



Doctoral Thesis

## Untersuchung von DNS-Schäden durch Formaldehyd, Acetaldehyd, Tetrachlorkohlenstoff und Hydrazin

**Author(s):**

Minini, Urs

**Publication Date:**

1985

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000342608> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 7763

Untersuchung von DNS-Schäden durch Formaldehyd,  
Acetaldehyd, Tetrachlorkohlenstoff und Hydrazin

---

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von

URS MININI

eidg. dipl. Apotheker

geboren am 17. Januar 1956

von Arogno TI

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Ch. Schlatter, Referent

PD Dr. W.K. Lutz, Korreferent

1985

## 6. ANHANG

### 6.1. Zusammenfassung

---

Formaldehyd und Acetaldehyd als chemisch reaktive Substanzen, die als Metaboliten körpereigener Verbindungen insbesondere in der Leber vorkommen, zeigten im Langzeitinhalationsversuch in Nagetieren kanzerogene Veränderungen in der Nasenschleimhaut. In der vorliegenden Arbeit wurde eine genotoxische Wirkung (DNS-Protein-Vernetzung) in der Leber nachzuweisen versucht, um eine potentielle Gefährdung durch endogene Verbindungen nachzuweisen und gegen exogene Belastungen abzugrenzen.

In einer ersten Versuchsreihe wurden in der Ratte die Chromatinproteine mit [ $^3\text{H}$ ]Lysin markiert und nach Applikation der Aldehydvorstufen Methanol und Äthanol die Proteinkontamination der isolierten DNS als Mass einer Protein-DNS-Vernetzung bestimmt. Eine anfangs gezeigte Vernetzung nach Methanolgabe konnte in einem analogen Versuch und in Dosisabhängigkeiten nicht reproduziert werden. Der Effekt liegt, wie später gezeigt wurde, unter der Nachweisgrenze. Acetaldehyd zeigte nie eine vernetzende Aktivität unter diesen experimentellen Bedingungen. In vitro zeigt Formaldehyd gegenüber Acetaldehyd eine etwa 4 mal grössere chemische Reaktivität nach Inkubation mit DNS und Protein. Die Vernetzung zwischen den Aminogruppen von Lysinresten an Sepharosekügelchen und DNS bzw. Protein über Formaldehyd oder Acetaldehyd erwies sich in wässriger Lösung als stabil.

Protein-DNS-Vernetzungen lassen sich dadurch erfassen, dass sie sich in einer Phenol-Chloroform-Wasser-Mischung in einer Interphase anreichern. Solche "Interphasen-DNS" kann nach enzymatischem Abbau der Proteine quantitativ bestimmt werden. Bei in vitro Inkubationen während 4 Stunden von Leberhomogenat mit Aldehyden oder Alkoholen konnten im Falle von Formaldehyd/Methanol Konzentrationen bis 0.01 mM nachgewiesen werden, während bei Acetaldehyd/Äthanol bis 10 mM keine vernetzende Aktivität festgestellt werden konnte. Leberhomogenat kann Methanol zu Formaldehyd oxidieren, so dass bei äquimolaren Konzentrationen nicht zwischen Methanol und Formaldehyd unterschieden werden kann. Äthanol hemmt die Formaldehyd-Bildung aus Methanol kompetitiv. Bei Inkubation von isolierten Zellkernen aus Leber waren bei Formaldehyd-Konzentrationen von 1 mM nach 30 Minuten Inkubation Vernetzungen nachweisbar. In Tierversuchen nach Gabe von Methanol mit oder ohne Disulfiram einerseits und nach Applikation von Aminopyrin andererseits konnte mit der Interphasen-Methode keine DNS-Protein Vernetzung nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurde in der Literatur nach Inhalation von 6 ppm Formaldehyd

(kanzerogen im Langzeitversuch) mit der gleichen Methode und bei gleichen Nachweisgrenzen eine Vernetzung gezeigt. Eine Senkung der Nachweisgrenze durch radioaktive Markierung der Proteine und anschliessendem Vergleich der Proteinkontamination der DNS der Wasser- und Interphase konnte aufgrund von sehr grossen Schwankungen nicht erreicht werden, selbst nach teilweisem Abbau der markierten Proteine.

Bei peroraler Gabe von Formaldehyd und Acetaldehyd wurde im Magen und Dünndarm von Ratten, nicht aber in der Leber, eine Vernetzung gezeigt, wobei Formaldehyd eine 2-fache (Dünndarm) bis 5-fache Reaktivität (Magen), verglichen mit Acetaldehyd, aufweist.

Vergleichende Abschätzungen der Formaldehydbelastung nach Gabe von Methanol oder Aminopyrin sowie nach Inhalation von 6 ppm als einerseits tiefste kanzerogene Dosis in Ratten und andererseits als Nachweisgrenze der Interphasenmethode zeigten, dass in der Nasenschleimhaut nach Inhalation eine etwa 3 mal höhere Gewebelastung vorliegt, verglichen mit der Bildung aus Methanol in der Leber. Aminopyrin führt bei Applikation einer maximalen Tagesdosis im Menschen zu einer nochmals etwa 50 mal geringeren Belastung.

