wurde ebenfalls bestimmt. Die Analysen ergaben große individuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen humanen Mikrosomen-Präparationen. Auch die quantitative <sup>32</sup>P-postlabeling Auswertung zeigte große individuelle Unterschiede für die DNA-Bindung durch 3-NBA (Bereich von 1.9 bis 31.8 und von 6.7 bis 53.8 Addukte pro 10<sup>8</sup> normale Nukleotide nach Anreicherung mit Nuklease P1-Verdau bzw. mit Butanol-Extraktion). Die Gesamt-DNA-Bindung durch 3-NBA war eindeutig mit der NADPH:P450 Reduktase Aktivität korreliert. Für die anderen untersuchten P450 Aktivitäten ergaben sich keine signifikanten Korrelationen mit der Bildung von 3-NBA-Addukten. Der Spezies-Vergleich zwischen humanen und Mikrosomen von der Ratte zeigt, dass beide eine ähnliche Effektivität zur Aktivierung von 3-NBA besitzen. Inkubationen von 3-NBA mit DNA und hepatischen Mikrosomen von Ratten, die mit NADPH:P450 Reduktase Induktoren (PCN, Pregnenolon-16- $\alpha$ -Carbonitril; PB, Phenobarbital) vorbehandelt waren, führten zu einem 4-fachen Anstieg der 3-NBA-DNA-Addukt-Spiegel. Inhibitionsexperimente mit  $\alpha$ -Liponsäure, einem selektiven Inhibitor der NADPH:P450 Reduktase, belegten die Bedeutung der NADPH:P450 Reduktase für die Aktivierung von 3-NBA in humanen hepatischen Mikrosomen. Ein 15facher molarer Überschuss an Inhibitor gegenüber 3-NBA drückte die DNA-Adduktbildung auf ca. 20% des Ausgangswertes.

### **3.3. DNA-Adduktbildung durch 3-NBA in V79 Zellen, die rekombinante humane NADPH:P450 Reduktase exprimieren**

Hierfür verwendeten wir eine V79 Zell-Linie (V79MZ-hOR), welche humane NADPH:P450 Reduktase exprimiert. Die Eltern-Zell-Linie (V79MZ) und V79MZ-hOR wurden mit 0.01  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M 3-NBA behandelt und auf DNA-Adduktbildung mit dem <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahren untersucht. Das beobachtete Addukt-Muster war ähnlich dem *in vivo* in Ratten und dem mit humanen Mikrosomen (Abb. 1 F). Im Vergleich mit der Eltern-Zell-Linie induzierte 3-NBA in V79MZ-hOR Zellen, abhängig von der verwendeten Anreicherungsmethode, einen 12-34fach höheren bzw. 45-78fach höheren Addukt-Spiegel. Auch korrelierte die 3-NBA-DNA-Adduktbildung mit der Zytotoxizität in den V79 Zellen (Arlt et al., 2003).

### **3.4. Aktivierung von 3-NBA durch rekombinante humane P450 Enzyme und NADPH:P450 Reduktase in Supersomes**

Obwohl die humane Leber reich an P450 Enzymen ist, sind einige spezielle P450s nur wenig exprimiert oder fehlen ganz (z.B. P450 1A1, 1B1, 2B6, 2D6). Deshalb haben wir in einem weiteren Testsystem den Einfluss dieser Enzyme auf die Aktivierung von 3-NBA gemessen. Hierfür verwendeten wir Supersomes, dies sind Mikrosomen aus Baculovirus-transfizierten Insektenzellen, welche rekombinant exprimierte humane P450 Enzyme enthalten. In allen Inkubationen mit Supersomes beobachteten wir DNA-Adduktbildung und zwar wieder die bekannten 3-NBA-Addukt-Muster. Die vergleichende Analyse ergab, dass besonders P450 2B6 und -2D6 die Aktivierung von 3-NBA katalysieren.

### **3.5. Analyse von DNA-Addukten in der Ratte**

Durch intratracheale Instillation wurden Ratten mit einer Einzeldosis 3-NBA behandelt, nach 48 Stunden getötet und Blut und Organe entnommen. DNA aus Blut und den Organen (Lunge, Pankreas, Niere, Dünndarm, Blase, Leber und Herz) wurde nach Anreicherung durch Butanol-Extraktion auf DNA-Addukte mit dem <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahren untersucht. Wie in Abb. 2 zu sehen, induziert 3-NBA 48 Stunden nach Behandlung in allen Organen der Ratte ähnliche DNA-Addukt-Muster, wie nach oraler oder intraperitonealer Applikation (Arlt et al., 2001; Arlt et al., 2002). In der DNA aus Organen von Ratten, die nur mit dem Lösungsmittel (Tricaprylin) behandelt waren, wurden keine DNA-Addukt-Flecken detektiert. Das spezifische DNA-Addukt-Muster bestand aus 5 Flecken, wovon die Flecken 1, 3 und 4 die Haupt-Addukte sind (Abb. 2). Wie zuvor gezeigt (Arlt et al., 2001; Arlt et al., 2002), stammen die Flecken 1 und 2 von Desoxyadenosin und die Flecken 3, 4 und 5 von Desoxyguanosin ab.

Wie Tabelle I zeigt, induzieren beide Dosierungen die höchste DNA-Bindung im Pankreas. Ferner wurden hohe 3-NBA-Addukt-Spiegel auch in der Lunge gefolgt von Niere, Harnblase, Herz, Dünndarm und Leber gefunden. Auf Grund der Bronchial-Verzweigung ist die Verteilung von intratracheal verabreichtem Material zwischen den beiden Lungenflügeln nicht gleichmäßig. Tatsächlich konnten wir einen 2-3fachen Unterschied in den Addukt-Spiegeln zwischen den Lungenflügeln feststellen. In der Niedrig-Dosis-Gruppe lag die Gesamt-DNA-Adduktierung zwischen 12 (Leber) und 39 (Lunge) bzw. 55 Addukte pro 10<sup>8</sup>Nukleotiden (Pankreas). Insgesamt ergab die 10fach höhere Dosis auch eine Zunahme der Gesamt-DNA-Adduktierung in den entsprechenden Organen um das 5-10fache (Tabelle I).

