

Dosis-Wirkungs-Beziehungen in der chemischen Kanzerogenese

W. K. Lutz

Institut für Toxikologie, ETH und Universität Zürich

Problemstellung

Die Dosierungen, mit denen chemische Substanzen auf eine mögliche krebserzeugende Wirkung im Tierversuch untersucht werden, liegen in der Regel in einem Bereich, der mehrere Größenordnungen über den üblichen Belastungen des Menschen liegt. Während z. B. beim Saccharin Gramm-Mengen pro kg Körpergewicht pro Tag für einen signifikanten Effekt im Tierversuch notwendig waren, liegt die Belastung des Menschen im Milligrammbereich. Beim sehr viel gefährlicheren Aflatoxin B₁ genügen bereits Dosierungen im Mikrogramm-Bereich im Tierversuch für eine Erfassung; hier sind die Belastungen in Europa aber wiederum um etwa einen Faktor Tausend tiefer. Für eine Risikoabschätzung beim Menschen ergibt sich damit zwangsläufig das Problem der Dosis-Extrapolation. Häufig wird die Frage nach einer unschädlichen Dosis gestellt in der Hoffnung, daß eine echte Schwelle besteht, unterhalb welcher das Kanzerogen keinen Effekt mehr hat. Andererseits wird bei der Gruppe der genotoxischen Kanzerogene eine Proportionalität zwischen Dosis und Risiko postuliert und nur noch von einer „praktisch unschädlichen Dosis“ gesprochen. Dies wäre diejenige Dosis, die bei lebenslanger Exposition die Tumorzinzidenz um einen Fall pro Million Exponierte erhöhen würde.

Lösungsansätze

Früher wurden oft mathematische Funktionen in die vorhandenen Daten über Tumorzinzidenzen aus dem Hochdosisbereich eingepaßt und nach kleinen Dosen extrapoliert. Heute überwiegt die Einsicht, daß die Mechanismen, die im hohen Dosisbereich die Dosis-Wirkungs-Beziehung dominieren, im tiefen Dosisbereich nicht entscheidend sein können. Deshalb wird heute zunächst einmal vom tiefsten gesicherten Datenpunkt aus linear zur Spontanumorzinzidenz extrapoliert. Daneben wird vermehrt darauf hingearbeitet, charakteristische Veränderungen in der Zielzelle, die den Prozeß der Kanzerogenese begleiten, mittels biochemisch/molekularbiologisch/zellbiologischer Untersuchungen in tiefere Dosisbereiche zu verfolgen.

Auf der biochemischen Seite steht die Schädigung der Erbsubstanz DNA, die Genotoxizität, im Vordergrund. Falls ein DNA-Schaden nicht rechtzeitig repariert

wird, kann bei einer DNA-Replikation eine Mutation entstehen. Falls dies in einem für die Kanzerogenese bedeutsamen Gen geschieht, hat die Zelle bereits einen Schritt in Richtung maligne Transformation überwunden.

Auf dem molekularbiologisch/zellbiologischen Sektor wird heute intensiv die Aktivierung von Onkogenen bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen untersucht. Der Name dieser Gene stammt zwar aus der Krebsforschung, doch nimmt man heute an, daß diese Gene von physiologischer Bedeutung in der Regulation der Zellteilung und -differenzierung im Verlaufe der normalen Entwicklung sind. Die entsprechende Genregulation ist nicht von Mutationen abhängig, sondern bedient sich der konstitutiven Möglichkeiten (DNA-Methylierung, Rekombinationen). Deshalb werden diese Prozesse oft auch als epigenetisch bezeichnet.

Die oben erwähnten strukturellen oder funktionellen Veränderungen des Erbgutes durch Kanzerogene sind meist noch in einem Dosisbereich erfaßbar, wo die Tumorbildung nicht mehr signifikant erhöht ist. Die dabei beobachteten oder postulierten Dosis-Wirkungs-Kurven sollen im folgenden diskutiert werden.

Dosis-Wirkungs-Beziehung für die DNA-Bindung

Viele bekannte chemische Kanzerogene werden im Verlaufe des Stoffwechsels zu reaktiven (meist elektrophilen) Zwischenprodukten aktiviert, von denen ein kleiner Teil noch vor einer Detoxifizierung chemisch (kovalent) mit der Erbsubstanz reagiert. Zu diesen Kanzerogenen gehören unter vielen anderen die Gruppen der aromatischen Amine (Beispiel: Benzidin), der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (Benzopyren) und der N-Nitroso-N-alkyl-Verbindungen (Dimethylnitrosamin). Die meisten der durch die Reaktion mit DNA-Nukleotiden entstandenen sog. Kanzerogen-DNA-Addukte können zwar repariert werden, führen aber zu Fehlern im Tochterstrang (Mutationen), wenn die DNA repliziert wird, bevor die Reparatur abgeschlossen ist. Falls kritische Gene betroffen sind, kann dies einen Schritt hin zur Krebszelle bedeuten.

