

# Biological markers for exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons

## Citation for published version (APA):

Godschalk, R. W. L. (1999). *Biological markers for exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons*. Universiteit Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/1999

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Samenvatting

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK) vormen een groep van verbindingen, die ontstaan als gevolg van onvolledige verbranding van organisch materiaal. Veel PAK blijken kankerverwekkend te zijn in proefdieren en er wordt verondersteld dat ze ook kankerverwekkend kunnen zijn in mensen. Bepaalde vormen van kanker komen namelijk vaker voor in mensen die beroepsmatig werden blootgesteld aan PAK, dan onder de gehele bevolking. PAK zijn in staat kanker te veroorzaken doordat ze in het lichaam omgezet worden tot reactieve producten, welke kunnen reageren met het erfelijk materiaal (DNA) in de cel, waardoor zgn. PAK-DNA addukten worden gevormd. Deze DNA addukten kunnen vervolgens leiden tot DNA mutaties, die de normale processen van celgroei ontregelen. Door deze verstoring van de celgroei kan het proces dat uiteindelijk leidt tot kanker geïnitieerd worden.

De gemiddelde bevolking kan op drie manieren worden blootgesteld aan PAK, te weten oraal (bv. verontreinigde voeding), inhalatoir (bv. sigarettenrook) en dermaal (bv. koolteer houdende zalven). De kankerepidemiologie heeft behoefte aan gevoelige methoden voor de bepaling van deze blootstelling aan PAK en de hieruit voortvloeiende verhoogde kans op kanker. Bepaling van de hoeveelheid PAK-DNA addukten in lichaamscellen zou voor dit doel een ideale maat kunnen zijn, aangezien DNA addukten een indruk geven van de "biologisch effectieve dosis". Dit is de hoeveelheid geactiveerde PAK dat uiteindelijk wordt gebonden aan DNA. Organen waarin PAK kanker zouden kunnen veroorzaken (bv. long) zijn echter niet bereikbaar voor routinematig onderzoek en dus moet er gezocht worden naar andere geschikte bronnen van DNA. Het meest gebruikte 'surrogaat' weefsel wordt gevormd door makkelijk te bereiken witte bloed cellen (WBC). WBC kunnen worden onderverdeeld in een aantal subpopulaties, namelijk monocytten, lymfocytten en granulocytten. Een andere belangrijke bron van blootgestelde cellen wordt gevormd door cellen verkregen uit de long door middel van een longspoeling (broncho-alveolaire lavage; BAL-cellen). Echter, voordat DNA addukten in WBC-subpopulaties of BAL-cellen doeltreffend kunnen worden toegepast in het vaststellen van blootstelling aan PAK, dienen een aantal aspecten van DNA addukt vorming in deze cellen bekend te zijn:

In hoofdstuk 2 van dit proefschrift werden DNA addukt niveaus in verschillende WBC-subpopulaties en BAL-cellen van rokers bestudeerd, om vast te stellen welke cel-typen het meest geschikt zouden kunnen zijn om de mate van blootstelling aan PAK via sigarettenrook te bepalen. Aromatische-DNA addukt niveaus bleken het hoogst te zijn in BAL-cellen, gevolgd door respectievelijk mononucleaire bloedcellen (MNC, dit zijn monocytten plus lymfocytten) en granulocytten. Deze resultaten geven aan dat de bepaling van DNA addukten in BAL-cellen of MNC mogelijk de meest gevoelige analyses zijn om blootstelling aan aromatische verbindingen vast te stellen. Verder bleken de DNA addukt niveaus in MNC gerelateerd te zijn aan de mate van blootstelling; hoe meer iemand is blootgesteld, des te hoger is het DNA addukt niveau. Bij zeer hoge blootstellingen daarentegen, bleken de DNA addukt niveaus verhoudingsgewijs niet verder te

stegen (Hoofdstuk 3). Een relatie tussen het aantal sigaretten dat per dag gerookt werd en het DNA addukt niveau in BAL-cellen werd niet aangetoond. Dit zou verklaard kunnen worden door het feit dat BAL-cellen direct en sterk zijn blootgesteld aan geïnhalede carcinogenen, waardoor een verzadiging van de DNA addukt vorming eerder kan optreden dan in het perifere bloed.