### **3.6. HPLC Analysen der 3-NBA-DNA-Addukt-Flecken aus der Ratte**

Um die Identität der in den Rattenorganen gefundenen DNA-Addukte zu bestätigen, wurde neben dem cochromatographischen Vergleich auf Dünnschicht-Platten auch ein cochromatographischer Vergleich mittels HPLC durchgeführt (Arlt et al., 2003). Dieser ergab, dass die Retentionszeiten der einzelnen Addukte identisch mit denen aus Standardverbindungen waren und bestätigte somit, dass es sich um die von Desoxyadenosin abgeleiteten Addukte (Flecken 1 und 2) und die von Desoxyguanosin abgeleiteten Addukte (Flecken 3, 4 und 5) handelt (Daten sind nicht gezeigt).



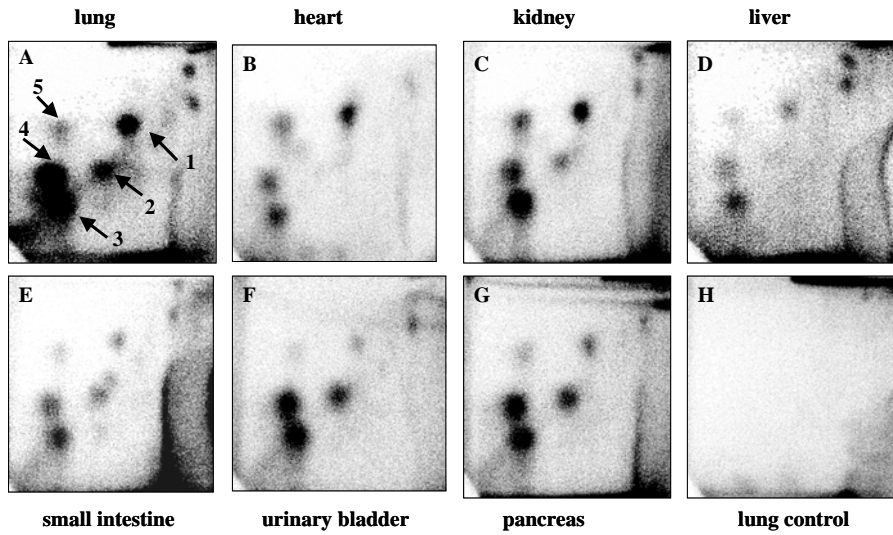


Abb.2. Autoradiographische DNA-Addukt Profile erhalten von Organen der Sprague-Dawley Ratte 48 Stunden nach intratrachealer Behandlung mit 3-NBA. Die Analysen wurden mit der Butanol-Extraktion Anreicherung des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Verfahrens durchgeführt. Die Autoradiogramme stellen beispielhaft die DNA-Verdau von Ratten, die mit 0,2 mg/kg Körpergewicht 3-NBA behandelt wurden, dar.

**TABELLE 1-** QUANTITATIVE ANALYSE DER DNA BINDING (RAL) IN VERSCHIEDENEN ORGANEN DER RATTE NACH INTRATRACHEALER INSTILLATION MIT 3-NBA

Dosis	Organ	Fleck 1	Fleck 2	Fleck 3	Fleck 4	Fleck 5	Gesamt RAL
<b>0.2 mg/kg KG</b>	Lungenflügel A	6.1 ± 2.0	4.2 ± 4.2	15.6 ± 10.4	9.4 ± 2.6	3.5 ± 1.2	38.7 ± 17.7
	Lungenflügel B	2.9 ± 1.8	1.7 ± 0.9	5.3 ± 2.5	2.6 ± 1.5	1.7 ± 1.5	14.2 ± 7.9
	Pankreas	11.3 ± 7.9	3.6 ± 1.3	21.0 ± 11.9	14.2 ± 9.7	5.4 ± 4.5	55.4 ± 33.9
	Niere	5.9 ± 1.7	3.4 ± 0.8	13.8 ± 0.4	7.5 ± 2.0	2.4 ± 0.3	33.0 ± 2.6
	Harnblase	4.1 ± 1.4	3.7 ± 1.5	12.3 ± 1.6	6.5 ± 3.3	1.3 ± 0.2	27.9 ± 4.9
	Herz	6.3 ± 2.6	2.4 ± 0.3	10.3 ± 1.3	4.9 ± 2.8	2.0 ± 0.5	26.0 ± 3.4
	Dünndarm	3.3 ± 1.0	2.0 ± 0.2	8.7 ± 0.7	3.8 ± 0.6	1.9 ± 0.6	19.2 ± 1.6
	Leber	1.7 ± 0.4	2.0 ± 0.5	5.9 ± 0.5	1.8 ± 0.6	0.8 ± 0.3	12.1 ± 1.6
	Blut	2.1 ± 1.0	2.5 ± 1.2	4.6 ± 2.0	1.8 ± 1.4	n.d.*	9.5 ± 1.9
<b>2 mg/kg KG</b>	Lungenflügel A	38.0 ± 6.2	41.0 ± 26.5	134.9 ± 48.9	118.5 ± 59.7	17.2 ± 2.4	349.6 ± 138.5
	Lungenflügel B	22.2 ± 0.6	26.5 ± 10.8	60.0 ± 18.0	57.9 ± 25.6	8.7 ± 2.7	175.3 ± 49.0
	Pankreas	82.6 ± 41.7	83.8 ± 48.6	271.6 ± 145.1	278.5 ± 201.2	39.8 ± 31.5	619.9 ± 372.2
	Niere	39.2 ± 9.1	38.0 ± 9.2	141.9 ± 29.2	114.8 ± 37.6	15.6 ± 5.5	334.8 ± 50.6
	Harnblase	26.2 ± 8.1	20.3 ± 6.9	84.4 ± 19.4	72.2 ± 19.5	12.2 ± 6.6	215.2 ± 56.4
	Herz	35.1 ± 16.7	25.6 ± 13.6	89.5 ± 41.3	53.6 ± 26.9	16.2 ± 7.5	220.0 ± 101.1
	Dünndarm	9.2 ± 2.7	12.9 ± 3.5	38.2 ± 2.7	34.1 ± 1.8	3.7 ± 0.6	98.1 ± 5.7
	Leber	5.0 ± 2.4	6.1 ± 3.8	28.8 ± 15.8	16.8 ± 8.4	2.5 ± 1.7	59.1 ± 31.1
	Blut	6.3 ± 3.5	10.6 ± 12.0	18.6 ± 11.9	5.2 ± 4.3	n.d.	41.2 ± 26.9

