

Diss. ETH Nr. 7127

**Bedeutung der kovalenten DNS-Bindung oder anderer Mechanismen  
bei der Erzeugung von Lebertumoren durch die Isomeren von  
Hexachlorcyclohexan**

---

**ABHANDLUNG**

zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der

**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH**

vorgelegt von

**PETER SAGELSDORFF**

Dipl. Natw. ETH

geboren am 16. September 1955

von Lausanne VD

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Ch. Schlatter, Referent

PD Dr. W. K. Lutz, Korreferent

Prof. Dr. F. Würigler, Korreferent

  
Zürich 1982

## 8. ANHANG

=====

8.1. Summary

Hexachlorocyclohexane (HCH) comprises of a group of compounds of which the  $\alpha$ -isomer was found to induce liver tumors in all studies performed whereas studies with the  $\gamma$ -isomer produced controversial results.

Chemically-induced tumors are now thought to be the result of a DNA damage succeeded by appropriate promotion. Most chemicals exert their activity through covalent interaction of a reactive metabolite with DNA in the target organ and are therefore called genotoxic. An other group of tumor-enhancing agents, viz cocarcinogens and promoters, do not themselves react with DNA but apparently modulate one or several out of a variety of biochemical and biological steps related to the process of tumor formation. It was the aim of this study to provide more information about the mechanism of tumor induction by HCH. For that reason it was examined whether the isomers of HCH can be metabolized in vivo to a reactive metabolite able to reach and bind to liver DNA or whether a possible hepatocarcinogenicity is rather due to its nongenotoxic effects.

[ $^3\text{H}$ ]HCH was synthesized by chlorination of [ $^3\text{H}$ ]benzene prepared by catalytic tritiation of benzene with tritiated water. The isomers of HCH were separated by adsorption chromatography on silica gel. In order to determine the covalent binding to DNA, [ $^3\text{H}$ ]HCH was administered to male mice by oral gavage and liver DNA was isolated and purified after precipitation of chromatin. The radioactivity on the DNA was converted to a 'Covalent Binding Index', CBI = DNA damage/dose in the units of ( $\mu\text{mol}$  bound HCH/mol DNA nucleotide)/(mmol HCH administered/kg body weight), and a value of about 0.2 was found 10 h after the administration of  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -HCH.  $\beta$ -HCH gave rise to a CBI of only  $<0.09$ , possibly due to its slow metabolism. DNA of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -[ $^3\text{H}$ ]HCH treated mice was digested enzymatically to the nucleosides. An HPLC analysis revealed that about 90% of the radioactivity on the DNA was incorporated biosynthetically into the nucleosides. At elution volumes distant from the normal nucleosides, a small amount of radioactivity (about 10% of the total) could be detected. This is the region known to contain the more lipophilic carcinogen-nucleoside adducts so that a covalent binding of HCH for at least 10% of the total radioactivity can

be expected. After subtracting the biosynthetically incorporated radioactivity, a CBI of 0.01-0.02 resulted for  $\alpha$ - and  $\gamma$ -HCH. The CBI for  $\alpha$ - and  $\gamma$ -HCH was by a factor of 300 below the CBI for the weak hepatocarcinogen dimethylaminoazobenzene and by a factor of  $10^6$  below the value found with the strongest genotoxic carcinogens like aflatoxin  $B_1$  or dimethylnitrosamine. This minute DNA-binding ability cannot be responsible for the liver tumor induction in mice because of the following findings:

- a) Both isomers gave rise to similar levels of DNA damage although the  $\alpha$ -isomer is a much more potent tumor inducer. This similarity was seen not only at the time of maximum binding but up to 10 days after oral administration.
- b) Three mouse strains known to be differently susceptible to tumor induction by  $\gamma$ -HCH could not be distinguished with respect to DNA binding.
- c) The level of DNA binding of  $\alpha$ -HCH (CBI = 0.01-0.02) is about four orders of magnitude lower than would be expected if the mechanism of tumor induction was by genotoxicity mediated by DNA-binding.

In the light of these findings, it is concluded that non-genotoxic processes involved in chemical carcinogenesis such as cocarcinogenesis or a promotional type of activity, must be responsible for the carcinogenicity of HCH. We have some indication for the former activity from the stimulation of the liver-cell proliferation after HCH treatment. The incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]thymidine into liver DNA after  $\alpha$ -HCH treatment was higher than the corresponding incorporation values after  $\gamma$ -HCH treatment. The interindividual and interexperimental variations were high, possibly due to a non-synchronous diurnal rhythm of the livercell divisions. An interpretation of the [ $^{14}\text{C}$ ]thymidine incorporation levels thus seems premature. This all the more as HCH isomers are known to be inducers of drug metabolizing enzymes, thereby able to increase the formation of genotoxic metabolites of ubiquitous carcinogens.

An extrapolation of animal data to man should therefore be based upon the elucidation of the specific type of the non-genotoxic mechanism of the tumor induction by HCH in the animal and a test of whether similar activities are found in man at the appropriate dose levels.

## 8.2. Zusammenfassung

Hexachlorcyclohexan (HCH) umfasst eine Gruppe von Verbindungen, wovon das  $\alpha$ -Isomer in allen durchgeführten Studien Lebertumore erzeugte, während das  $\gamma$ -Isomer widersprüchliche Resultate ergab.