Dank außerordentlich empfindlicher Nachweismethoden mit Hilfe von radioaktiven Markern ist die Bildung von Addukten in einem sehr tiefen Dosisbereich noch nachweisbar (Beispiel: Aflatoxin B₁: Nachweisgrenze in der Leber-DNA bei 1 ng/kg Ratte). Damit ergibt sich die Möglichkeit, einen frühen, wichtigen Aspekt der Kanzerogenese im Extrapolationsbereich zu untersuchen.

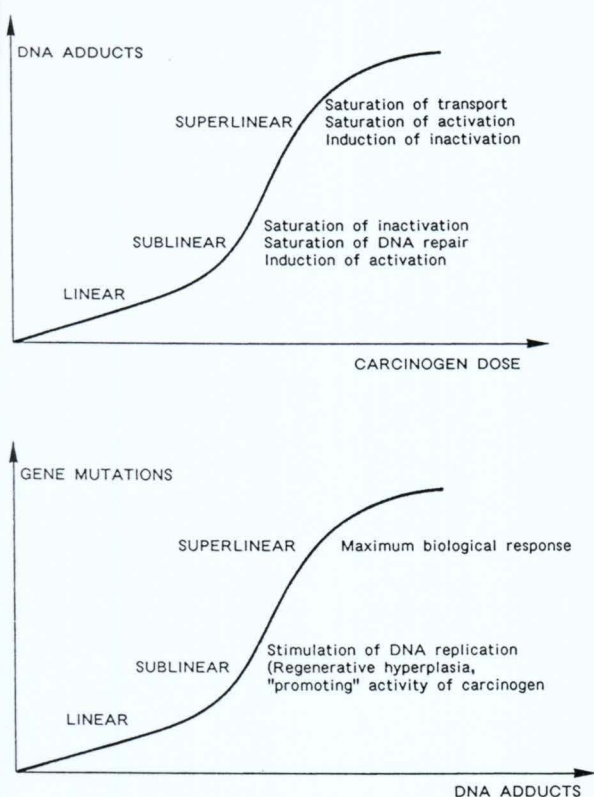


Abb. 1 Schematischer Dosis-Wirkungs-Verlauf in einer Einzelzelle für die Beziehung zwischen Kanzerogendosis und DNA-Adduktbildung (oben) und zwischen DNA-Addukten und Mutationen (unten)

Aus reaktionskinetischer Sicht sollte die Bildung von Addukten im tiefsten Dosisbereich proportional zur applizierten Dosis sein, wenn alle Konzentrationen weit unter der Michaeliskonzentration der beteiligten enzymatischen Reaktionen liegen. Die experimentelle Evidenz unterstützt diese Annahme. Bei einer weiteren Steigerung der Dosis hingegen werden häufig nichtlineare Dosis-Wirkungs-Beziehungen gefunden (Abb. 1 oben). Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß entweder die aktivierenden Enzymsysteme induziert werden (Beispiel: Benzpyren) oder daß die detoxifizierenden Enzymsysteme bzw. die DNA-Reparatur gesättigt werden (Formaldehyd bzw. Reparatur von O^6 -Methylguanin bei methylierenden Kanzerogenen). Eine solche Nichtlinearität hat zur Folge, daß bei einer Verkleinerung der Dosis das Risiko schneller abfällt, als aus der üblichen linearen Extrapolation abgeleitet würde.

Endogener DNA-Schaden – Spontantumore

DNA-Schäden entstehen nicht erst bei der Einnahme von genotoxischen Kanzerogenen, sondern sind z. T. auch eine Folge normaler Abläufe im Stoffwechsel. Drei Aspekte dieser unvermeidlichen Genotoxizität seien hervorgehoben:

Bei den elektrophilen Substanzen seien erwähnt das S-Adenosylmethionin als Beispiel einer methylierenden Substanz, Aldehyde (Formaldehyd, Zucker, die mit

Aminogruppen von DNA und Proteinen reagieren können) sowie verschiedene Epoxide, die beispielsweise als Zwischenprodukte beim Steroidabbau gebildet werden können.