RAL (relative adduct labelling) Werte entsprechen Addukte per 10<sup>8</sup> Nukleotide.

Werte sind Mittelwerte ± SD von drei behandelten Ratten, jedes Organ wurde doppelt analysiert.

\* nicht detektiert

### 3.7. Analyse von DNA-Addukten aus Blut von intratracheal mit 3-NBA behandelten Ratten

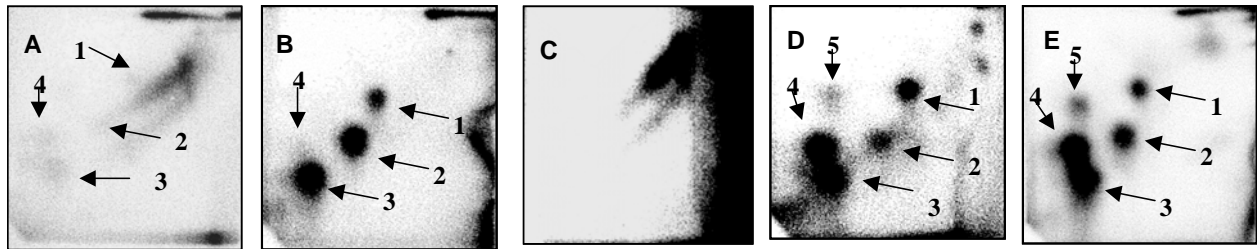


Abb.3. Autoradiographische DNA-Addukt Profile erhalten aus DNA der Sprague-Dawley Ratte nach intratrachealer Behandlung mit 3-NBA. Die Analysen wurden mit der Butanol-Extraktion Anreicherung des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Verfahrens durchgeführt. **A** Gesamtblut, 0,2 mg/kg Körpergewicht; **B** Gesamtblut, 2 mg/kg Körpergewicht; **C** Gesamtblut, Vehikel; **D** Lunge, 0,2 mg/kg Körpergewicht; **E** Lunge, 2 mg/kg Körpergewicht.

Die Addukt-Analyse von DNA aus Gesamtblut zeigte dasselbe 3-NBA spezifische Addukt-Muster wie jenes aus den Organen der behandelten Ratte (Abb. 3), außer dass der Fleck 5 nicht detektiert wurde. Die Kontrolle enthielt keine Addukt-Flecken im entsprechenden Gebiet (Abb. 3C). Wie aus Tabelle I zu ersehen, waren 48 Stunden nach intratrachealer Instillation von 3-NBA die Gesamt-DNA-Addukt-Spiegel im Blut nur 10 % (für die hohe Dosis) und 5 % (für die niedrige Dosis) gegenüber der Lunge, aber spezifische 3-NBA-DNA-Addukte waren eindeutig detektierbar und dosis-abhängig.

### 3.8. Persistenz der 3-NBA-DNA-Addukte in Organen von intratracheal mit 3-NBA behandelten Ratten

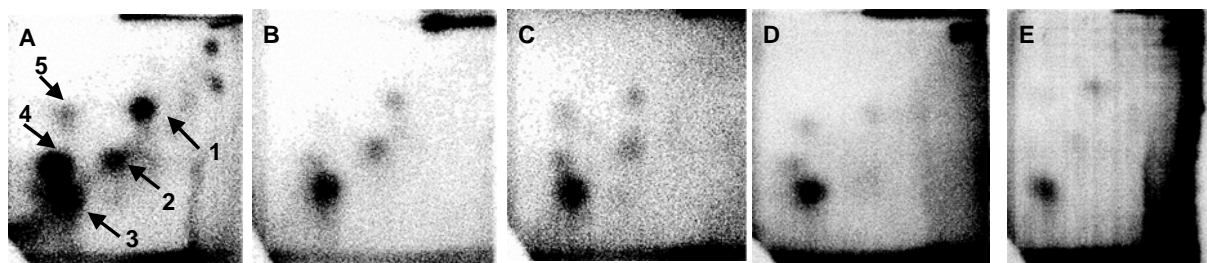


Abb. 4. Autoradiographische DNA-Addukt Profile erhalten aus Lungengewebe der Sprague-Dawley Ratte nach intratrachealer Behandlung mit 0,2 mg/kg Körpergewicht 3-NBA. Die Analysen wurden mit der Butanol-Extraktion Anreicherung des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Verfahrens durchgeführt. **A** 48 Stunden; **B** 14 Tage; **C** 70 Tage; **D** 140 Tage und **E** 252 Tage nach Behandlung. Die Expositionszeit betrug für A, B und C 15 Minuten, für D und E 30 Minuten.

Wie Abb. 4. verdeutlicht induzierte eine Einzeldosis von 0,2 mg/kg Körpergewicht 3-NBA intratracheal verabreicht in der Lunge nach 48 Stunden das bekannte DNA-Addukt-Muster bestehend aus 5 DNA-Addukt-Flecken. Der Gesamt-DNA-Addukt-Spiegel nahm über die Zeit ( $39 \pm 17$  nach 2 Tagen) ab und betrug nach 36 Wochen (252 Tagen) nur noch  $12 \pm 5$  Addukte pro  $10^8$  Nukleotide. Nach 36 Wochen war vor allem das Haupt-DNA-Addukt (Fleck 3) noch eindeutig nachweisbar (Abb. 4E). Ein ähnliches Verhalten wurde auch in den anderen untersuchten Organen festgestellt und ist in Abb. 5 und Abb. 6 dargestellt.

