

Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS)

**Bestimmung des Risikopotentials bodengebundener Schadstoffe
für den Menschen im Minischwein-Modell
mit Cytochrom P450-Enzymen als Effektbiomarker**

von

Peter H. Roos

Ruhr-Universität Bochum, Institut für Physiologische Chemie
Universitätsstr. 150
44780 Bochum

jetzt

Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund
Ardeystr. 67
44139 Dortmund

Förderkennzeichen: BWB 99004

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

Dezember 2001

Zusammenfassung

Bestimmung des Risikopotentials bodengebundener Schadstoffe für den Menschen im Minischwein-Modell mit Cytochrom P450-Enzymen als Effektbiomarker

Peter H. Roos

Nach oraler Exposition gegenüber PAK-belasteten Böden haben wir den Effektbiomarker CYP1A1, ein fremdstoffmetabolisierendes Cytochrom P450, enzymatisch und immunochemisch in verschiedenen Geweben von Minischweinen bestimmt. Parallel wurde eine nicht-exponierte Kontrollgruppe untersucht. Zudem wurden die im Minischwein gemessenen Effekte mit denen entsprechender Versuche im Rattenmodell verglichen. Als wesentliche **Ergebnisse** der Studie sind hervorzuheben: **(1)** Die deutliche Induktion von CYP1A1 durch orale PAK-Dosen, die im realistischen Bereich der Aufnahme durch Menschen insbesondere von Kindern liegen. **(2)** Die Induktion von CYP1A1 nicht nur im primär resorbierenden Organ, dem Duodenum, sondern auch in Leber, Niere, Lunge und Milz. **(3)** Der gravierende Unterschied im organspezifischen Antwort-Profil der CYP1A1-Induktion zwischen Minischwein und Ratte. Im Detail wurden die folgenden Ergebnisse erzielt: ● CYP1A1 wird konstitutiv in Leber, Niere und Duodenum von Minischweinen nicht oder in nicht nennenswertem Umfang exprimiert. ● Nach oraler Aufnahme PAK-kontaminierter Böden kommt es zu einer dosisabhängigen CYP1A1-Induktion in Duodenum, Leber und Niere. ● Niedrig-belastete Böden, die nur geringe Effekte in der Leber hervorrufen, können eine deutliche CYP1A1-Induktion im Duodenum bewirken. ● In Leukozyten von Minischweinen konnte eine Induktion von CYP1A1 auf Proteinebene nach Aufnahme kontaminierter Böden nachgewiesen werden. ● Exemplarisch wurde an einer Expositionsgruppe von Minischweinen gezeigt, dass eine orale PAK-Aufnahme zu deutlichen Induktionseffekten selbst in Lunge und Milz führen kann. ● Hinsichtlich der Induktion von CYP1A1 in verschiedenen Organen zeigen Ratten und Minischweine unterschiedliche Antwortprofile. Während oral aufgenommene PAK beim Minischwein zu einer deutlichen CYP1A1-Induktion im Dünndarm führen, wird die Expression von CYP1A1 im Darm von Ratten nur geringfügig erhöht. Umgekehrt kommt es aber in der Leber von Ratten zu einer stärkeren Induktionsantwort als in der Leber von Minischweinen. ● Im Rattenmodell konnten wir zeigen, dass sich die Art und Weise der täglichen oralen PAK-Aufnahme deutlich auf das Ausmaß der CYP1A1-Induktion auswirkt. **Schlußfolgerungen:** Da die von uns eingesetzten Bodendosierungen im Bereich möglicher Aufnahmemengen für im Freien spielende Kinder liegen und zudem deutliche Induktionseffekte in verschiedenen Organen hervorrufen, haben die Untersuchungsergebnisse Bedeutung für Abschätzungen des Humanrisikos und sollten deshalb Anstoß zur Entwicklung entsprechender *in vitro*-Testmethoden sein. Die Unterschiede in den Induktionsantworten zwischen Minischwein und Ratte verdeutlichen die Problematik der Identifizierung eines geeigneten Tiermodells für den Menschen im Hinblick auf Schadstoffexpositionen. Hier ist noch Grundlagenarbeit nötig.

Summary

Risk assessment of soil-bound environmental contaminants for humans in the minipig model using cytochromes P450 as biomarkers of effect

Peter H. Roos

After oral intake of PAH-contaminated soil particles by minipigs, the xenobiotic metabolizing P450 enzyme CYP1A1 has been determined enzymatically and immunochemically as biomarker of effect in several organs of the animals. Additionally, basal expression levels were analyzed in a group of non-exposed minipigs. For comparison, exposure experiments of the same kind were also performed with rats. The most striking results of the study are: (1) Significant induction of CYP1A1 by oral PAH-doses which are in the intake range of humans, in particular of children. (2) CYP1A1 induction not only in the duodenum as the primary organ of contaminant absorption but also in liver, kidney, lung and spleen. (3) The serious difference in the organ-specific response-pattern between minipigs and rats. In detail, the following **results** were obtained: ● CYP1A1 is not expressed constitutively in liver, kidney and duodenum of minipigs. ● After oral intake of PAH-contaminated soils, CYP1A1 is induced in a dose-dependent manner in liver, kidney and duodenum. ● Low contaminated soils which lead to marginal effects in the liver can strongly induce CYP1A1 in the duodenum of minipigs. ● CYP1A1 is induced on the protein level in leukocytes of PAH-exposed minipigs. ● Oral intake of PAH-contaminated soils can lead to CYP1A1-induction in lung and spleen, as shown here with the high exposure group CA1. ● Rats and minipigs differ in their response profiles with respect to organ-specific CYP1A1-induction. While in minipigs oral PAH ingestion leads to strong CYP1A1 induction in the duodenum, CYP1A1 expression is only slightly elevated in the small intestine of rats. Vice versa, the induction response in the liver is higher in rats compared to minipigs. ● We could show in the rat model that the mode of daily oral PAH intake severely affects the extent of CYP1A1 induction. **Conclusions:** Because the soil doses applied in our exposure experiments with minipigs and rats lead to strong CYP1A1 induction in several organs and are close to the amounts which are taken up by playing children, our results are highly relevant for human risk considerations. Therefore, adequate test methods reflecting the observed induction effects should be developed. The serious differences in the response patterns between minipigs and rats emphasize the problem to identify a suitable animal model for humans with respect to pollutant exposure. Fundamental research is still required to solve this problem.

Einleitung und Fragestellung

Als Folge einer Schadstoffexposition lassen sich im Säugetierorganismus schnell eintretende biochemische Veränderungen insbesondere des Cytochrom P450-Systems feststellen. Enzyme dieses fremdstoffmetabolisierenden Systems werden durch aufgenommene Schadstoffe selektiv induziert oder supprimiert und stellen somit prospektive Effektbiomarker für Expositionen dar (Ioannides & Parke, 1993). Biomarker werden in zunehmendem Maße zur Beurteilung von Schadstoffrisiken eingesetzt (Vainio, 2001). Wesentlich für die Beurteilung der biochemischen Effekte ist, dass sie integrativ das Ergebnis verschiedener vorgeschalteter Prozesse wie Schadstoff-Mobilisierung, -Resorption, und -Transport sowie der Primärmetabolisierung im Eintrittsgewebe darstellen. Zudem werden synergistische Wirkungen der zahlreichen in Schadstoffgemischen vorkommenden Komponenten auf die verschiedenen Prozesse integriert. Die genannten Parameter lassen sich bisher in *in vitro*-Tests nur schlecht oder gar nicht erfassen und werden von Verfahren, die auf Zell- oder Gewebekultur basieren, nicht reflektiert. Eine annähernd realistische Abschätzung des Humanrisikos gegenüber Umweltschadstoffen läßt sich daher bislang nur anhand von Expositionsversuchen in Tiermodellen vornehmen. Die mit dem gewählten Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse liefern die Basis für zu entwickelnde adäquate *in vitro*-Verfahren. Im hier geförderten Projekt haben wir das Minischwein als Modellorganismus für den Menschen verwendet, da es hinsichtlich der für unsere Fragestellung relevanten physiologischen und biochemischen Parametern dem Menschen sehr ähnlich ist. Dies gilt insbesondere für die Physiologie des Gastrointestinaltrakts (Swindle & Smith, 1998; Květina et al., 1999) und die Eigenschaften des Cytochrom P450-Systems (Anzenbacher et al., 1998; Skaanild & Friis, 1997; Skaanild & Friis, 1999).

Fokussiert haben wir unsere Untersuchungen auf den oralen Aufnahmepfad und hinsichtlich der Schadstoffe auf polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), die als Bodenkontaminanten primär auf Industrieflächen vorkommen. Sie finden sich aber auch in Anschüttungen oder Bodenauffüllungen anderweitig genutzter Flächen. So wurde im Projekt neben drei Industrieböden auch der belastete Boden einer Kleingartenanlage berücksichtigt.

Projektziel war es, zu untersuchen, ob und in welcher Weise bestimmte Enzyme des P450-Systems bei Minischweinen durch die orale Aufnahme PAK-kontaminierter Böden in ihrer Expression moduliert werden. Hierbei wurden die Bodendosierungen so ausgewählt, dass sie einem realistischen Bereich der Aufnahme durch den Menschen nahekommen. Speziell haben wir das durch PAK induzierbare Enzym CYP1A1 als Effektbiomarker in verschiedenen Organen des Minischweins enzymatisch und immunchemisch bestimmt. Ergebnisse aus entsprechenden Versuchen mit Ratten sollen Einblicke in die Spezifitäten der beiden

eingesetzten Tiermodelle gewähren und die Frage klären helfen, ob sie als Alternativ- oder Konkurrenzmodelle zu betrachten sind.