Unter dem Begriff „Sauerstoffradikale“ sei die Reaktionskette $O_2 \rightarrow$ Superoxidradikal \rightarrow Wasserstoffperoxid \rightarrow Hydroxylradikal erwähnt, die bei der Verwendung von Sauerstoff durch die Zelle als Seitenreaktion abläuft. Zwar entwickelten sich in der Evolution effiziente Schutzmechanismen, welche die Bildung des äußerst reaktiven Hydroxylradikals verhindern sollen, doch kann die Konzentration des gefährlichen Radikals aus reaktionskinetischen Überlegungen nie Null sein. Eine Restkonzentration gehört deshalb untrennbar zum Leben von Aerobiern und führt zu einer ständigen oxidativen Schädigung der DNA. Abschätzungen ergeben, daß beim Menschen pro Zelle und pro Tag einige hundert Nukleotide oxidiert werden.

Schließlich ist die DNA als Molekül nicht absolut stabil: Pro Zelle und pro Tag spalten sich etwa 20.000 Purinbasen ab und werden 10–200 Desaminierungen von Adenin und Cytosin erwartet.

Diese unvermeidlichen DNA-Schäden bilden wahrscheinlich die mechanistische Basis für die Bildung von sog. „Spontantumoren“. Eine Extrapolation der Dosis-Wirkungs-Kurve für ein genotoxisches Kanzerogen nach Dosis Null führt deshalb nicht zum DNA-Schaden Null, sondern endet bei einem endlichen Wert. Dieser endogene DNA-Schaden wird nicht bei allen Individuen gleich hoch sein, sondern um einen Mittelwert mit einer gewissen Streuung schwanken. Mit dieser Argumentation ließe sich auch die Diskussion um die praktisch unschädliche Dosis neu führen. Es könnte diejenige Dosis des genotoxischen Fremdstoffes definiert werden, die zu einer Verdoppelung des endogenen DNA-Schadens führt bzw. die zu einer Zunahme um eine Standardabweichung innerhalb einer Population führt.

Vom DNA-Schaden zur Mutation

Die Bildung von DNA-Addukten ist ein sehr frühes Ereignis in der chemischen Kanzerogenese. Sie ist nur unter gewissen Voraussetzungen für die maligne Transformation einer Zelle von Bedeutung: Das Addukt muß bei der DNA-Replikation noch vorhanden sein, es muß zu einem Fehler im Tochterstrang führen, und der Fehler muß in einem Gen lokalisiert sein, das für die Ausprägung von Krebszellen (Regulation der Zellteilung, metastasierende Eigenschaften) von Bedeutung ist. Die erste Bedingung zeigt klar den Wettlauf von DNA-Reparatur und Zellteilungsaktivität. Jede Beschleunigung der Zellteilung verkürzt die der Reparatur zur Verfügung stehende Zeit und erhöht die Wahrscheinlichkeit von Mutationen.

Hohe Dosen von genotoxischen Kanzerogenen sind immer auch zytotoxisch, weil die Zellen eine hohe Belastung mit DNA-(und Protein-)Addukten nicht überleben. Eine dem Zelltod folgende regenerative Hyperplasie könnte sich nun in einer beschleunigten Akkumulation von kritischen Mutationen in den noch teilungsfähigen Zellen äußern. Ausgedrückt als Dosis-Wirkungs-Verlauf bedeutet dies, daß auf der Dosis-Wirkungs-Beziehung für die DNA-Addukte eine Modulation aufgelagert ist, die nur im hohen Dosisbereich ak-

tiv ist. Daraus ergibt sich ein Dosis-Wirkungs-Verlauf, der linear ist, solange die DNA-Addukte noch keine Zellen töten. Der Verlauf wird sublinear, sobald die Zellteilung induziert wird (Abb. 1 unten).

Stimulation der Zellteilung ohne DNA-Schaden

Viele Substanzen, die im Tierversuch die Tumorzinzidenz erhöhen, reagieren nicht mit DNA (TCDD, Ethinylestradiol, Hexachlorcyclohexan, Clofibrat, Di-(2-äthylhexyl)phthalat, Saccharin). Als gemeinsame Wirkung dieser Kanzerogene kommt u. a. eine Stimulation der Zellteilung im Zielorgan in Frage. Wir haben oben gesehen, daß dies die Akkumulation von Mutationen (ausgelöst durch endogene DNA-Schäden) beschleunigen kann, und die Frage stellt sich nun nach der allgemeinen Form der Dosis-Wirkungs-Kurve für diesen Mechanismus.