Eine vereinfachende Abschätzung der endogenen Formaldehydbildung aus Demethylierungsvorgängen bei der Cholesterinbiosynthese und beim Cholinmetabolismus ergab Belastungen, die im Vergleich mit der Entstehung des Formaldehyds aus Methanol rund 50 mal tiefer liegen, d.h. sogar etwa 150 mal tiefer, als bei der Belastung der Nasenschleimhaut der Ratte nach Inhalation von 6 ppm Formaldehyd.

In der Literatur wurde eine Erklärung des Zusammenhanges zwischen zytotoxischen Substanzen und kanzerogener Wirkung durch einen Befund gegeben, dass DNS an den Stellen 7 und O<sup>6</sup> des Guanins methyliert ist nach Gabe von zytotoxischen Stoffen. Zwei Tierversuche mit dem Ziel, nach Gabe der Hepatotoxine CCl<sub>4</sub> und Hydrazin eine dosisabhängige Korrelation zwischen histologisch erfassbarer Zellschädigung und aberranter DNS-Methylierung nachzuweisen, führten im Falle von CCl<sub>4</sub> zu einer reproduzierbar fehlenden Bildung von 7-Methylguanin. Hydrazin zeigte erst bei der höchsten Dosierung von 90 mg/kg eine knapp nachweisbare DNS-Methylierung, wobei das Ausbleiben eines deutlichen Effekts gemäss Literatur nicht auf experimentelle Fehler oder mangelnde Verfügbarkeit der Radioaktivität zurückgeführt werden kann und deshalb unklar bleibt. Die Theorie der aberranten Methylierung der DNS nach Gabe zytotoxischer Substanzen bleibt deshalb unbewiesen, und es scheint, dass Hydrazin in dem Sinne eine Ausnahmesituation begründet durch die Möglichkeit, dass in der Zelle methylierte Hydrazine als bekannte Methylantien gebildet worden sind.

## 6.2. Summary

---

### Genotoxicity of Aldehydes

Formaldehyde (FA) and acetaldehyde (AA) have been found to induce tumors in the nasal passages in rats and mice in long-term inhalation studies. Recent reports also indicated a DNA-protein crosslinking ability of formaldehyde in the target tissue. This was deduced from the finding that the quantity of DNA remaining in aqueous solution during extraction with immiscible lipophilic solvents decreased with increasing formaldehyde exposure. The absent DNA was localized in the interphase between the aqueous and the organic phase. In controls, this fraction was between 1 and 4 percent of the total yield of DNA.

Because FA is produced endogenously by oxidative demethylation of physiological precursors, it was thought important to find out whether an unavoidable DNA damage mediated by endogenous FA could also be detected.

In a first set of experiments, the stability of DNA-protein crosslinks was investigated in a model system using Lysine-Sepharose 4B beads which were incubated with radiolabelled DNA in the presence of FA or AA. It could be shown here that FA was about 4 times more reactive than AA and that the crosslinks were stable in aqueous media.

The extent of DNA-protein crosslinks was investigated with the interphase procedure described above. Four-hour incubation of liver homogenate with FA or methanol produced a detectable increase in crosslinks with concentrations of 0.01 mM and above. With AA or ethanol, no increase of the DNA content in the interphase was detectable up to 10 mM. The rate of alcohol oxidation in liver homogenate was so fast under the test conditions that no distinction could be made between the use of the alcohol or the aldehyde with respect to crosslink formation. Preparation of nuclei from the liver after incubation of homogenate with FA resulted in detectable crosslinks above 1 mM FA. This means that the nuclear membrane cannot completely protect the DNA from FA present in the cytoplasm.

Administration of 750 mg/kg FA by oral gavage to rats resulted in about 50 percent interphase DNA isolated from the stomach. A comparison with the *in vitro* incubations shows that the cumulative intracellular FA burden was equivalent to about 0.5 mM for 4 hours. Liver DNA did not show more crosslinks than the controls. Administration by gavage of 1 g methanol or 0.2 g aminopyrine per kg rat did not result in any detectable increase in interphase DNA in the liver. This means that the intracellular

concentration of FA in the liver must have been lower than 0.01 mM and lower than the local burden for the nasal epithelium at 6 ppm FA inhalation exposure (6 hours per day for 2 days).

Endogenous formation of FA from demethylations during cholesterol biosynthesis or degradation of choline was estimated and found to be about two orders of magnitude below the rate of FA formation from first order methanol oxidation. It must therefore be concluded that the formaldehyde concentration reached by demethylation of endogenous precursors is very much lower than the local FA burden imposed by a long-term 6 ppm inhalation exposure.

#### Aberrant DNA Methylation

An explanation of the link between cytotoxicity and tumorigenicity could be derived from reports that liver DNA was methylated in positions 7 and O<sup>6</sup> of guanine after administration to rats of hepatotoxic agents like hydrazine, carbon tetrachloride, or ethanol. The methyl group was postulated to be derived from the S-adenosylmethionine. Two sets of experiments were performed with tritiated methionine as an endogenous methyl donor to reproduce the literature data in a dose-dependent manner with CCl<sub>4</sub> and hydrazine. Although the radioactivity available was larger than in the published reports, no 7-methylguanine was detectable after CCl<sub>4</sub>, and the effect observed after hydrazine was much lower than reported and at our limit of detection. The alternative hypothesis of an intracellular formation of methylated hydrazines with subsequent activation to a methylating agent must therefore be reevaluated by these authors.