Material und Methoden

Versuchstiere

Göttinger Minischweine (MS) wurden von Ellegaard Minipigs (Dalmose, Dänemark) bezogen. Für Expositionsversuche mit verschiedenen Böden (Carl 1, Lothringen 1, Lothringen 2, Bruchsal) wurden jeweils Gruppen von 4 Tieren eingesetzt. Zudem wurde eine nicht-exponierte Kontrollgruppe gleicher Größe untersucht. Für die Expositionsversuche im Rattenmodell wurden männliche Ratten des Stamms Sprague-Dawley (Charles River Deutschland, Extertal) in Verbindung mit den Böden Carl 1, Lothringen 2 und Bruchsal eingesetzt. Basisdaten zu den Versuchstieren finden sich in den Tabellen 1 und 2.

| Tabelle 1. Basisdaten zu den eingesetzten Minischweinen | | | | | |
|---|------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------|
| Tier Nr. | Geschlecht | Exposition | Alter (Tage) bei Versuchsende | Gewicht (kg) bei Expositions- | |
| | | | | Beginn | Ende |
| MS-01 | m | Carl 1 | 66 | 4.1 | 6.2 |
| MS-02 | m | | 110 | 5.7 | 7.3 |
| MS-03 | m | | 144 | 7.7 | 8.9 |
| MS-04 | m | | 165 | 10.2 | 9.8 |
| MS-05 | w | Kontrolle nicht-exponiert | 84 | -- | 5.4 |
| MS-06 | w | | 87 | -- | 5.5 |
| MS-07 | m | | 84 | -- | 5.4 |
| MS-08 | m | | 87 | -- | 5.7 |
| MS-13 | w | Lothringen 2 | 95 | 3.9 | 5.7 |
| MS-14 | w | | 98 | 4.1 | 5.4 |
| MS-15 | m | | 99 | 4.7 | 6.1 |
| MS-16 | m | | 100 | 4.3 | 5.6 |
| MS-21 | w | Lothringen 1 | 97 | 4.9 | 6.3 |
| MS-22 | w | | 101 | 4.8 | 6.3 |
| MS-23 | m | | 100 | 4.8 | 6.4 |
| MS-24 | m | | 100 | 4.7 | 6.3 |
| MS-29 | w | Bruchsal | 89 | 4.3 | 5.3 |
| MS-30 | w | | 89 | 4.5 | 6.1 |
| MS-31 | m | | 95 | 4.1 | 5.6 |
| MS-32 | m | | 87 | 4.3 | 5.8 |

| Tabelle 2. Basisdaten zu den eingesetzten Ratten | | | | |
|--|--------------------|-----------------|------------------------------------|------|
| Tier Nr. | Applikations-Modus | Exposition | Körpergewicht (g) bei Expositions- | |
| | | | Beginn | Ende |
| RT-01 | Futter | Lothringen 2 | 292 | 317 |
| RT-02 | Futter | | 321 | 341 |
| RT-03 | Futter | Carl 1 | 301 | 326 |
| RT-04 | Futter | | 316 | 337 |
| RT-05 | Bolus | Carl 1 | 223 | 255 |
| RT-06 | Bolus | | 220 | 265 |
| RT-07 | Bolus | | 194 | 226 |
| RT-08 | Bolus | | 221 | 247 |
| RT-09 | Bolus | Lothringen 2 | 216 | 267 |
| RT-10 | Bolus | | 208 | 253 |
| RT-11 | Bolus | | 200 | 227 |
| RT-12 | Bolus | | 200 | 217 |
| RT-13 | Bolus | Bruchsal | 229 | 235 |
| RT-14 | Bolus | | 229 | 262 |
| RT-15 | Bolus | | 235 | 266 |
| RT-16 | Bolus | | 258 | 299 |

Bodenmaterial

Die verwendeten PAK-belasteten Bodenmaterialien stammen von Industrieflächen aus dem Ruhrgebiet (Carl und Lothringen) und aus einer Kleingartenanlage in Baden-Württemberg (Bruchsal). Angaben zu den Böden sowie die Ergebnisse der PAK-Analysen (16-PAK_{EPA}) sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt. Sie zeigen die Analysenwerte für die PAK nach EPA (Environmental Protection Agency, USA) mit der Ausnahme von Naphthalin, das aufgrund seiner Flüchtigkeit zu variablen, nicht reproduzierbaren Analyseergebnissen für einzelne Böden führt. Die Analyseergebnisse wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Wilhelm (Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt. Für die Versuche mit Ratten wurden die Bodenproben durch Mahlen und Sieben auf eine Korngröße von < 200 µm gebracht.

Bodenapplikation

Pro kg Körpergewicht wurden sowohl Minischweinen als auch Ratten 0.5 g Boden/Tag verabreicht. Minischweine und Ratten erhielten jeweils eine tägliche Bodendosis von 0.5 g/kg Körpergewicht eingemischt in wenig Nahrungsbrei bzw. eingearbeitet in trockene Futter-Pellets. Nach Nahrungskarenz über Nacht wurde den Tieren morgens das dotierte Futter angeboten. Nach der Aufnahme stand dann nicht-dotiertes Futter *ad libitum* bis zum Abend zur Verfügung. Die Gesamtdauer der Exposition betrug für die Minischweine 28 und für die Ratten 14 Tage.

| Tabelle 3. Basisdaten zu den eingesetzten Böden | | | | |
|--|--|---------------------|----------------------|--|
| Boden | Carl 1 | Lothringen 1 | Lothringen 2 | Bruchsal |
| Abkürzung | CA1 | LO1 | LO2 | BRU |
| Bodenart | Oberboden (0 – 20 cm) Auffüllung | Anschüttung | Gewachsener Boden | Erdaushub aus Kleingartenanlage: Mutterboden mit darunterliegendem Schutt und Müll |
| % Sandanteil | 60,2 | 55,7 | 60,2 | 44,8 |
| % Schluffanteil | 32,4 | 36,7 | 32,9 | 38,3 |
| % Tonanteil | 7,4 | 7,6 | 6,9 | 16,9 |
| % organischer Kohlenstoff | 28,8 | 24,3 | 2,95 | 7,8 |
| Pb (mg/kg) | 786 | 200 | 113 | 237 |
| Hg (mg/kg) | 19 | 3,0 | 6,5 | 0,5 |
| As (mg/kg) | 38 | 26 | 13 | 12 |

Um den Anschluß an früher bereits durchgeführte Expositionsversuche mit Ratten zu erhalten, wurde in einer weiteren Versuchsserie Boden in handelsübliches Rattenfutter wie beschrieben (Roos et al., 1999) eingearbeitet und in definierten Futtermengen verabreicht, die bezogen auf das Körpergewicht wieder einer Dosierung von 0.5 g Boden/kg Körpergewicht entsprachen. Im Gegensatz zu früheren Applikationen wurde der Boden allerdings nicht zu 5 % sondern aus Gründen des Dosierungsangleichs nur zu 0.42 % in das Futter eingearbeitet. Die aufgenommenen Schadstoffmengen gehen aus Tabelle 6 (unter Ergebnisse) hervor.

Gewebe- und Mikrosomen-Präparationen

Präparation von Mikrosomen aus Leber, Niere, Lunge und Milz. Mikrosomen aus den verschiedenen Organen von Ratten und Minischweinen wurden wie beschrieben isoliert (Guengerich, 1977).

Präparation von Mikrosomen des Duodenums. Das Duodenum wurde in 0.9% eiskalter NaCl-Lösung gewaschen. Danach wurde die Mucosazellschicht mit einem Zellschaber vom Bindegewebe gelöst und in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 250 mM Saccharose, 3 U/ml Heparin, pH 7.5 aufgenommen. Zum Schutz vor Protease-Aktivitäten enthielt dieser Puffer ein Gemisch aus verschiedenen Protease-Inhibitoren (Complete™, 1 Tablette/50 ml). Nach Homogenisation der Zellen im Dounce-Potter wurde die Suspension dreimal für 2 sec mit Ultraschall behandelt. Die nachfolgende Mikrosomenisolierung erfolgte durch differentielle Zentrifugation entsprechend der Isolierung aus den anderen Organen.

Isolierung von Leukozyten aus Heparin-Blut. 10 ml (Ratte) oder bis zu 30 ml (Minischwein) Heparin-Blut wurden mit dem vierfachen Volumen Lyse-Puffer (38.8 mM NH₄Cl;

2.5 mM KHCO₃; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM PMSF; 1 U Heparin/ml; pH 8.0) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die nach Zentrifugation (5 min, 2000xg) gewonnenen Leukozyten wurden noch einmal in Lyse-Puffer aufgenommen und erneut für ca. 5 min auf Eis inkubiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden schließlich in 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 20% Glycerin, pH 7.4 homogenisiert. Ein Teil der Zellen wurde zur Isolierung von Mikrosomen weiterverarbeitet.

Biochemische Analytik

Bestimmung der Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität. Die Deethylierung von Ethoxyresorufin durch die Mikrosomenfraktionen wurde fluoreszenzphotometrisch durch kontinuierliche Aufzeichnung der Resorufin-Bildung bestimmt (Roos et al., 1996, 1999). Im Reaktionsansatz sind enthalten: 100 mM Tris-HCl, pH 7.8, 2.7 mM Isocitronensäure, 0.3 U/ml Isocitrat-Dehydrogenase, 2 mM MgSO₄, 50 µg/ml Rinderserumalbumin, 76 U/ml Katalase, 170 µM NADP und 2.5 µM Ethoxyresorufin. Die Reaktion wurde mit der Mikrosomenpräparation entsprechend einer Endkonzentration zwischen 1 und 100 nM P450 gestartet. Anregungs- und Emissionswellenlänge betragen 530 nm bzw. 585 nm (Burke et al., 1985).

Quantitative Bestimmung von Protein und Cytochrom P450. Cytochrom P450 wurde nach der Methode von Omura & Sato (1964) als Kohlenmonoxid-Komplex quantifiziert. Die Proteinquantifizierung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951).

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blotting. Elektrophorese, Blotting und Färbung der Proteinbanden wurden nach beschriebenen Methoden durchgeführt (Laemmli, 1970; Towbin et al., 1979; Harlow & Lane, 1988). Eine quantitative Auswertung der Immunoblots erfolgte anhand digitalisierter Bilder und entsprechender Auswertungs-Software. Eine Standardisierung der Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe von Mikrosomenstandards, die auf allen Western-Blots mitgeführt wurden. Für die semiquantitative Bestimmung von CYP1A1 und CYP2E1 wurden Lebermikrosomen von Ratten verwendet, die mit 3-Methylcholanthren bzw. Isonicotinsäurehydrazid behandelt waren. Die Substanzen sind jeweils Induktoren der beiden genannten P450-Enzyme.

Ergebnisse und Diskussion

Die im Projekt erzielten Ergebnisse lassen sich in vier Bereiche gruppieren, die sukzessive aufeinander aufbauen: (1) Methodik der Cytochrom P450-Bestimmung in Geweben des Minischweins als Grundlage für die eigentlichen Untersuchungen. (2) Analyse der basalen Expression von Cytochromen P450 in Geweben des Minischweins. (3) Quantifizierung des Effekt-Biomarkers CYP1A1 in verschiedenen Geweben des Minischweins nach oraler Verabreichung PAK-kontaminierter Böden. (4) Vergleich der Biomarker-Induktion zwischen Minischwein und Ratte nach oraler PAK-Applikation.

Die angestrebten Projektziele wurden in allen Punkten erreicht, sodass vor dem Ergebnishintergrund jetzt zu folgenden Fragen Stellung genommen werden kann:

- Ist das Cytochrom P450-Enzym CYP1A1 beim Minischwein ein geeigneter Biomarker für PAK-Expositionen?
- Eignet sich das Minischwein als Tiermodell für den Menschen hinsichtlich oraler PAK-Expositionen?
- Kommt es im Bereich realistischer Expositionen für Menschen zur meßbaren CYP1A1-Induktion in verschiedenen Geweben?
- Unterscheiden sich Minischwein und Ratte in ihren Induktionsantworten auf eine orale PAK-Exposition?