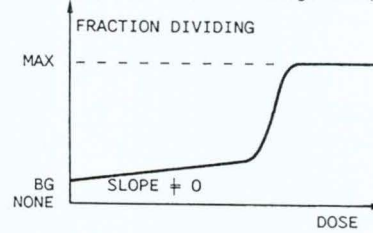
Hier gelten grundsätzlich andere Überlegungen als bei der Bildung von DNA-Addukten. Die Frage, ob eine Zelle sich teilt oder nicht, wird durch ja/nein beantwortet. Es ist ein Schaltprozeß mit einer echten Schwelle, unterhalb derer sich die Zelle nicht mehr teilt. In vivo haben wir es aber nicht mit einer einzelnen Zelle zu tun, sondern mit einer Zellpopulation, in der jede Zelle ihre eigene Schwelle haben wird. Weiter können wir davon ausgehen, daß einzelne Zellen aufgrund endogener Prozesse auch bei Dosis Null des Fremdstoffes in Teilung gehen. Damit ergibt sich das in Abb. 2 gezeigte Bild. Falls der Fremdstoff kompetitiv mit den endogenen Prozessen wirkt, werden auch bei tiefsten Dosen einige zusätzliche Zellen in Teilung geschickt. Es kann also dann nicht mit einer echten Schwelle gerechnet werden, wenn der Fremdstoff kompetitiv mit endogenen Prozessen die Zellteilung stimuliert (Abb. 2 oben). In einem höheren Dosisbereich kann dann die Fremdstoffbestimmung bestimmend werden für die Anzahl Zellen in Teilung, während sich bei sehr hohen Dosen eine Sättigung abzeichnet, wo das System nicht noch mehr reagieren kann.

Anders ist die Lage, wenn die Stimulation der Zellteilung über einen Prozeß ohne endogene Basis führt. Ein Beispiel wäre die Situation, wo hohe Konzentrationen eines Stoffes zu Kristallbildung z. B. in den ableitenden Harnwegen führen. Eine mechanische Verletzung des Epithels wird über eine Stimulation der Zellteilung regeneriert. Hier ist unterhalb der Löslichkeitsgrenze nicht mit Kristallbildung zu rechnen und damit auch nicht mit einer Stimulation der Zellteilung. Eine echte Schwelle in der Dosis-Wirkungs-Beziehung dürfte hier postuliert werden (Abb. 2 unten).

Kanzerogenese als Mehrstufenprozeß

Der Prozeß, der zur bösartigen Transformation einer gesunden Stammzelle führt, benötigt mehrere Schritte. Die Altersabhängigkeit vieler Tumorerkrankungen beim Menschen verläuft exponentiell mit dem Alter und zeigt im Mittel über die wichtigsten Zielorgane einen Exponenten von 4–6. Dies könnte als Anzahl unabhängiger Schritte interpretiert werden, die für eine Krebsentstehung notwendig sind. Alle Schritte haben, wie oben ausgeführt, eine endliche Geschwindigkeit aufgrund von endogenen Prozessen.

Carcinogen accelerates endogenous process



Carcinogen introduces new pathway

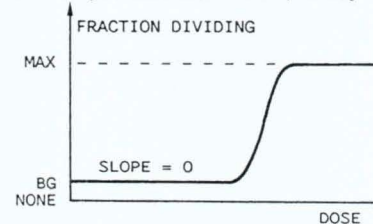


Abb. 2 Schematischer Dosis-Wirkungs-Verlauf für die Stimulation der Zellteilung in einer Zellpopulation. Oben: Das Kanzerogen wirkt kompetitiv auf einen endogenen Prozeß (z. B. hormonelle Stimulation der Zellteilung). Unten: Das Kanzerogen stimuliert die Zellteilung über einen Weg, der kein endogenes Korrelat hat.

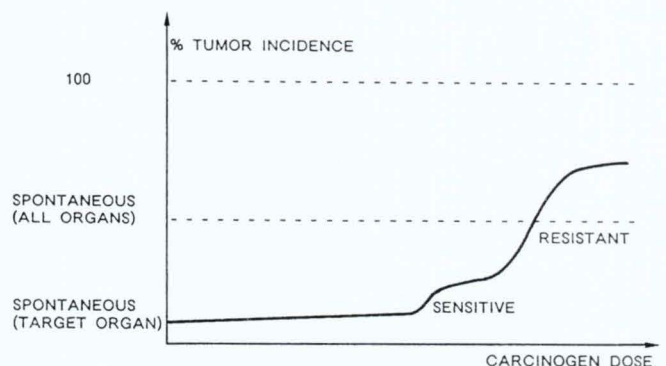


Abb. 3 Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Tumorerzeugung, wenn sich zwei Subpopulationen bez. der Empfindlichkeit gegenüber dem Kanzerogen unterscheiden