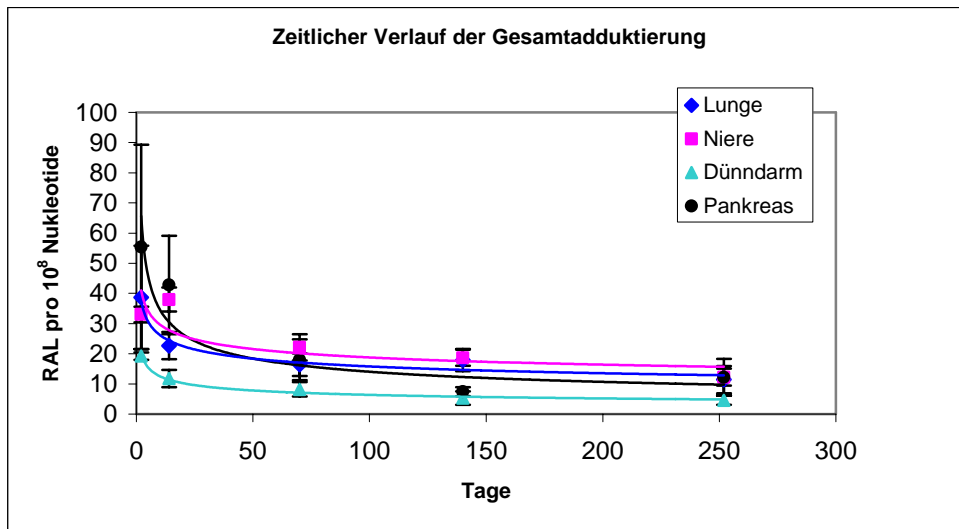


Abb. 5. Zeitlicher Verlauf der Gesamt-DNA-Addukt-Spiegel in Organen der Ratte nach einmaliger intratrachealer Instillation von 0,2 mg/kg Körpergewicht 3-NBA. RAL-Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens 3 Tieren jeweils doppelt mit der Butanol-Extraktion Anreicherung des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Verfahrens bestimmt.

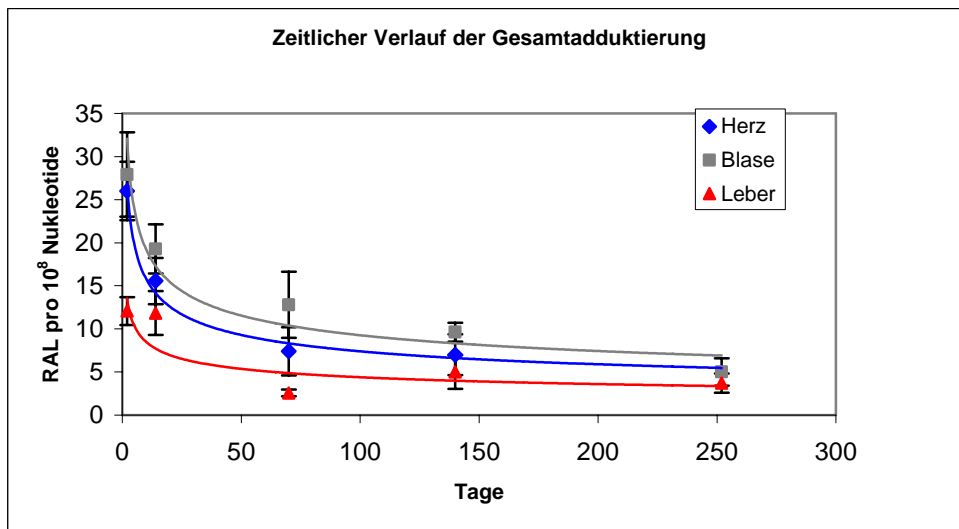


Abb. 6. Zeitlicher Verlauf der Gesamt-DNA-Addukt-Spiegel in Organen der Ratte nach einmaliger intratrachealer Instillation von 0,2 mg/kg Körpergewicht 3-NBA. RAL-Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens 3 Tieren jeweils doppelt mit der Butanol-Extraktion Anreicherung des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Verfahrens bestimmt.

In allen untersuchten Organen (Abb. 5 und 6) waren 36 Wochen nach Behandlung spezifische 3-NBA-DNA-Addukte detektierbar. Allerdings fallen die Adduktlevel in den meisten Organen nach einem steilen Abfall während der ersten 14 Tage auf 60-70 % des Ausgangswertes, dann langsamer bis 140 Tage und gehen dann nahezu in ein Plateau mit ca. 20-30 % des Ausgangswertes über. Die höchsten DNA-Adduktspiegel (11-12 Addukte pro  $10^8$  Nucleotide) bleiben nach 36 Wochen im Pankreas, der Lunge und in der Niere bestehen, die Organe, die auch die höchsten Gesamt-DNA-Addukt-Spiegel nach 48 Stunden hatten.

### 3.9. Persistenz der 3-NBA-DNA-Addukte im Blut von intratracheal mit 3-NBA behandelten Ratten

Auch in der DNA aus Gesamtblut von Ratten, die mit einer Einzeldosis von 0,2 mg/kg Körpergewicht 3-NBA instilliert wurden, waren 3-NBA-DNA-Addukte bis 140 Tage nach Verabreichung nachweisbar. Nach 140 Tagen war aber nur noch der DNA-Addukt-Fleck 3 eindeutig (Abb. 7C) zu erkennen und der RAL-Wert war  $6,6 \pm 3,4$  Addukte pro  $10^8$  Nukleotide.