Die für die Expositionsversuche eingesetzten Böden

Für die Expositionsversuche mit Minischweinen und Ratten wurden 4 bzw. 3 Böden eingesetzt, die unterschiedliche Belastungen mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) aufwiesen (Tabelle 4). Insbesondere variieren auch die Gehalte an induktionspotenten höherkernigen Aromaten mit 5 oder 6 Ringen. Sie liegen zwischen 17 und 1079 mg/kg Boden. Mit den Böden wurde ein repräsentatives Spektrum von niedrig belastetem Material einer Kleingartenanlage (Bruchsal) bis zu hoch kontaminierten Proben von Industrieflächen (Carl 1) abgedeckt, so dass die Versuche Antworten auf Fragen nach Dosis-Wirkungs-Beziehungen und Schwellenwerten geben können.

Tabelle 4. PAK-Gehalte der für die Versuche eingesetzten Böden.

| PAK-Verbindung * | mg PAK/kg Boden | | | |
|------------------------------------|-----------------|--------------|--------------|----------|
| | Carl 1 | Lothringen 1 | Lothringen 2 | Bruchsal |
| Phenanthren | 284 ± 42 | 39 ± 13 | 309 ± 36 | 5 |
| Anthracen | 74 ± 6 | 139 ± 47 | 38 ± 7 | 1 |
| Fluoranthren | 949 ± 23 | 52 ± 4 | 130 ± 54 | 25 |
| Pyren | 672 ± 35 | 47 ± 7 | 71 ± 16 | 8 |
| Benz[a]anthracen | 405 ± 20 | 49 ± 5 | 45 ± 12 | 5 |
| Chrysen | 362 ± 6 | 88 ± 1 | 61 ± 20 | 8 |
| Benzo[b]fluoranthren | 274 ± 13 | 111 ± 10 | 34 ± 9 | 5 |
| Benzo[k]fluoranthren | 154 ± 7 | 40 ± 2 | 15 ± 4 | 3 |
| Benzo[a]pyren | 271 ± 16 | 70 ± 3 | 22 ± 7 | 5 |
| Dibenzo[ah]anthracen | 43 ± 6 | 19 ± 1 | 5 ± 2 | < 1 |
| Benzo[ghi]perylen | 161 ± 8 | 77 ± 3 | 19 ± 5 | 4 |
| Indeno[1,2,3-cd]pyren | 156 ± 8 | 49 ± 4 | 7 ± 5 | < 1 |
| Summe: PAK _{EPA} | 3805 | 780 | 756 | 74 |
| Summe: 3-4-Ring-PAK _{EPA} | 2531 | 969 | 452 | 57 |
| Summe: 5-6-Ring-PAK _{EPA} | 1059 | 366 | 102 | 17 |

* PAK-Gehalte nach EPA exklusive Naphthalin

Methodik der Bestimmung von P450-Enzymen in Geweben des Minischweins

Für vergleichende enzymatische und immunologische Bestimmungen von Cytochromen P450 ist der Erhalt ihrer strukturellen Integrität und damit auch ihrer Funktion während der Aufarbeitung der Gewebe bis hin zur Mikrosomenpräparation eine wichtige Voraussetzung. P450-Enzyme lassen sich kollektiv als CO-Komplex in reduziertem Zustand spektroskopisch quantifizieren. Dieser Komplex liefert zudem ein Kriterium für enzymatisch aktives Cytochrom P450, das ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweist. Strukturell verändertes und inaktives P450 wird durch eine Verschiebung des Maximums nach 420 nm (P420) angezeigt. Mikrosomenpräparationen aus Lebergewebe von Minischweinen enthalten fast ausschließlich bei 450 nm absorbierendes Cytochrom. Mit ähnlichen Methoden isolierte Mikrosomen aus anderen Geweben insbesondere aus Niere und Duodenum weisen allerdings hohe Anteile an P420 auf. Durch den Einsatz komplexer Gemische aus Protease-Inhibitoren, wie Complete™ von Boehringer, konnte dieses Problem gelöst werden, so dass CYP1A1 auch in Duodenum und Niere enzymatisch über die EROD-Aktivität bestimmt werden konnte. Abbildung 1 zeigt das Reaktionsschema (A) sowie typische Kinetiken der Resorufinbildung, die mit Mikrosomen des Duodenums erhalten wurden. Die Linearität der Reaktion sowie die Abhängigkeit von der eingesetzten Mikrosomenkonzentration werden hierdurch dokumentiert.

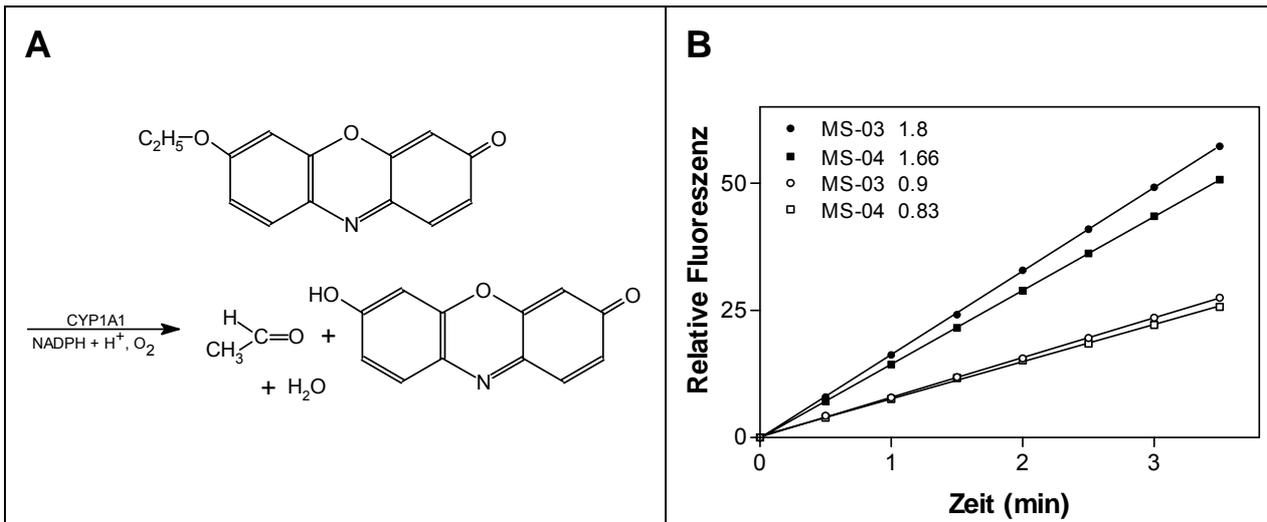


Abbildung 1. Umsetzung von Ethoxyresorufin zu fluoreszierendem Resorufin. A. Reaktionsschema. B. Kinetik der Resorufinbildung mit Duodenum-Mikrosomen der Minischweine MS-03 und MS-04 aus der Expositionsgruppe CA1. Die Bildung von Resorufin wurde fluoreszenzphotometrisch verfolgt. Die eingesetzten Konzentrationen an mikrosomalem Protein sind in µg/ml angegeben.

Zur Absicherung der enzymatischen Bestimmungen sollte CYP1A1 zusätzlich über Western-Blots als einer von der enzymatischen Aktivität unabhängigen Methode quantifiziert werden. Hierfür konnte ein Antikörper, der mit CYP1A1 des Minischweins kreuzreagiert, aus einem Set von monoklonalen Antikörpern selektiert werden, die wir gegen CYP1A1 der Ratte in einem von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) geförderten Projekt gewonnen haben. Im Western-Blot mit Lebermikrosomen des Minischweins ergibt dieser Antikörper (1A3-03) nur eine klar definierte Bande, die im SDS-Polyacrylamidgel die gleiche Mobilität wie das orthologe Enzym der Ratte aufweist (Abbildung 2). Auch für das P450-Enzym CYP2E1, das wir als konstitutiv exprimiertes und durch PAK wenig beeinflussbares P450-Enzym vergleichend mitbestimmt haben, wurde ein kreuzreagierender Antikörper gefunden (Abbildung 3).

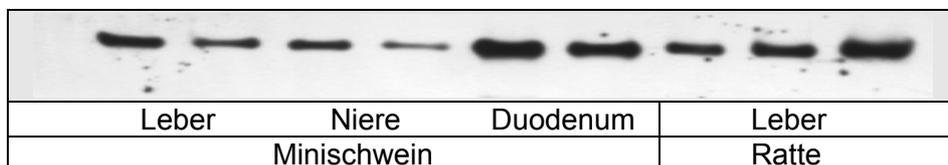


Abbildung 2. Kreuzreagierender monoklonaler Antikörper zum Nachweis von mikrosomalem CYP1A1 in verschiedenen Geweben des Minischweins im Western-Blot. Für das Minischwein sind Mikrosomen nach oraler Aufnahme des PAK-kontaminierten Bodens CA1 verwendet worden (Tier MS-01). Zum Vergleich wurden Lebermikrosomen von Ratten aufgetragen, die intraperitoneal mit 3-Methylcholanthren als CYP1A1-Induktor behandelt wurden.

Basalexpression von Gesamt-P450 und von CYP1A1 in Geweben des Minischweins

Zur Beurteilung von Induktionseffekten auf das P450-System haben wir notwendigerweise die basale Expression der Enzyme bestimmt (Tabelle 5). Für das Minischwein sind die Literaturdaten diesbezüglich spärlich (Anzenbacher 1998, Skaanild & Friis, 1997 und 1999), insbesondere sind uns bisher keine entsprechenden Daten für extrahepatische Gewebe bekannt gewesen.