Der schrittweise Ablauf der Kanzerogenese kann beim Kolonkarzinom des Menschen gut verfolgt werden. Späte Stadien zeigen eine charakteristische Akkumulation von genetischen Rekombinationsereignissen. Punktmutationen werden zwar auch registriert, brauchen aber nicht unbedingt zu persistieren. Jedes genotoxische Kanzerogen hat ein spezifisches Spektrum von induzierbaren Mutationen. Deshalb ist es möglich, daß eine Substanz nur einen einzigen Schritt beschleunigt, während die übrigen Schritte sich auf die endogenen Prozesse abstützen müssen. Bei einer solchen Substanz wird die Tumorzinzidenz proportional zum DNA-Schaden sein. Falls eine Substanz aber mehrere Schritte beschleunigt, überlagern sich die entsprechenden Dosis-Wirkungs-Kurven für die einzelnen Schritte. Insgesamt führt dies zu Bereichen mit exponentiellem Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve. Dies kann zu steilen Nichtlinearitäten führen.

Individuelle Empfindlichkeit

Die bis hierher diskutierten Dosis-Wirkungs-Beziehungen betreffen eine genetisch homogene Population. In der heterogenen menschlichen Population sind aber viele Beispiele bekannt, wo gewisse Krebsrisiken familiär gehäuft sind. Eine genetische Begründung ist in vielen Fällen möglich. Als Beispiel aus der Arbeitsmedizin diene die Beobachtung, daß unter den Blasenkrebspatienten, die im Berufsleben hohen Dosen von aromatischen Aminen ausgesetzt waren, überproportional viele „langsame Azetylierer“ waren. Dieser Phänotyp beruht auf einem genetisch bedingten Polymorphismus für die Expression von Enzymen, die aromatische Amine azetylieren (und damit vermehrt zur Inaktivierung vorbereiten). Abb. 3 zeigt schematisch, wie eine solche Situation die Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Krebserzeugung durch aromatische Amine beeinflussen könnte. Zwei sigmoide Bereiche sind sichtbar. Im ersten sprechen die empfindlichen Individuen an, während für die weniger Empfindlichen erst eine höhere Belastung bedeutsam wird. Die Überlegungen, die oben für DNA-bindende Kanzerogene besprochen worden sind, werden also überlagert durch die unterschiedliche Empfindlichkeit.

Der in Abb. 3 skizzierte Verlauf soll nur das Prinzip illustrieren. Realistisch sind vielmehr solche Situationen, wo die Empfindlichkeit erstens polygenetisch und zweitens auch durch die Lebensumstände bestimmt wird. Dies führt in der Dosis-Wirkungs-Beziehung zu einer generellen Abflachung des Kurvenverlaufes, wobei im Extremfall die lineare Beziehung erscheint.

Zusammenfassung und Folgerungen

Ich habe versucht darzulegen, daß mechanistische Überlegungen zur Extrapolation der Dosis-Wirkungs-Beziehung herangezogen werden können. Ein nichtlinearer Verlauf ist nicht nur bei den epigenetischen Kanzerogenen wahrscheinlich, sondern auch bei den DNA-bindenden. Echte Schwellen sind aber nur in solchen Fällen zu erwarten, wo kein endogenes Korrelat besteht. Immerhin können auch steile Nichtlinearitäten zu einer drastischen Risikoreduktion führen, so daß die Anstrengungen dahin gehen sollten, die Steigung und den Bereich des überproportionalen Abfalls experimentell zu zeigen.

In einer heterogenen Population kann die Dosis-Wirkungs-Kurve zusätzliche „Wellen“ bekommen und wird dadurch grundsätzlich flacher. Im Extremfall ergibt sich eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung unabhängig vom Wirkmechanismus des Kanzerogens. Diese Proportionalität zwischen tiefster Dosis und Effekt wird bei genotoxischen Kanzerogenen aus mechanistischen Gründen schon für eine homogene Population postuliert, doch kann dies in einer heterogenen Population auch bei epigenetischen Kanzerogenen in Frage kommen.

Prof. Dr. W. K. Lutz

Institut f. Toxikologie, ETH und Universität Zürich
Schorenstr. 16
CH-8603 Schwerzenbach/Schweiz