Abb. 7. Autoradiographische DNA-Addukt Profile erhalten aus Blut-DNA der Sprague-Dawley Ratte nach intratrachealer Behandlung mit 0,2 mg/kg Körpergewicht 3-NBA. Die Analysen wurden mit der Butanol-Extraktion Anreicherung des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Verfahrens durchgeführt. **A** 48 Stunden; **B** 14 Tage; **C** 140 Tage und **D** 252 Tage nach Behandlung. Die Expositionszeit betrug für A 15 Minuten, B und C 30 Minuten und für D 120 Minuten.

36 Wochen nach Behandlung (Abb. 7D) waren keine 3-NBA spezifischen Addukt-Flecken mehr nachzuweisen. Auch die Blut-DNA-Addukt-Spiegel nahmen mit der Zeit ab, allerdings war die Abnahme nicht so stark wie in den meisten Organen und nach 140 Tagen war noch 70% des Ausgangs-Spiegels vorhanden ( $9,5 \pm 1,9$  Addukte pro  $10^8$  Nukleotide nach 48 Stunden und  $6,6 \pm 3,4$  Addukte pro  $10^8$  Nukleotide nach 140 Tagen).

## 4. Diskussion

Der erste Teil der vorliegenden Studie befasst sich mit der Identifizierung mikrosomaler Enzyme, welche an der Bioaktivierung von 3-NBA beteiligt sind.

Unsere früheren Arbeiten haben gezeigt, dass 3-NBA *in vitro* mit unterschiedlichen Aktivierungssystemen und *in vivo* in der Ratte nach oraler und intraperitonealer Gabe ein spezifisches DNA-Addukt Muster induziert (Bieler et al., 1999; Arlt et al., 2001; Arlt et al., 2003) und alle vier Haupt-Addukte (Addukte 1, 2, 3 und 4) durch einfache Reduktion der Nitrogruppe und Bindung an Desoxyadenosin (Addukte 1 und 2) oder an Desoxyguanosin (Addukte 3 und 4) entstehen (Abb. 8). Hier zeigen wir nun, dass verschiedene humane hepatische Mikrosomen befähigt sind, 3-NBA so zu aktivieren, dass diese prämutagenen DNA-Addukte entstehen. Zusätzlich wurde noch ein weiteres DNA-Addukt (Addukt 7) in Inkubationen mit humanen hepatischen Mikrosomen detektiert, dessen chemische Struktur allerdings bisher völlig unklar ist.

Die Bildung von 3-NBA-DNA-Addukten war in allen acht untersuchten humanen hepatischen Mikrosomen-Präparationen stark von der katalytischen Aktivität der NADPH:P450 Reduktase abhängig. Dieser Befund wurde durch die Hemmung der 3-NBA-DNA-Adduktbildung mit  $\alpha$ -Liponsäure, einem selektiven Inhibitor der NADPH:P450 Reduktase, in humanen hepatischen Mikrosomen bestätigt. Weitere Ergebnisse mit rekombinanter humaner NADPH:P450 Reduktase exprimiert in Supersomes und in Chinesischen Hamster Zellen der Lunge (V79) vervollständigten die Datenlage und weisen diesem Enzym eine Hauptrolle bei der Bioaktivierung von 3-NBA zu. Da NADPH:P450 Reduktase in humanen Epithel-Zellen

der Bronchien und alveolaren Makrophagen exprimiert wird, kann das Enzym wesentlich zur metabolischen Aktivierung des Luftschadstoffes 3-NBA im Menschen beitragen.

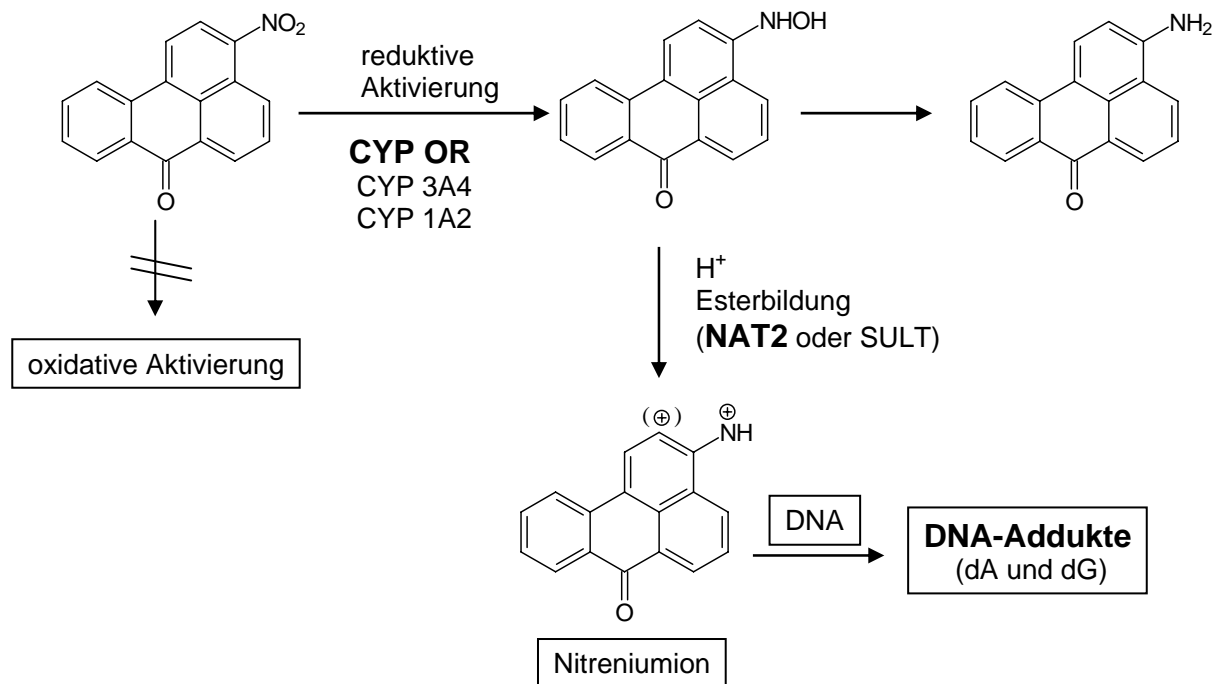


Abb. 8. Vorgeschlagener Mechanismus der DNA-Addukt-Bildung von 3-NBA *in vivo*  
CYP OR, NADPH:P450 Reduktase