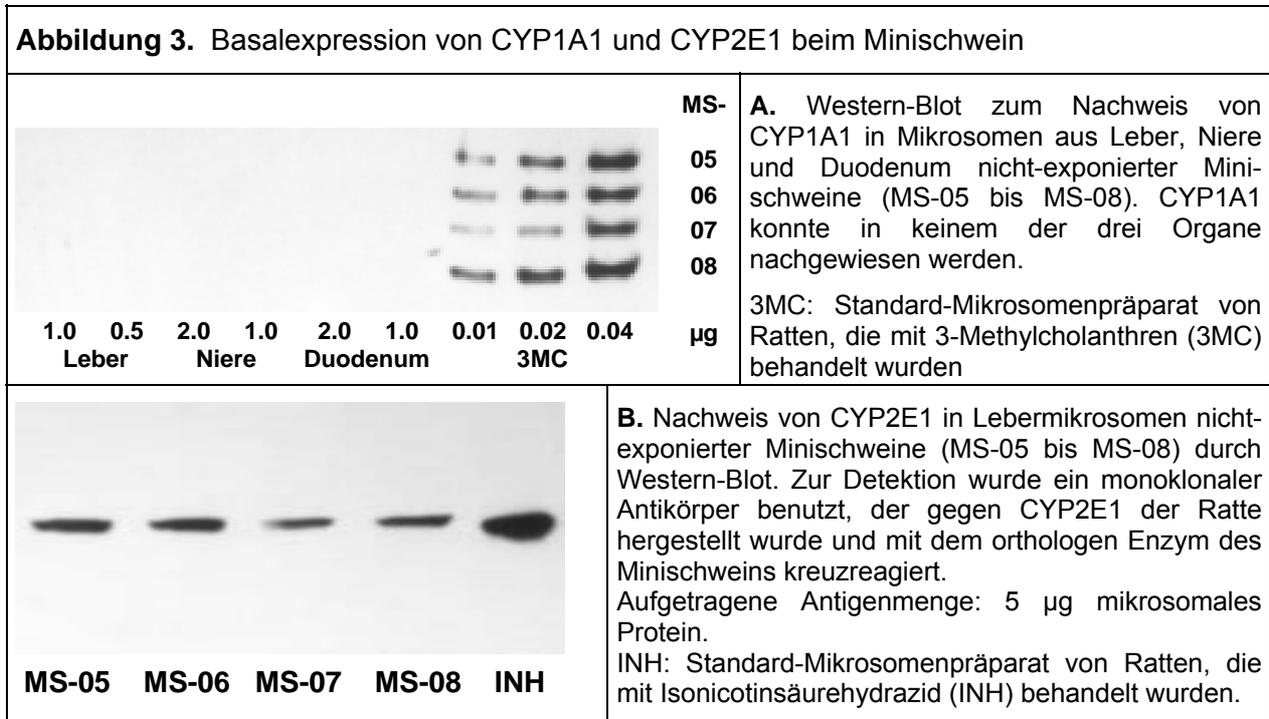
Tabelle 5. Cytochrom P450-Gehalte, EROD-Aktivitäten und CYP1A1-Gehalte in Mikrosomen verschiedener Organe nicht-exponierter Minischweine (MS-05 bis 08).

| | P450-Gehalt ^a | EROD-Aktivität ^b | CYP1A1-Gehalt ^c |
|----------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Leber | 0.94 ± 0.08 | 194 ± 29 | n.n. |
| Duodenum | 0.15 ± 0.06 | 11 ± 5 | n.n. |
| Niere | 0.36 ± 0.07 | 4.4 ± 2.7 | n.n. |

^a Gesamt-P450: nMol P450/mg Protein. ^b EROD: pMol Resorufin * mg Protein⁻¹ * min⁻¹. ^c Relativer CYP1A1-Gehalt nach Western Blot. n.n., nicht nachweisbar. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 4 Bestimmungen.

Die lebermikrosomalen Gehalte an Gesamt-Cytochrom P450 liegen nach unseren Ergebnissen beim Minischwein bei 0.94 nMol P450/mg Protein (n = 5 Tiere). Dieser Wert unterscheidet sich somit nicht von denen der Ratte (Roos et al., 1996) und des Menschen (Roos, unveröffentlicht). Ähnliches gilt auch für die basale lebermikrosomale EROD-Aktivität des Minischweins, die wie bei Mensch und Ratte ca. 200 pMol Resorufin * mg Protein⁻¹ * min⁻¹ beträgt (Anzenbacher et al., 1998; Roos et al., 1996). Trotz vorhandener EROD-Aktivität, lässt sich in Lebermikrosomen von Minischweinen mit dem Western-Blot kein CYP1A1 nachweisen (Tabelle 5 und Abbildung 3). Die gemessene EROD-Aktivität von 194 pMol Resorufin * mg Protein⁻¹ * min⁻¹ ist also offenbar nicht auf CYP1A1 zurückzuführen und beruht, wie bei anderen Säugetier-Spezies auch, vermutlich auf dem in der Leber konstitutiv exprimierten CYP1A2. Im Vergleich zur Leber weisen Niere und Duodenum niedrigere P450-Gehalte auf. Die basalen mikrosomalen EROD-Aktivitäten der beiden Organe liegen an der Nachweisgrenze unserer Methode. Mit Western-Blots lässt sich entsprechend kein CYP1A1 in Niere und Duodenum nachweisen (Abbildung 3A). Somit wird CYP1A1 konstitutiv weder in der Leber, noch in Niere und Duodenum von Minischweinen in nennenswertem Ausmaß exprimiert. Im Gegensatz zum CYP1A1 ist das P450-Enzym CYP2E1 in der Leber nicht-exponierter Minischweine nachweisbar (Abbildung 3B). Wir haben die Expression dieses Enzyms als Positiv-Referenz

benutzt, da es wie bei Mensch und Ratte in der Leber konstitutiv vorhanden ist und zudem durch PAK nicht induziert wird.



Die bis hierher geschaffenen methodischen Voraussetzungen und erzielten Grundlagenergebnisse stellen die notwendige Basis für die folgenden Expositionsversuche mit Minischweinen dar.

Orale PAK-Exposition und Induktion von CYP1A1

Aufgenommene PAK-Dosen

Die für die Expositionsversuche ausgewählten Böden unterscheiden sich wie schon erwähnt deutlich in ihren PAK-Gehalten (Tabelle 4). Dies betrifft sowohl die Gesamt-PAK als auch insbesondere die Gehalte an höherkernigen PAK mit 5 und 6 aromatischen Ringen (5- und 6-Ring PAK). Die aus den PAK-Analysen der Bodenmaterialien berechneten täglich aufgenommenen Schadstoffdosen decken einen weiten Bereich ab und gelten gleichermaßen für die Expositionsversuche mit Minischweinen und Ratten (siehe unten). Sie sind in der folgenden Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6. Täglich aufgenommene Dosen an PAK bzw. 5- und 6-Ring-PAK.

| Exposition gegenüber Boden | Carl 1 | Lothringen 1 | Lothringen 2 | Bruchsal |
|---------------------------------------|---------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| µg PAK/kg Körpergewicht | 1902 | 390 | 379 | 37 |
| µg 5- und 6-Ring PAK/kg Körpergewicht | 530 | 183 | 51 | 9 |

Die Dosen gelten für alle durchgeführten Versuche, unabhängig von der Tierart (Mischwein, Ratte) und vom Verabreichungsmodus. Tägliche Bodenaufnahme: jeweils 0.5 g/kg Körpergewicht.

Expositionsabhängige Induktion von CYP1A1 in der Leber von Mischweinen

Die orale Aufnahme aller eingesetzten PAK-kontaminierten Böden führt beim Mischwein zu einer erhöhten CYP1A1-Expression in der Leber (Abbildung 4) (Roos, 2000c; Roos et al., 2000a). Selbst die niedrig belasteten Böden LO2 und BRU bewirken eine zwar nur minimale aber doch signifikante Induktion der lebermikrosomalen EROD-Aktivität, die durch einen entsprechenden Nachweis der CYP1A1-Induktion auf Proteinebene durch Western-Blotanalyse bestätigt werden konnte (Abbildung 4B). Die beiden höher kontaminierten Böden Carl 1 und Lothringen 1 führen nach oraler Aufnahme zu einer deutlichen Induktion von CYP1A1, wobei die entsprechenden EROD-Aktivitäten 9-fach beziehungsweise 6.4-fach über dem Hintergrund liegen.

In zahlreichen Expositionsversuchen mit Ratten haben wir eine gute Korrelation zwischen der lebermikrosomalen EROD-Aktivität und den Bodengehalten an höherkernigen PAK mit 5 und 6 Ringen gefunden (Dott et al., 1999; Roos et al., 1996, 1997, 2000a). Abbildung 5 zeigt eine vergleichbare Korrelation - hier allerdings direkt auf die aufgenommene Dosis bezogen - für die mit Mischweinen gewonnenen Daten (siehe auch Tabelle 7). Aus den wenigen Datenpunkten ist keine Kurvenform ableitbar. Ihre Verteilung widerspricht zumindest nicht dem bei Ratten gefundenen sigmoiden Verlauf. Bemerkenswert ist das vergleichsweise hohe Induktionspotential des nur gering mit PAK belasteten Bodens BRU, der zu einer höheren EROD-Aktivität in der Leber führt als der stärker belastete Boden LO2. Dieses Ergebnis wird durch die immunchemische Analyse untermauert (Abbildung 4B). Das erhöhte Induktionspotential des Bodens BRU für CYP1A1 könnte auf analytisch nicht erfaßte Substanzen wie zum Beispiel polychlorierte Biphenyle (PCB) oder Dioxin zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der enzymatischen Analysen konnten durch immunchemische CYP1A1-Bestimmungen mit dem Western-Blot bestätigt werden (Abbildung 4B). Eine akzeptable Korrelation zwischen den mit beiden eingesetzten Methoden erhaltenen Ergebnisse zeigt, dass sie gleichermaßen für eine CYP1A1-Quantifizierung geeignet sind (Abbildung 4C).

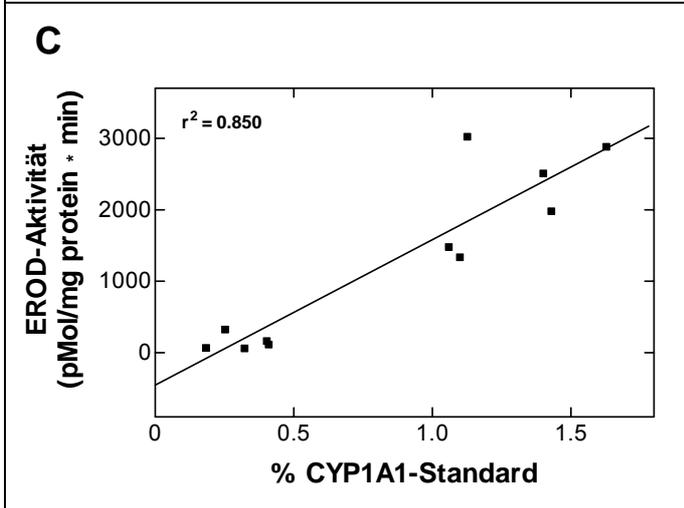
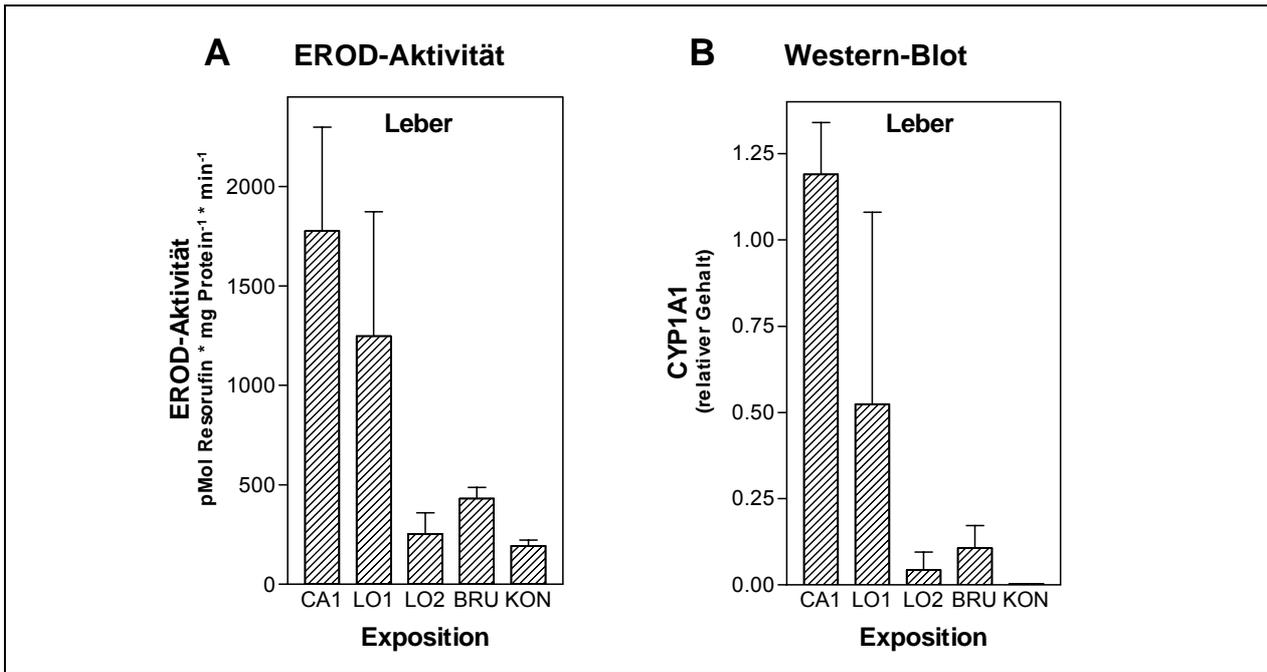