Inhalatie van PAK via bv. sigarettenrook is niet de enige route waarlangs PAK het lichaam kunnen binnendringen en waarna DNA addukten in WBC gevormd kunnen worden. Vandaar dat in hoofdstuk 4 in proefdieren (ratten) werd onderzocht, welke invloed verschillende blootstellings-routes kunnen hebben op de DNA addukt vorming in WBC door benzo(a)pyreen (B[a]P, een belangrijke carcinogene PAK). De hoogste DNA addukt niveaus in WBC werden gevonden na orale en intra-tracheale blootstelling, terwijl de laagste DNA addukt niveaus werden gevonden na dermale toediening van B[a]P. DNA addukt niveaus in WBC waren gerelateerd aan die in de long, en deze relatie was onafhankelijk van de blootstellingsroute. Over het algemeen werden statistisch significante relaties waargenomen tussen DNA addukt niveaus in WBC en relevante doelwitorganen (die organen waarin PAK kanker kunnen induceren). Ook in eczeem patienten, die dermaal behandeld werden met koolteer zalven, waarin hoge concentraties PAK voorkomen, werd een relatie aangetoond tussen het DNA addukt niveau in MNC en de huid (hoofdstuk 7). De resultaten van deze studies met zowel proefdieren als patienten, geven aan dat DNA addukten in MNC gebruikt kunnen worden als maat voor de hoeveelheid DNA schade in relevante doelwitorganen.

Om te bestuderen of DNA addukt metingen de mogelijkheid bieden om blootstelling over een relatief lange periode vast te stellen (weken tot maanden), werd de DNA addukt verwijdering bestudeerd in MNC van vrijwilligers die stopten met roken voor een periode van tenminste 22 weken (Hoofdstuk 5). Na het stoppen met roken waren de DNA addukt niveaus duidelijk gedaald, maar waren nog steeds aantoonbaar in 60% van de vrijwilligers. Ter vergelijking werd ook de aanwezigheid van DNA addukten bestudeerd in MNC van een groep vrijwilligers die nog nooit gerookt hadden. In deze personen werden in slechts 30% van de personen DNA addukten gedetecteerd. De halfwaardetijd (de tijd waarin het addukt niveau is gehalveerd) in MNC werd geschat op circa 12 weken. DNA addukt vermindering werd ook bestudeerd in WBC-subpopulaties van de eczeem patienten behandeld met koolteer zalf (hoofdstuk 7). De aanwezigheid van DNA addukten in de monocyten en granulocyten fractie bleek veel korter te zijn dan die in de lymfocyten fractie. Dit komt goed overeen met de levensduur van deze celtypes. DNA addukt metingen in lymfocyten zijn dus geschikt om langdurige blootstelling aan PAK vast te stellen, of om PAK belasting vast te stellen na een periode waarin geen verdere blootstelling plaatsvond. DNA addukten in monocyten kunnen mogelijk gebruikt worden bij het vaststellen van blootstelling over een korte periode, zonder verstoring van de resultaten door blootstellingen die verder in het verleden plaatsvonden. Deze resultaten geven aan dat een verlaging van de blootstelling aan PAK, gepaard gaat met een daling van het DNA adduct niveau in WBC-subpopulaties.

Dit houdt ook in dat indien de blootstelling gelijk blijft, het adduct niveau niet zou mogen veranderen. Tot nu toe zijn er weinig studies beschikbaar die ingaan op dit aspect (binnenpersoons of intraindividuele variatie). In hoofdstuk 3 wordt een studie beschreven waarin de intraindividuele variatie werd bestudeerd door herhaaldelijke metingen van DNA addukten in MNC en BAL-cellen van rokers over een periode van 2 tot 6 maanden. In MNC van deze rokers bleek de intraindividuele variatie klein te zijn over een periode van 2 maanden. Echter, na een half jaar bleken de DNA addukt niveaus in dezelfde personen te zijn verhoogd, terwijl ze niet meer of minder waren gaan roken. Een mogelijke verklaring voor deze waarneming is dat in de winterperiode (2<sup>e</sup> meting), hogere PAK-concentraties gemeten worden in de buitenlucht dan in de zomer (1<sup>e</sup> meting). Andere mogelijke verklaringen kunnen echter niet worden uitgesloten. De intraindividuele variatie in BAL-cellen was klein over een periode van 6 maanden; beide metingen in BAL-cellen bleken goed met elkaar overeen te stemmen.