Im Gegensatz zur NADPH:P450 Reduktase hatten alle humanen P450 Enzyme in den Lebermikrosomen keinen messbaren Effekt auf die 3-NBA-Adduktbildung. Allerdings waren einige rekombinante humane P450 Enzyme, die in Supersomes überexprimiert sind, wirksame Aktivator von 3-NBA. Diese Diskrepanz lässt sich durch die niedrige Expression von P450 2B6 oder P450 2D6 in humanen Lebern erklären, aber auch eine unterschiedliche Aktivität zwischen den rekombinanten und den authentischen humanen Enzymen ist möglich. Da die Aufnahme von 3-NBA beim Menschen hauptsächlich über den Atemtrakt erfolgt, kann den P450 Enzymen, trotz ihrer unbedeutenden Rolle in Lebermikrosomen, eine große Bedeutung für die 3-NBA-Aktivierung im Menschen zukommen. Obwohl der Gesamtgehalt an P450 in den Lungen gegenüber der Leber gering ist, können P450 Enzyme der Lunge bedingt durch die hohe Blutzirkulationsrate durch die Lungen und die direkte Exposition durch die Inhalation in hohem Maße zur extrahepatischen Bioaktivierung von 3-NBA beitragen.

Da 3-NBA hauptsächlich über den Atemtrakt aufgenommen wird, befasste sich der zweite Teil der vorliegenden Studie mit der Bestimmung der DNA-Addukt-Bildung von 3-NBA in Ratten nach intratrachealer Instillation in die Lunge. Ferner wurde untersucht, ob ein 3-NBA spezifisches DNA-Addukt-Muster im Blut der behandelten Tiere als Biomarker für Expositionen dienen könnte und wie stabil diese Addukte in einzelnen Organen und im Blut sind (DNA-Addukt-Persistenz).

Wir konnten durch die Anwendung des <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahrens zeigen, dass 3-NBA nach einmaliger intratrachealer Applikation in mehreren Organen der Ratte DNA-Addukt induziert. Das beobachtete Muster war dasselbe in allen Organen und qualitativ ähnlich denen aus *in vitro* (Bieler et al., 1999) und *in vivo* (Arlt et al., 2001; Arlt et al., 2003) Experimenten.

Auf Grund der Applikationsart wurden in der Lunge hohe DNA-Addukt-Spiegel gefunden, aber im Pankreas war die DNA-Addukt-Bildung noch höher und auch in den anderen Organen wurden DNA-Addukte gebildet, was darauf hin deutet, dass 3-NBA oder seine Metabolite über das Blut verteilt wird. Vergleicht man die DNA-Addukt-Bildung in Ratten, die auf verschiedene Weise mit einer Einzeldosis von 2 mg/kg Körpergewicht 3-NBA behandelt wurden, so findet man unabhängig von der Expositionsart in allen Organen dasselbe DNA-Addukt-Muster. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Godschalk et al. (2000) über die Addukt-Bildung durch Benzo(a)pyren überein. Ferner waren die 3-NBA-DNA-Addukt-Spiegel in der Lunge, der Niere, der Leber und im Pankreas 48 Stunden nach intratrachealer Gabe deutlich höher als 24 Stunden nach intraperitonealer Gabe oder 4 Stunden nach oraler Gabe. Dies zeigt, dass die Verabreichung von 3-NBA in die Lunge effektiver DNA-Addukte bildet als andere Applikationsarten und dies nicht nur im Zielorgan Lunge, sondern in den meisten Organen. Die höchsten DNA-Addukt-Spiegel durch 3-NBA wurden sowohl nach intraperitonealer Injektion als auch nach intratrachealer Instillation von Ratten im Pankreas gemessen. Dies geht einher mit einer hohen Aktivität von Nitroreduktase im Pankreas und der Annahme, dass Nitroaromaten mögliche Risikofaktoren für Pankreas-Krebs darstellen (Anderson et al., 1997). Durch die Verwendung zweier unabhängiger Chromatographie-Systeme konnten wir beweisen, dass die Addukte 1 und 2 durch Reaktion mit Desoxyadenosin und die Addukte 3, 4 und 5 durch Reaktion mit Desoxyguanosin entstehen (Abb. 8), obwohl die exakten Strukturen dieser DNA-Addukte noch zu bestimmen sind. Diese Reaktivität von Nitro-PAK gegenüber den Purinen ist bekannt und wurde in anderen *in vivo* Studien bestätigt (FU et al 1991). Da wir keinen Hinweis auf eine Ringoxidation im aktivierenden Metabolismus des 3-NBA fanden, gehen wir davon aus, dass die Nitroreduktion primär für die Addukt-Bildung *in vivo* in der Ratte verantwortlich ist (Abb. 8). Allerdings kann die Bildung reaktiver Ester, wie *N*-Acetoxy- oder *N*-sulfonyloxyester, nach erfolgter Nitroreduktion für den *in vivo* Metabolismus des 3-NBA nicht ausgeschlossen werden.

Interessant ist auch, dass die relative 3-NBA-DNA-Addukt-Verteilung in allen untersuchten Organen nahezu identisch ist, was den Schluss zulässt, dass in allen Geweben dieselbe reaktive Spezies, die zur Addukt-Bildung führt, vorhanden ist. Es liegt nahe, dass es sich hierbei um das Nitreniumion, (Abb. 8) welches aus dem Hydroxylamin entsteht, handelt.