Abbildung 4. Enzymatische und immunologische Quantifizierung von CYP1A1 im Vergleich.

A. Gemittelte lebermikrosomale EROD-Aktivitäten der einzelnen Expositionsgruppen.

B. Gemittelte Werte der semiquantitativen Bestimmung von lebermikrosomalem CYP1A1.

C. Korrelation der mit beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse. Die Mikrosomenproben stammen aus Leber, Niere und Darm verschiedener Tiere.

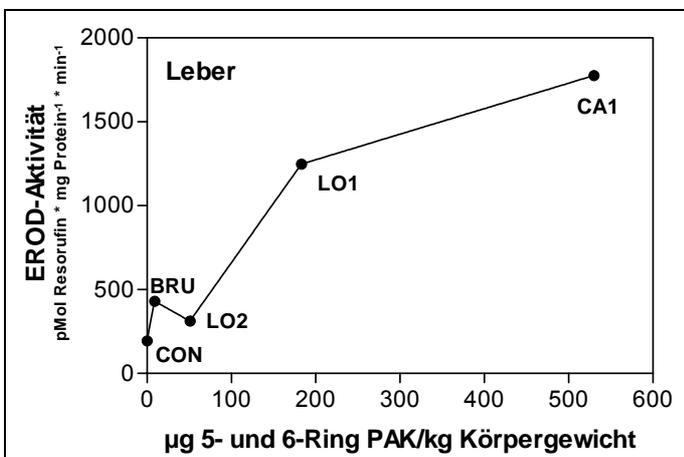


Abbildung 5. Abhängigkeit der lebermikrosomalen EROD-Aktivität von der aufgenommenen Menge an 5- und 6-Ring-PAK. Angegeben ist die täglich aufgenommene Dosis basierend auf den Böden Bruchsal (BRU), Lothringen 1 (LO1), Lothringen 2 (LO2) und Carl 1 (CA1). Die Basalaktivität der nicht-exponierten Kontrollgruppe ist ebenfalls aufgeführt (CON).

Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von jeweils 4 bis 6 Messungen von 4 Tieren, entsprechend also mindestens 16 Einzelmessungen, dar

Expositionsabhängige CYP1A1-Induktion in extrahepatischen Geweben des Minischweins

Nach Mobilisierung im Dünndarm gelangen oral aufgenommene PAK zunächst in die Mucosazellen und haben hier bereits die Möglichkeit, mit Rezeptoren, Transportproteinen und Enzymen zu interagieren. Über den Ah-Rezeptor bewirken sie wie in der Leber die Induktion von CYP1A1, so dass in den Darmzellen ein primärer Metabolismus von PAK initiiert wird. Die orale Aufnahme der hier untersuchten PAK-belasteten Böden führt zu deutlichen Induktionseffekten für CYP1A1 in Dünndarmzellen der Minischweine (Tabelle 7, Abbildungen 6 und 7). Dies gilt insbesondere auch wieder für die niedrig belasteten Böden Lothringen 2 und Bruchsal. Bezogen auf die Basalrate bewirken sie eine etwa 40- bzw. 7.5-fache Steigerung der EROD-Aktivität. Somit kann beim Minischwein duodenales CYP1A1 als sensitiverer Biomarker für oral aufgenommene PAK betrachtet werden als hepatisches CYP1A1, das durch die beiden Böden bezogen auf die Basalaktivität nur geringfügig erhöht wird.

Tabelle 7. Mikrosomale EROD-Aktivitäten in verschiedenen Organen von Minischweinen nach oraler Aufnahme PAK-kontaminierter Böden (CA1, LO1, LO2, BRU).

| Exposition (Boden) | Leber | Duodenum | Niere |
|----------------------|------------|------------|-------------|
| CA1 | 1776 ± 523 | 2501 ± 458 | 90.4 ± 53.3 |
| LO1 | 1248 ± 625 | 1280 ± 234 | 18.3 ± 7.6 |
| LO2 | 312 ± 39 | 405 ± 129 | 30.1 ± 8.3 |
| BRU | 431 ± 56 | 83 ± 10 | 12.9 ± 5.5 |
| CON, nicht-exponiert | 194 ± 29 | 11 ± 5 | 4.4 ± 2.7 |

Aktivität: pMol Resorufin · mg Protein⁻¹ · min⁻¹. Mittel und Standardabweichungen der Aktivitäten wurden aus Mittelwerten von jeweils 4 Bestimmungen von 4 Tieren einer Untersuchungsgruppe berechnet. CON, Daten der nicht-exponierten Minischweine (Kontrollgruppe).

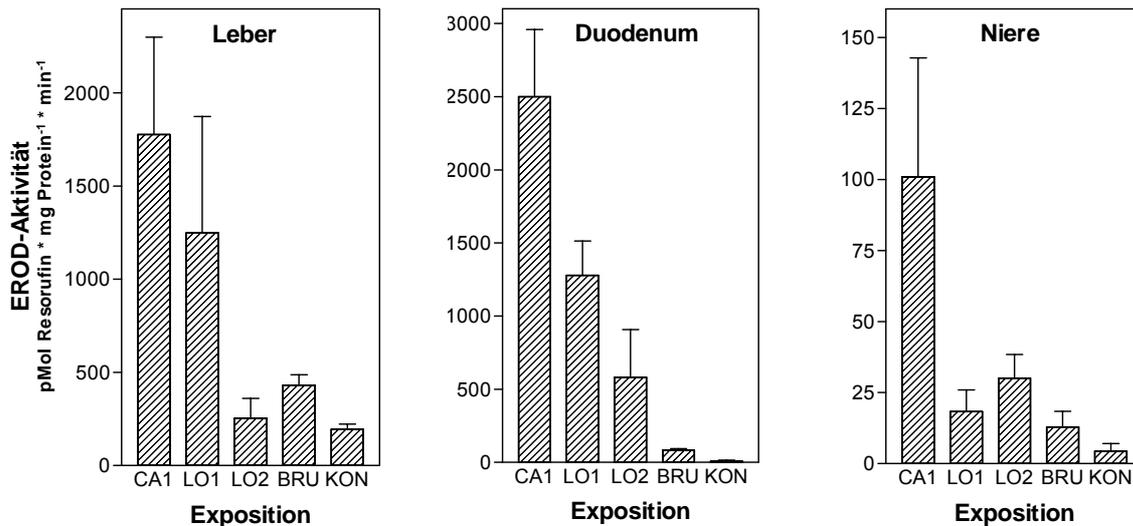


Abbildung 6. Effekte oral aufgenommener PAK-kontaminierter Böden auf die mikrosomale EROD-Aktivität in Leber, Duodenum und Niere von Minischweinen. CA1, Boden Carl 1; LO1, Boden Lothringen 1; LO2, Boden Lothringen 2; BRU, Boden Bruchsal; KON, Kontrolle (nicht exponierte Tiere). Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen, die sich aus Bestimmungen mit jeweils 4 Tieren und mindestens 4 Einzelbestimmungen pro Tier, also mindestens 16 Einzelwerten, errechnen.

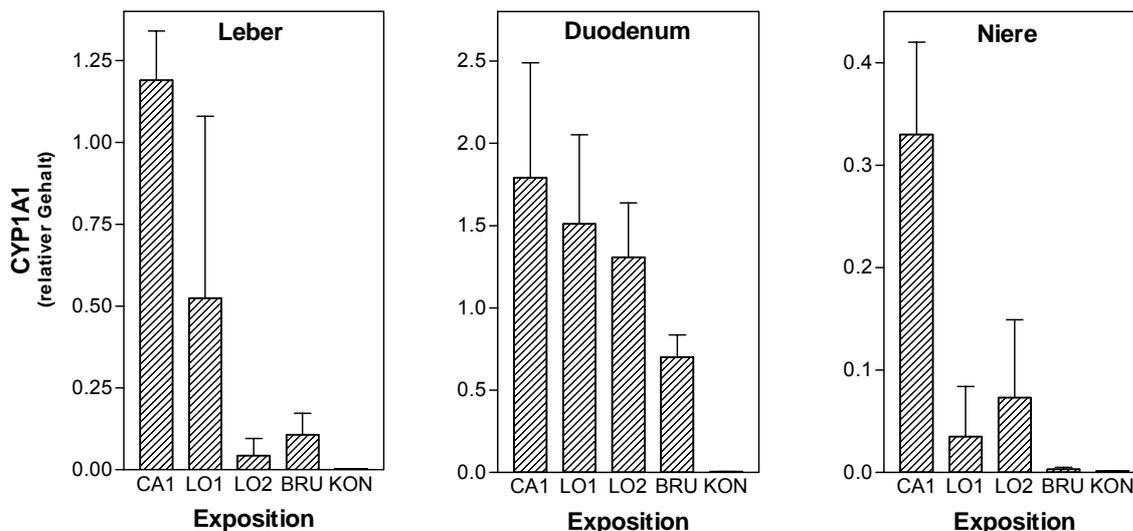


Abbildung 7. Induktion von CYP1A1 durch oral aufgenommene PAK-kontaminierte Böden in Leber, Duodenum und Niere von Minischweinen. Semiquantitative Bestimmung durch Western-Blots. CA1, Boden Carl 1; LO1, Boden Lothringen 1; LO2, Boden Lothringen 2; BRU, Boden Bruchsal; KON, Kontrolle (nicht exponierte Tiere). Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen, die sich aus Bestimmungen mit jeweils 4 Tieren und mindestens 2 Einzelbestimmungen pro Tier, also mindestens 8 Einzelwerten, errechnen.