Durch Chemikalien induzierte Tumore sind nach den heutigen Vorstellungen das Resultat einer DNS-Schädigung, gefolgt von einer Promotion. Die meisten chemischen Karzinogene wirken über eine kovalente Interaktion eines reaktiven Metaboliten mit der DNS im Zielorgan und werden deshalb genotoxische Karzinogene genannt. Eine andere Gruppe von Substanzen, die die Tumorzinzidenz erhöhen, z. B. Kokarzinogene und Promotoren, reagieren nicht mit der DNS sondern modulieren einen oder mehrere der biologischen und biochemischen Schritte, die zu einem Tumor führen. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob die Isomeren von HCH in vivo zu reaktiven Verbindungen metabolisiert werden, die bis zum Zellkern gelangen und eine kovalente DNS-Bindung eingehen können, oder ob eine mögliche Hepatokarzinogenität von HCH auf nicht-genotoxischen Effekten beruht.

[ $^3\text{H}$ ]HCH wurde durch eine Chlorierung von [ $^3\text{H}$ ]Benzol synthetisiert, das durch eine katalytische Tritierung von Benzol mit Tritiumwasser hergestellt wurde. Die Isomeren von HCH wurden mittels einer Adsorptionschromatographie an Silikagel getrennt. Zur Bestimmung der DNS-Bindung wurde [ $^3\text{H}$ ]HCH männlichen Mäusen oral appliziert und Leber-DNS wurde nach einer Chromatinpräzipitation isoliert und gereinigt. Die Radioaktivität auf der DNS wurde als 'Covalent Binding Index', CBI = DNS-Schaden/Dosis in den Einheiten ( $\mu\text{mol}$  gebundenes HCH/mol DNS Nucleotid)/(mmol appliziertes HCH/kg Körpergewicht), berechnet und ein Wert von ca. 0.2 wurde 10 Std. nach der Applikation für  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -HCH gefunden.  $\beta$ -HCH ergab wegen seines langsameren Metabolismus nur einen CBI von  $<0.09$ . DNS aus  $\alpha$ - und  $\gamma$ -[ $^3\text{H}$ ]HCH behandelten Mäusen wurde enzymatisch zu den Nucleosiden abgebaut. Eine HPLC-Analyse ergab, dass ca. 90% der Radioaktivität auf der DNS biosynthetisch inkorporiert war. Zu einer späteren Elutionzeit als die der natürlichen Nucleoside konnte eine schwache Radioaktivität (ca. 10% des Totalen) festgestellt werden. In dieser Region eluieren die lipophileren Nucleosid-Karzinogen-Addukte, so dass eine kovalente Bindung von HCH für zumindest 10% der totalen Radioaktivität erwartet werden kann. Nach Abzug der biosynthetisch inkorporierten Radioaktivität resultierte für  $\alpha$ - und  $\gamma$ -HCH

ein CBI von 0.01-0.02.

Der CBI für  $\alpha$ - und  $\gamma$ -HCH war ca. 300 mal tiefer als der CBI für das schwache Hepatokarzinogen Diaminoazobenzol und ca.  $10^6$  mal kleiner als der CBI, der mit starken genotoxischen Karzinogenen wie Aflatoxin B<sub>1</sub> oder Dimethylnitrosamin gefunden wurde. Diese schwache DNS-Bindungs Aktivität kann aus den folgenden Gründen nicht die Ursache der Lebertumor-Induktion in Mäusen sein:

- a) Beide Isomeren ergaben ähnliche CBI-Werte, obwohl  $\alpha$ -HCH ein viel stärkerer Tumorinduktor ist. Diese Ähnlichkeit konnte nicht nur zum Zeitpunkt der maximalen DNS-Bindung sondern bis zu 10 Tagen nach oraler Applikation festgestellt werden.
- b) Drei Mäusstämme mit bekannter unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber der Lebertumor Induktion durch  $\gamma$ -HCH, konnten in Bezug auf die DNS-Bindung nicht unterschieden werden.
- c) Die DNS-Bindungs-Aktivität von  $\alpha$ -HCH (CBI = 0.01) ist um einen Faktor  $10^4$  kleiner als man erwarten würde, wenn der Mechanismus der Tumorinduktion auf einer durch DNS-Bindung bedingten genotoxischen Wirkung beruhen würde.

Unter diesen Gesichtspunkten wurde die Schlussfolgerung getroffen, dass nicht genotoxische Prozesse, wie Cokarzinogenese oder eine Tumorpromotion für die Karzinogenität von HCH verantwortlich sind. Hinweise auf eine Promotionsaktivität konnte in der Stimulation der Leberzell Proliferation gefunden werden. Der Einbau von [<sup>14</sup>C]Thymidin in Leber-DNS nach einer  $\alpha$ -HCH Behandlung war höher als die entsprechenden Inkorporationswerte nach einer  $\gamma$ -HCH Behandlung. Die interindividuellen und interexperimentellen Schwankungen waren wegen einer vermuteten Asynchronität des Tagesrhythmus der Leber-Zellteilung so hoch, dass eine Interpretation der [<sup>14</sup>C]Thymidin Inkorporations Werte verfrüht scheint. Zudem ist bekannt, dass die Isomeren von HCH die Enzyme des Fremdstoffwechsels induzieren, und somit die Bildung eines genotoxischen Metaboliten eines ubiquitären Karzinogens erhöhen könnten.

Eine Extrapolation von an Tieren gefundenen Resultaten auf den Menschen sollte deshalb erst erfolgen, nachdem der Typ der nicht-genotoxischen Wirkung der Tumorinduktion durch HCH in den Tieren bekannt ist, und nachdem Versuche gezeigt haben, dass bei einer entsprechenden Dosierung beim Menschen ähnliche Aktivitäten gefunden werden.