Nach intratrachealer Behandlung von Ratten mit 3-NBA beobachteten wir einen Zusammenhang zwischen den DNA-Addukten im Blut und in der Lunge. Jedoch waren die DNA-Addukt-Spiegel im Blut deutlich niedriger als im Lungengewebe, was dazu führen kann, dass bei niedrigen 3-NBA-Expositionen die DNA-Addukte im Blut unterhalb der Detektionsgrenze liegen, während sie in der Lunge noch detektierbar sind. Von anderen umweltrelevanten Carcinogenen wurde berichtet (Qu und Stacey 1996; Ross et al., 1990), dass auch hier eine eindeutige Korrelation der Gesamt-DNA-Addukt-Spiegel zwischen Lunge und Lymphozyten besteht. 140 Tage nach Behandlung mit einer einmaligen Dosis gelang mit der <sup>32</sup>P-postlabeling Methode der Nachweis eines 3-NBA spezifischen DNA-Adduktes (Fleck 3) im Blut von Ratten. Da 3-NBA vor allem im Dieselabgas vorkommt ist solch eine analytische Methode, die in der Lage ist in biologischen Proben spezifisch Expositionen gegenüber 3-NBA zu messen, besonders geeignet um die Belastung der Bevölkerung durch Dieselabgas zu bestimmen. Aus der Literatur ist bekannt (Qu and Stacey 1996; Ross et al., 1990), dass nach einmaliger Applikation von Benzo(a)pyren an Ratten Addukte in Lymphozyten-DNA noch nach 56 Tagen mit dem <sup>32</sup>P-postlabeling detektierbar waren. Längere Addukt-Persistenzen in Blutzellen wurden bisher nicht berichtet.

In allen untersuchten Organen waren die von 3-NBA induzierten DNA-Addukte persistent bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 252 Tagen (36 Wochen). In den Organen, die den

höchsten Ausgangswert an DNA-Addukten hatten, waren die DNA-Addukt-Spiegel auch nach 36 Wochen am höchsten. Während die erste Phase der DNA-Addukt-Kinetik (steiler Abfall der DNA-Addukt-Spiegel) der Wirkung der DNA Reparatur zugeschrieben wird, ist nicht geklärt warum ein Teil des Schadens oft über Jahre persistiert. Diese Eigenschaft einzelner Carcinogen-DNA-Addukte erlaubt es jedoch Expositionen gegenüber genotoxischen Schadstoffen noch Jahre später über DNA-Adduktbestimmungen nachzuweisen und ist somit ein wichtiger Vorteil für die Anwendung von DNA-Addukten als Biomarker der Exposition im humanen Biomonitoring.

Obwohl die Präsenz von DNA-Addukten eine notwendige aber keine ausreichende Bedingung für die Tumorentstehung ist, korrelieren die DNA-Addukt-Spiegel im Tierversuch zumeist mit der Krebsanfälligkeit der einzelnen Organe (Schulte und Talaska, 1995). Eine relative Resistenz eines bestimmten Gewebes gegenüber der Carcinogenese geht daher oft einher mit einer verminderten DNA-Addukt-Bildung oder einer niedrigen Persistenz einzelner Addukte. Obwohl spezifische Carcinogen-DNA-Addukte Mutationen dosisabhängig induzieren, ist heute die Frage noch ungeklärt, ob die Höhe der DNA-Addukt-Bildung, die Persistenz der Addukte oder vielleicht die über die Zeit integrierten Gesamt-DNA-Addukt-Spiegel die besten Indikatoren zur Vorhersage eines Krebsrisikos sind.

Zusammengefasst zeigen unsere bisherigen Untersuchungen, dass der ubiquitäre Umweltschadstoff 3-NBA *in vivo* in der Ratte ein hohes genotoxisches Potential besitzt. Verantwortlich für diese Genotoxizität ist eine effektive metabolische Aktivierung, die zu hohen 3-NBA-spezifischen DNA-Adduktspiegeln in den Organen und im Blut der Ratte führt. Beim Menschen tragen die NADPH:Cytochrom P450 Reduktase und die *N,O*-Acetyltransferase 2 hauptsächlich zu dieser Aktivierung bei. Die von 3-NBA gebildeten DNA-Addukte konnten partiell identifiziert werden und zeichnen sich durch eine lebenslange Persistenz im Gewebe aus. Auch die in Blut-DNA detektierten DNA-Addukte sind noch 20 Wochen nach der Exposition nachweisbar und korrelieren mit den DNA-Addukt-Spiegeln im Zielorgan Lunge. Diese Ergebnisse können die Grundlage für ein Biomonitoring von 3-NBA beim Menschen bilden und lassen vermuten, dass 3-NBA auch für den Menschen ein genotoxisches Potential besitzt. Durch die alltägliche Belastung mit 3-NBA über Dieselabgase und Luftstaub stellt 3-NBA daher für einen Großteil der Bevölkerung eine Gesundheitsgefährdung dar.

## 5. Literatur

- ADACHI, S, Kawanura K, Takemoto K, Suzuki H, Hisamatsu Y. (2000): Carcinogenicity of 3-nitrobenzantrone, a potent mutagen in diesel exhaust – preliminary results in F344 rats after intratracheal administration. In: Heinrich U, Mohr U, editors. Relationships between respiratory disease and exposure to air pollution. Washington, DC: ILSI Press; p. 315-319
- ANDERSON, K.E, Hammons GJ, Kadlubar FF, Potter JD, Kaderlik KR, Ilett KF, Minchin RF, Teitel CH, Chou HC, Martin MV, Guengerich PF, Barone GW, Lang NP, Peterson LA (1997): Metabolic activation of aromatic amines by human pancreas. *Carcinogenesis* **18**:1085-1092.
- ARLT, V.M, BIELER, C.A, MIER, W., WIESSLER, M., SCHMEISER, H.H. (2001): DNA adduct formation by the ubiquitous environmental contaminant 3-nitrobenzantrone in rats determined by <sup>32</sup>P-postlabeling. *Int J Cancer* **93**, 450-454.
- ARLT, V.M., GLATT, H., MUCKEL, E., PABEL, U., SORG, B:L:, SCHMEISER, H.H., PHILLIPS, D.H. (2002): Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzantrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. *Carcinogenesis* **23**, 1937-1945.
- ARLT, V.M., Sorg BL, Osborne M, Hewer A, Seidel A, Schmeiser HH, Phillips DH. (2003): DNA adduct formation by the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzantrone and its metabolites in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* **300**:107-114.