Nicht-metabolisierte PAK erreichen offenbar auch die Niere und bewirken hier ebenfalls eine Induktion von CYP1A1. Die renalen EROD-Aktivitäten sind allerdings vergleichsweise gering (Tabelle 7) und liegen mindestens 1 Größenordnung unter den Werten für Leber und Duodenum. Selbst der wenig mit höherkernigen PAK belastete Boden Lothringen 2, der in der

Leber nur zu einer marginalen CYP1A1-Induktion führt, zeigt einen deutlichen Effekt in der Niere.

Die in Abbildung 8 dargestellten Dosisabhängigkeiten der CYP1A1-Induktion für Duodenum und Niere lassen vermuten, dass durch die Expositionen die maximalen CYP1A1-Spiegel noch nicht erreicht werden. Durch Extrapolation läßt sich für das Duodenum eine maximal induzierbare Aktivität von 5160 ± 170 , für die Niere von 130 ± 13 pMol Resorufin * mg Protein⁻¹ * min⁻¹ berechnen (für die Berechnung der hyperbolen Funktion durch nicht-lineare Regression wurde der Wert für den Boden LO1 bei der Niere nicht berücksichtigt!).

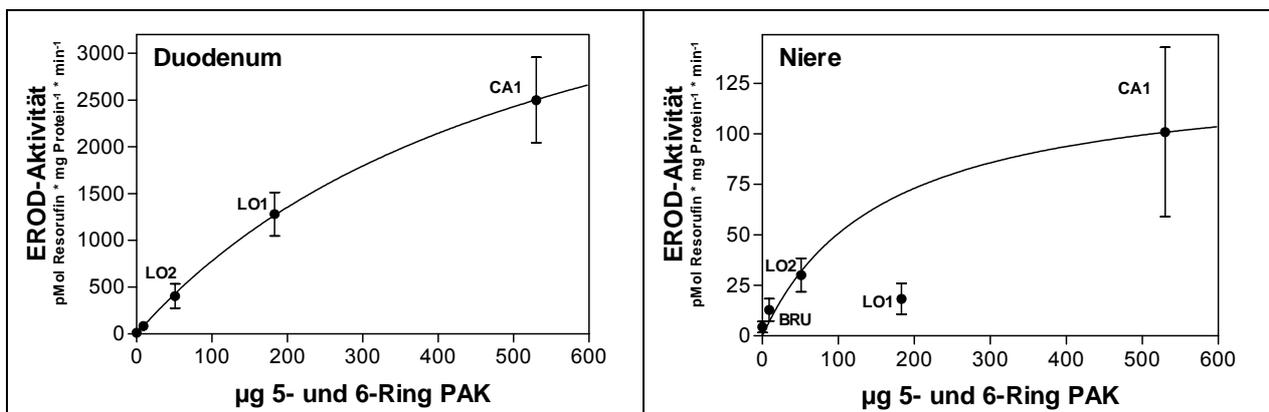


Abbildung 8. Abhängigkeit der mikrosomalen EROD-Aktivität des Duodenums und der Niere von der aufgenommenen Menge an 5- und 6-Ring-PAK. Angegeben ist die täglich aufgenommene Dosis pro kg Körpergewicht. Die Daten basieren auf Expositionsversuchen mit den Böden Bruchsal (BRU), Lothringen 1 (LO1), Lothringen 2 (LO2) und Carl 1 (CA1). Die Basalaktivität der nicht-exponierten Kontrollgruppe ist ebenfalls aufgeführt.

Da CYP1A1 in vielen Geweben induzierbar ist, läßt sich hierdurch die Verteilung aufgenommener PAK im Organismus verfolgen. Wir haben daher die CYP1A1-Spiegel zusätzlich in Mikrosomen von Lunge und Milz exemplarisch für die Expositionsgruppe CA1 und die nicht-exponierte Kontrollgruppe bestimmt. Im Gegensatz zu Leber, Duodenum und Niere lassen sich in Lunge und Milz durch Western-Blots geringe konstitutive Spiegel an CYP1A1 nachweisen. Nach oraler Aufnahme PAK-kontaminierter Böden kommt es tatsächlich auch in diesen Organen zu einer deutlichen CYP1A1-Induktion. Der durch Western-Blots bestimmte mikrosomale CYP1A1-Gehalt der Lunge ist sogar höher als in der Niere, während der Gehalt in der Milz dem in der Niere gleicht (Abbildung 9).

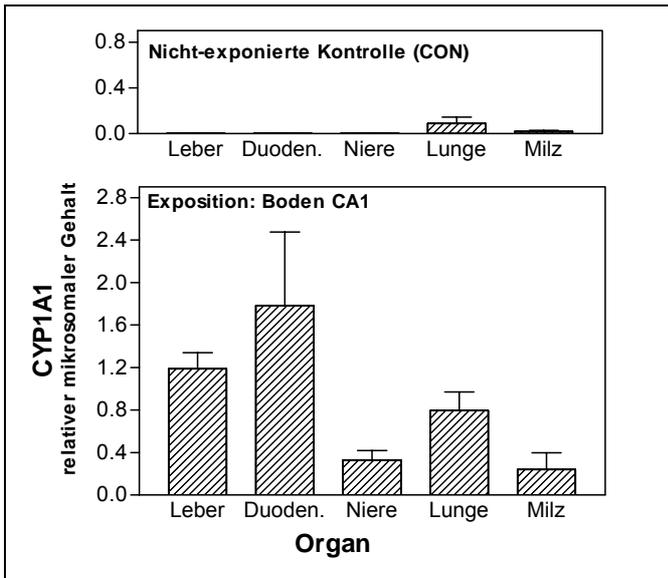


Abbildung 9. Induktion von CYP1A1 in verschiedenen Organen des Minischweins nach oraler Aufnahme PAK-kontaminierter Böden. CYP1A1 wurde mittels Western-Blots semiquantitativ bestimmt.

Es ist für Ratten und den Menschen bekannt, dass auch Leukozyten CYP1A1 exprimieren können (Spatzenegger et al., 2000). Auf der Transkriptebene wurde leukozytäres CYP1A1 sogar als Effektbio marker benutzt (Vanden Heuvel et al., 1993). Wir konnten CYP1A1 auch auf Proteinebene in Leukozytenmikrosomen von Minischweinen nachweisen, die gegenüber dem hoch PAK-kontaminierten Boden Carl 1 exponiert waren (Abbildung 10). Die im Western-Blot einzusetzenden hohen Proteinmengen verdeutlichen das geringe Expressionsniveau von CYP1A1 in Leukozyten. Gegenüber Lebermikrosomen induzierter Ratten wurden bis zu 7500-fach höhere Proteinmengen eingesetzt, die zudem sogar geringere Bandenintensitäten hervorrufen. Die niedrige Expression auf Proteinebene spiegelt sich auch auf der Transkriptebene wider. So verwenden Vanden Heuvel et al. (1993) vergleichsweise hohe Zyklenzahlen (30) für ihren Nachweis des leukozytären CYP1A1-Transkripts durch RT-PCR. Eine Bestimmung von Biomarkern in Leukozyten, wie hier von CYP1A1, ist für diagnostische Zwecke aufgrund der leichten Verfügbarkeit dieser Zellen interessant.

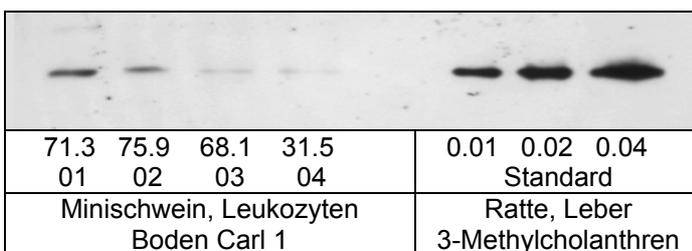


Abbildung 10. Nachweis von CYP1A1 in Leukozyten der Minischweine MS-01 bis 04 nach oraler Aufnahme des PAK-kontaminierten Bodens Carl 1. Zum Vergleich: Lebermikrosomen der Ratte als Standard (siehe Methoden). Aufgetragene Proteinmengen sind in μg angegeben.

Expression von CYP2E1 in der Minischwein-Leber

CYP2E1 wird bei Säugetieren in verschiedenen Organen konstitutiv exprimiert oder ist in diesen durch kleine Moleküle wie Toluol oder Trichlorethylen induzierbar. PAK beeinflussen unseres Wissens die basale CYP2E1-Expression in der Leber aber nicht. Wir haben CYP2E1 als Vergleichsparameter parallel zu CYP1A1 mit Western-Blots in Lebermikrosomen quantifiziert. Innerhalb der Expositionsgruppen und der Kontrollgruppe findet man ähnlich hohe aber auch individuell schwankende lebermikrosomale CYP2E1-Spiegel. Diesen Sachverhalt soll Abbildung 11A am Beispiel der Expositionsgruppe CA1 und der nicht-exponierten Tiere verdeutlichen. Der Vergleich zwischen den Untersuchungsgruppen (Abbildung 11B) bestätigt, dass CYP2E1 durch die orale PAK-Exposition nicht induziert wird. Während man ähnlich hohe CYP2E1-Spiegel bei den Expositionsgruppen CA1 und LO1 sowie der Kontrollgruppe (CON) findet, kommt es durch den oral aufgenommenen Boden LO2 offenbar aber zu einer signifikanten Suppression von CYP2E1. Die Ursache für diesen Effekt ist unklar. Bekannt ist, dass PAK bei der Ratte die Expression bestimmter konstitutiv exprimierter P450-Enzyme, wie CYP2C11, unterdrücken können (Lee & Riddick, 2000). Diesem Effekt liegt eine Beeinflussung des Wachstumshormon-Spiegels zugrunde, der regulierend in die CYP2C11-Expression eingreift (Timsit & Riddick, 2000).