Hoewel DNA addukten in MNC goed correleerden met het aantal sigaretten dat dagelijks geconsumeerd werd, werden er toch grote interindividuele variaties (tussenpersoons variatie) waargenomen. Dat wil zeggen dat twee personen met een gelijk rookgedrag, toch verschillende DNA addukt niveaus in MNC kunnen hebben. Verschillende mogelijke bronnen voor deze variatie werden in dit proefschrift verder bestudeerd. Eén mogelijke bron voor deze interindividuele variatie is de natuurlijke genetische variatie in genen welke coderen voor enzymen die carcinogenen kunnen detoxificeren. Rokers met het *GSTM1*(-/-) en/of het *NAT2* langzame acetyleerders genotype hadden hogere DNA addukt niveaus in hun MNC dan rokers met het *GSTM1*(+) en/of het *NAT2* snelle acetyleerders genotype (hoofdstuk 5). Ook de lichaamssamenstelling van rokers zou een rol kunnen spelen in variaties in DNA addukt niveaus tussen personen met een ogenschijnlijk gelijke blootstelling (hoofdstuk 6). Rokers met een hoge 'body mass index' (BMI, dit is gewicht/lengte<sup>3</sup>) hadden een lager DNA adduct niveau dan rokers met een lage BMI. Als laatste werden DNA herstel activiteiten of de inductie hiervan bestudeerd als bron van variatie in DNA addukt niveau (hoofdstuk 9). Het eiwit P53 kan hierbij een belangrijke rol spelen, omdat blootstelling aan PAK de concentraties van dit eiwit in epidermale cellen doet stijgen. Van P53 is bekend dat het de celdeling remt, waardoor de cellen voldoende tijd krijgen om adequaat te reageren op de schade die is aangericht door carcinogenen.

In beroepsmatig blootgestelde individuen wordt de interne dosis van PAK vaak vastgesteld door middel van metingen van PAK-metabolieten in urine (bijv. 3-hydroxy-benzo[a]pyreen en/of 1-hydroxy-pyreen). Deze metingen zijn echter niet representatief voor de biologisch effectieve dosis en geeft de blootstelling aan PAK over een slechts korte periode weer. Desalniettemin, werden goede correlaties waargenomen tussen de 3-hydroxy-B[a]P uitscheiding in de urine en de DNA addukt vorming in doelwit organen van ratten die acuut werden blootgesteld aan B[a]P. In dit experiment valt op dat de 3-hydroxy-B[a]P concentraties in de urine en het DNA addukt niveau kort na de acute blootstelling verhoogd zijn. Binnen één à twee weken is de 3-hydroxy-B[a]P concentratie weer terug op basis niveau, terwijl DNA addukten nog in grote hoeveelheden in de organen gevonden kunnen worden.

In patienten behandeld met koolteer zalven werd een vergelijkbare relatie waargenomen tussen 3-hydroxy-B[a]P in de urine en een specifiek addukt gevormd door B[a]P.

De nadruk van dit proefschrift ligt op DNA addukt bepalingen na blootstelling aan aromatische verbindingen. Indien DNA addukten inderdaad worden toegepast in het vaststellen van PAK-blootstelling, dan moeten de resultaten van deze metingen en de technieken waarmee deze verkregen worden, betrouwbaar en reproduceerbaar zijn. De <sup>32</sup>P-postlabeling methode is een veelvuldig toegepaste techniek met een zeer grote gevoeligheid, en waarmee addukten kunnen worden aangetoond in slechts kleine hoeveelheden DNA. Helaas is deze techniek niet in staat om addukten te identificeren en daarom werden nieuwe technieken geïntroduceerd zoals een HPLC-fluorescentie methode (hoofdstuk 10). Met deze techniek kunnen specifieke B[a]P gerelateerde DNA addukten gedetecteerd worden. Onderzoekers in de moleculaire epidemiologie dienen er zich van bewust te zijn dat elke techniek haar eigen voor- en nadelen heeft, opdat een juiste keuze gemaakt kan worden voor de toepassing van een bepaalde techniek in een experiment of studie.

In het algemeen kan geconcludeerd worden dat er voldoende wetenschappelijke basis is om DNA addukt metingen toe te passen in het vaststellen van de biologisch effectieve dosis na blootstelling aan PAK. Verder kunnen de resultaten van dit proefschrift als basis dienen voor nieuwe toepassingen van DNA addukt metingen, bijvoorbeeld op het gebied van kanker (chemo)preventie.