- ARLT, V.M., Stiborova M., Hewer A., Schmeiser HH., Phillips DH (2003): Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: Evidence for reductive activation by human NADPH:cytochrome P450 reductase. *Cancer Res.* **63**, 2752-2761.
- ARLT, V.M., Zhan L, Schmeiser HH, Honma M, Hayashi M, Phillips DH, Suzuki T (2004): DNA adducts and mutagenic specificity of the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone in Muta Mouse. *Environ Mol Mutagen* **43**:186-195.
- BIELER, C.A., WIEBLER, M., ERDINGER, L., SUZUKI, H., ENYA, T. AND SCHMEISER, H.H. (1999): DNA adduct formation from the mutagenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Mutation Res.* **439**, 307-311.
- BRÜSKE-HOHLFELD, I, Möhner M, Ahrens W, Pohlabeln H, Heinrich J, Kreuzer M, Jöckel KH, Eichmann HE. (1999): Lung cancer risk in male workers occupationally exposed to diesel motor emissions in Germany. *Am J Ind Med.* **36**:405-414.
- BOFFETTA, P, Dosemeci M, Gridley G, Bath H, Moradi T, Silverman D. (2001): Occupational exposure to diesel engine emissions and risk of cancer in Swedish men and women. *Cancer Causes Control*, **12**:365-374
- BORLAK, J, Hansen T, Yuan Z, Sikka HC, Kumar S, Schmidbauer S, Frank H, Jacob J, Seidel A. (2000): Metabolism and DNA-binding of 3-nitrobenzanthrone in primary rat alveolar type II cells, in human fetal bronchial, rat epithelial and mesenchymal cell lines. *Polycyclic Aromat Compounds*; **21**:73-86.
- DRISCOLL, KE, Costa DL, Htch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB. (2000): Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol Sci* **55**:24-35.
- ENYA, T., SUZUKI, H., WATANABE, T., HIRAYAMA, T. & HISAMATSU, Y. (1997): 3-Nitro-benzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 2772-2776.
- EPA U.S. Environmental Protection Agency. Health Assessment Document for Diesel Engine Exhaust, EPA/600/8-90/057F, 2002.
- FU, P.P, Miller DW, VON TUNGELN, LS, BRYANT, MS, LAY, Jr. JO, HUANG, K, JONES, L, EVANS, FE. (1991): Formation of C8-modified deoxyguanosine and C8-modified deoxyadenosine as major DNA adducts from 2-nitropyrene metabolism mediated by rat and mouse liver microsomes and cytosols. *Carcinogenesis* **12**, 609-616.
- GODSCHALK, R.W.L., Moonen EJC, Schilderman PAEL, Broekmans WMR, Kleinjans JCS, van Schooten FJ. (2000): Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* **21**:87-92.
- IARC. Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, No. 46, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1989.
- LAMY, E, Kassie F, Gminski R, Schmeiser HH, Mersch-Sundermann V. (2003): 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2 cells) cells. *Toxicol Lett.* **146**:103-109.
- MURAHASHI, T, Watanabe T, Otake S, Hattori Y, Takamura T, Wakabayashi K, Hirayama T (2003): Determination of 3-nitrobenzanthrone in surface soil by normal-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **992**, 101-107.
- MURAHASHI, T, Iwanaga E, Watanabe T, Hirayama T. (2003): Determination of the mutagen 3-nitrobenzanthrone in rainwater collected in Kyoto. Japan. *J Health Sci.* **49**:386-390.
- NIELSEN, P.S., de Pater N, Okkels, H, Autrup H. (1996): Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers – effect of GSTM1 and NAT2 genotypes on adduct levels. *Carcinogenesis* **17**:1021-1027.
- PALLI, D, Russo A, Masala G, Saieva C, Guarrera S, Carturan S, Munnia A, Matullo G, Peluso M. (2001): DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. *Int J Cancer*; **94**:121-127.
- PERERA, F.P. (1990): Molecular epidemiology: a new tool in assessing risks of environmental carcinogens. *CA Cancer J Cli*; **40**: 277-288
- PHOUSONGPHOUNG, P.T, GROSOVSKY, A.J, EASTMOND, D.A, COVARRUBIAS, M, AREY, J.(2000): The genotoxicity of 3-nitrobenzanthrone and the nitropyrene lactones in human lymphoblasts. *Mutat Res.* **472**, 93-103.
- POIRIER, M.C., Santella RM, Weston A. (2000): Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis* **21**:353-359.
- PUROHIT, V.& BASU, A.K.(2000): Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chem Res Toxicol.* **13**, 673-692.

- QU, S-X., Stacey, N.H. (1996): Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues after multiple administration of benzo(a)pyrene. *Carcinogenesis* **17**, 53-59.
- ROSS, J., Nelson, G., Kligerman, A., Erexson, G., Bryant, M., Earley, K., Gupta, R., Nesnow, S.(1990): Formation and persistence of novel benzo(a)pyrene adducts in rat lung, liver, and peripheral blood lymphocyte DNA. *Cancer Res.* **50**, 5088-5094.
- SCHULTE, P.A. and Talaska, G. (1995): Validity criteria for the use of biological markers of exposure to chemical agents in environmental epidemiology. *Toxicology* **101**, 73-88.
- SEIDEL, A., DAHMANN, D., KREKELER, H., JACOB, J. (2002): Biomonitoring of polycyclic aromatic compounds in the urine of mining workers occupationally exposed to diesel exhaust. *Int. J. Hyg. Environ Health*, **204**, 333-338.
- TOKIWA, H., SERA, N., HORIKAWA, K., NAKANISHI, Y., SHIGEMATU, N. (1993): The presence of mutagens/carcinogens in the excised lung and analysis of lung cancer induction. *Carcinogenesis* **14**, 1933-1938.