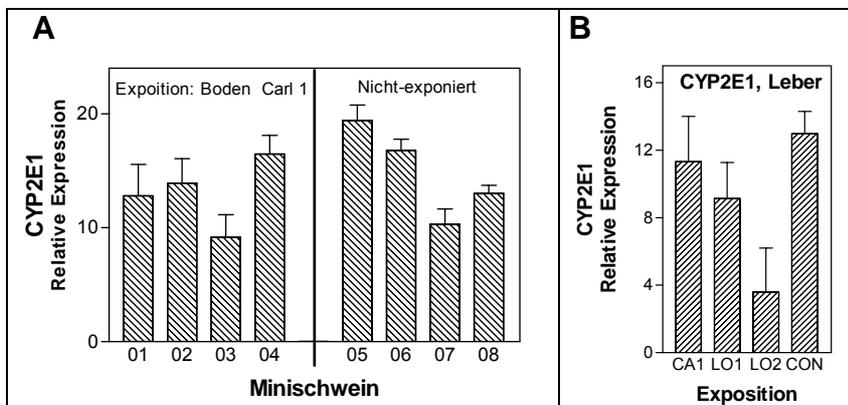


Abbildung 11. Lebermikrosomale CYP2E1-Spiegel PAK-exponierter und unbehandelter Minischweine. CYP2E1 wurde semiquantitativ mit Western-Blots bestimmt. A. Individuelle Schwankungsbreite der CYP2E1-Expression in der nicht-exponierten und einer exponierten Gruppe (CA1). B. Vergleich zwischen den Expositionsgruppen.

Individuelle Abweichungen vom Induktionsmuster

Innerhalb der Untersuchungsgruppen von jeweils 4 Minischweinen gab es Individuen mit abweichender Biomarker-Antwort auf die Exposition. So war die EROD-Aktivität eines Tieres (MS-03) nach Exposition gegenüber dem stark belasteten Boden Carl 1 in der Leber kaum erhöht. Die Schadstoffaufnahme durch das Tier zeigte sich aber in der hohen EROD-Aktivität der Darmmikrosomen, die der der anderen Tiere der Untersuchungsgruppe entsprach. Auch die Aktivität in der Niere war deutlich erhöht (Abbildung 12). Eine elektronenmikroskopische

Analyse ergab enorme ultrastrukturelle Veränderungen der Leberzellen wie Reduktion des endoplasmatischen Retikulums, Vakuolenbildung und Ablagerung von Fetttröpfchen (Abbildung 13). Ob diese Schädigungen in ursächlichem Zusammenhang mit der PAK-Exposition stehen, konnte nicht entschieden werden.

Trotz der niedrigen lebermikrosomalen Metabolisierungskapazität für PAK bei gleichzeitiger kontinuierlicher Schadstoffaufnahme kommt es beim Tier MS-03 im Vergleich mit den anderen Tieren der Expositionsgruppe CA1 zu keiner auffälligen Induktionsantwort oder Kompensation in Niere oder Duodenum. In der Niere sind die CYP1A1-Gehalte eher niedriger als bei den Vergleichstieren, im Duodenum in etwa gleich (Abbildung 12). Die pathologischen Defekte wirken sich offenbar auf den mikrosomalen Gehalt des konstitutiv exprimierten CYP2E1 nicht oder nur wenig aus (Abbildung 12B). Unklar bleibt aber trotzdem, ob sich der CYP2E1-Gehalt pro Zelle verändert hat oder nicht, da nicht bekannt ist, in welchem Ausmaß das endoplasmatische Retikulum in seiner Ausdehnung reduziert wurde.

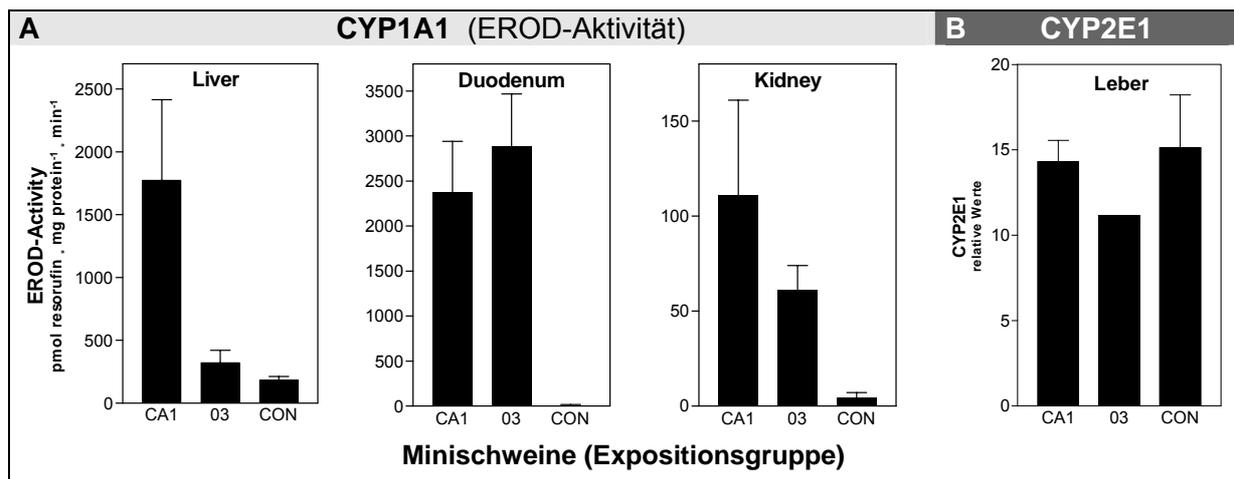


Abbildung 12. Das P450-Profil von Minischwein MS-03 mit pathologischer Leberveränderung im Vergleich mit entsprechenden Daten aus der Expositionsgruppe CA1, zu der auch MS-03 gehört, und der Kontrollgruppe (CON). A. Mikrosomale EROD-Aktivität verschiedener Organe. B. Relativer lebermikrosomaler CYP2E1-Gehalt.

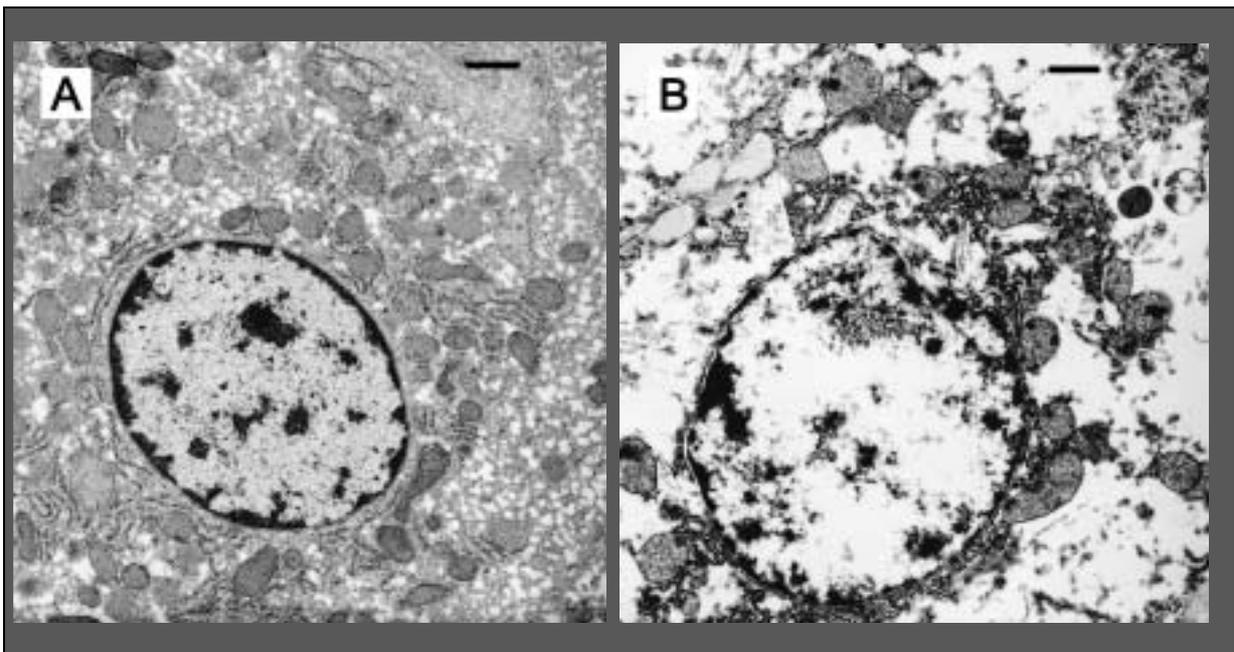


Abbildung 13. Ultrastrukturelle Analyse der Leber durch Transmissions-Elektronenmikroskopie. Ein gesundes Minischwein der Expositionsgruppe CA1 (MS-01) zeigt normale Hepatozyten (A), während bei Minischwein MS-03 deutliche subzelluläre Schädigungen zu verzeichnen sind (B). Vergrößerung: Balken entspricht 1 μm .

Im Expositionsversuch mit dem Boden Lothringen 2 zeigte ein Tier (MS-16) vergleichsweise hohe duodenale EROD-Aktivitäten bei gleichzeitig niedriger Aktivität in der Leber (Tabelle 8). Hier könnte man spekulieren, ob die hohe duodenale CYP1A1-Aktivität der Ausbreitung nicht-metabolisierter PAK im Organismus und damit der Induktion in der Leber entgegenwirkt. Enzymatisch bereits umgesetzte PAK sind bekanntermaßen keine Liganden des Ah-Rezeptors und somit keine wirksamen CYP1A1-Induktoren. Die Gewebeproben von Tier MS-16 wurden bisher nicht weiter untersucht.

| Tabelle 8. EROD-Aktivitäten in verschiedenen Organen des Minischweins MS-16 im Vergleich zu den anderen Tieren der Expositionsgruppe LO2. | | |
|--|-------------------------------------|----------------------------|
| Organ | Mikrosomale EROD-Aktivitäten | |
| | MS-16 | MS-13, MS-14, MS-15 |
| Leber | 78 \pm 21 | 312 \pm 39 |
| Darm | 1114 \pm 142 | 405 \pm 129 |
| Niere | 38.3 \pm 9.6 | 27.4 \pm 7.8 |

Die Aktivitäten sind in $\text{pMol Resorufin} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ angegeben.

Die Ausnahmefunde machen deutlich, welche Rolle offenbar die individuelle Suszeptibilität für schadstoffbedingte Veränderungen spielt. Übertragen auf den Menschen wird die mögliche Bedeutung von Polymorphismen unterstrichen, die sich hinsichtlich der Enzymexpression oder der Enzymparameter manifestieren können. Für eine individuelle Risikoabschätzung beim Menschen sind daher sowohl die allgemeinen Schadstoffwirkungen als auch genotypische und phänotypische Merkmale des Probanden notwendigerweise zu bestimmende Parameter.

Induktion von CYP1A1 in der Ratte: Ein Vergleich mit dem Minschwein

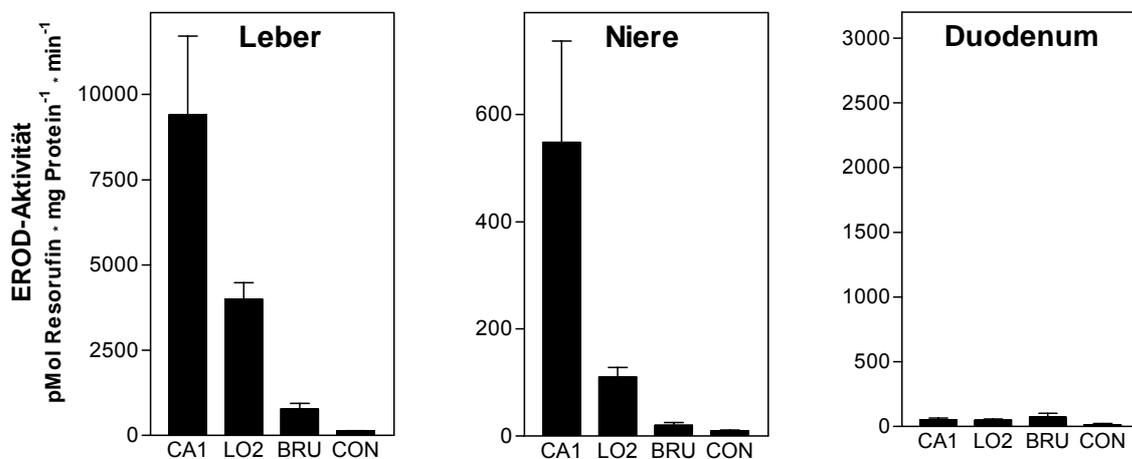
Als Tiermodell für fremd-/schadstoffbedingte Effekte ist bisher vorwiegend die Ratte eingesetzt worden. Für uns stellte sich die Frage, ob es artliche Unterschiede in den Induktionsantworten zwischen Minischwein und Ratte gibt, eine Frage, die hinsichtlich eines geeigneten Tiermodells für den Menschen außerordentlich bedeutsam ist. Aus diesem Grunde haben wir zu den Minischwein-Experimenten analoge Expositionsversuche mit Ratten durchgeführt. Hierbei wurden identische Bodenproben und -dosen eingesetzt sowie ein identisches Applikationsschema für beide Tierspezies verwendet. Nach oraler Aufnahme der Böden BRU, LO2 und CA1 über 14 Tage wurde CYP1A1 in Leber, Duodenum und Niere von jeweils 4 Ratten pro Expositionsgruppe bestimmt.

Alle drei Böden führen bei den Ratten zu erhöhten CYP1A1-Spiegeln in Leber, Niere und Duodenum. Während die EROD-Aktivität im Duodenum aber nur eine geringe Steigerung erfährt, finden wir in der Leber einen enormen Anstieg, der mit dem hoch kontaminierten Boden CA1 zu einer Aktivität von ca. 9000 pMol Resorufin * mg Protein⁻¹ * min⁻¹ führt (Abbildung 14). Die Aktivitäten in der Niere werden durch die aufgenommenen Böden analog zur Leber moduliert, das Niveau liegt allerdings um mindestens 1 Größenordnung tiefer als in der Leber. Die minimalen Aktivitätssteigerungen im Duodenum der Ratten erweisen sich gegenüber der Kontrolle als signifikant verschieden mit $P = 0.0043$, $P = 0.0013$ und $P = 0.0115$ für die Proben CA1, LO2 bzw. BRU.

Ein Vergleich der Induktionsantworten zwischen Ratte und Minischwein zeigt, dass die beiden Arten sehr unterschiedlich auf eine orale PAK-Exposition reagieren, indem sie organspezifisch differenzierte Induktionsprofile aufweisen. Das wesentliche Ergebnis lautet kurz zusammengefaßt: Während CYP1A1 nach oraler PAK-Applikation beim Minischwein präferentiell im Duodenum induziert wird, finden wir im Gegensatz hierzu bei der Ratte eine deutlich dominante Steigerung der CYP1A1-Expression in der Leber. Einen kompletten Vergleich der induzierten Aktivitäten für die beiden Arten zeigt die Abbildung 14. Hiernach manifestiert sich der markanteste Unterschied zwischen den beiden Arten in den induzierbaren

duodenalen EROD-Aktivitäten. Sie liegen bei den Ratten für die 3 Expositiongruppen (CA1, LO2, BRU) zwischen 48 und 71 pMol Resorufin * mg Protein⁻¹ * min⁻¹, bei Minischweinen haben wir aber individuelle Aktivitäten bis zu 3000 pMol Resorufin * mg Protein⁻¹ * min⁻¹ bei Aufnahme des Bodens CA1 gefunden. Lediglich mit dem wenig PAK-belasteten Boden BRU sehen wir für beide Arten einen ähnlich niedrigen Induktionseffekt, der bei Ratte und Minischwein zu duodenalen EROD-Aktivitäten von 71 ± 20 bzw. 83 ± 10 pMol Resorufin * mg Protein⁻¹ * min⁻¹ führt.

Ratten



Minischweine

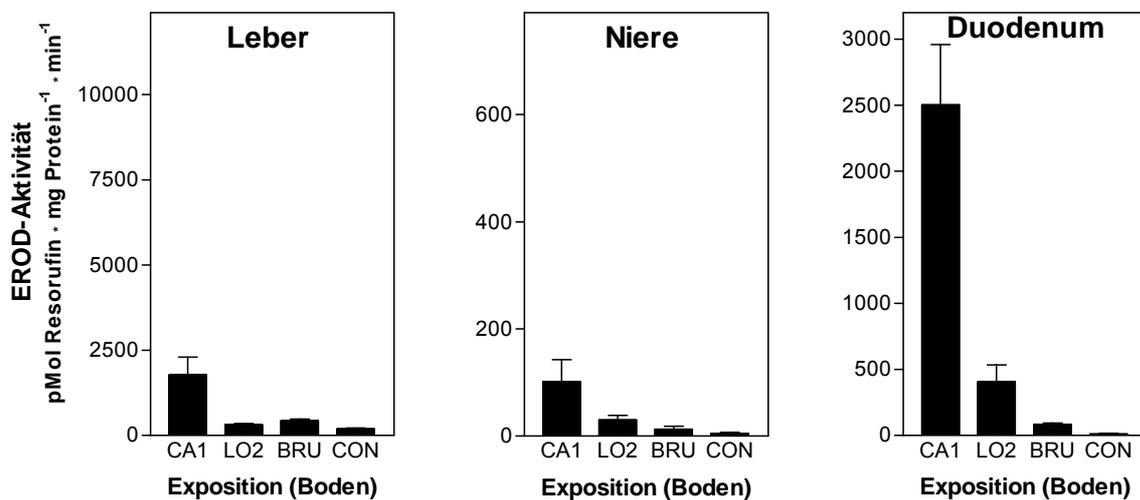


Abbildung 14. Differentielle Induktion der mikrosomalen EROD-Aktivität in Leber, Niere und Duodenum von Minischweinen und Ratten durch orale Aufnahme PAK-kontaminierter Böden. CON, nicht-exponierte Kontrollgruppe. Die einzelnen Gruppen umfassen 4 Tiere, für die jeweils mindestens 4 Bestimmungen durchgeführt wurden. Die einzelnen Balken repräsentieren somit jeweils die Ergebnisse von 16 – 20 Einzelbestimmungen. Die Skalierungen wurden so gewählt, dass ein leichter Vergleich zwischen Ratte und Minischwein ermöglicht wird.

Alle bisherigen Daten deuten darauf hin, dass die maximal induzierbaren EROD-Aktivitäten im Duodenum bei der Ratte viel niedriger liegen als beim Minischwein. So wurden bei der Ratte selbst mit ca. 10-fach höheren Schadstoffdosen als sie in diesem Projekt verwendet wurden EROD-Aktivitäten von nur ca. 350 pMol Resorufin * mg Protein⁻¹ * min⁻¹ gefunden (Roos, im Druck). Beim Minischwein konnten wir wie schon erwähnt ca. 9-fach höhere Aktivitäten feststellen. Mit Vorbehalt lassen sich durch nicht-lineare Regression maximal erreichbare duodenale EROD-Aktivitäten von 5100 und 430 pMol Resorufin * mg Protein⁻¹ * min⁻¹ für das Minischwein bzw. die Ratte extrapolieren.

Umgekehrt wie beim Duodenum, sind die induzierten EROD-Aktivitäten der Leber für alle applizierten Böden bei der Ratte höher als beim Minischwein. Ein wirklich deutlicher Effekt wird bei den Minischweinen hier nur mit dem Boden CA1 erzielt. Der mäßig PAK-belastete Boden LO2 führt bei den Minischweinen nur zu einer 1.3-fachen Erhöhung der lebermikrosomalen EROD-Aktivität, bei den Ratten aber zu einer 31-fachen Steigerung.

Die durch PAK-Aufnahme erzielten CYP1A1-Niveaus sind beim Minischwein für Leber und Duodenum ähnlich hoch, während bei der Ratte diesbezüglich eine beachtliche Diskrepanz zu verzeichnen ist. Dies soll am Beispiel der Expositionsgruppe CA1 anhand der folgenden Tabelle 9 verdeutlicht werden:

| Tabelle 9. Verhältnis der induzierten EROD-Aktivitäten in Duodenum und Leber bei Minischwein und Ratte im Vergleich. | | | |
|---|--------------|-----------------|--|
| | Leber | Duodenum | Quotient EROD_{Leber}/EROD_{Duodenum} |
| Minischwein | 1776 ± 523 | 2501 ± 458 | 0.71 |
| Ratte | 9401 ± 2313 | 50 ± 14 | 188 |

Gezeigt sind die Daten für die Exposition mit dem Boden CA1.

Die Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass beim Minischwein das Duodenum für den primären Metabolismus der PAK eine größere Rolle spielt als bei der Ratte, bei der die Leber den weniger ausgeprägten Barriere-Effekt des Duodenums zu kompensieren scheint. Die für Extrapolationen bedeutsame Frage, welches der beiden Modelle dem Menschen hinsichtlich der unterschiedlichen CYP1A1-Induzierbarkeit in Leber und Darm näher kommt, ist offen, da naturgemäß keine entsprechenden Daten für den Menschen vorliegen. Es bleibt uns zunächst nur die vage Vermutung, dass das Minischwein aufgrund seiner sonstigen dem Menschen ähnlichen biochemischen und physiologischen Eigenschaften das Induktionsverhalten beim Menschen besser widerspiegelt als die Ratte.

Effekt unterschiedlicher Aufnahmemodi auf das Ausmaß der CYP1A1-Induktion

Um einen Vergleich mit früheren Expositionsversuchen unserer Arbeitsgruppe durchführen zu können (Roos et al., 1996; Roos, 2000a), haben wir Ratten außer mit dem an die Minischwein-Versuche angepaßten Applikationsschema auch mit der bis dahin angewandten Methode exponiert. Hierzu wurde die an das Körpergewicht angepaßte aufzunehmende Bodendosis in das pro Tag verabreichte Futter homogen eingearbeitet. Wie bei den vorhergehend beschriebenen Versuchen mit Minischweinen und Ratten betrug die tägliche Bodenaufnahme hier ebenfalls $500 \text{ mg} \cdot \text{kg Körpergewicht}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$. Für diese Versuche wurden nur die Böden CA1 und LO2 eingesetzt.

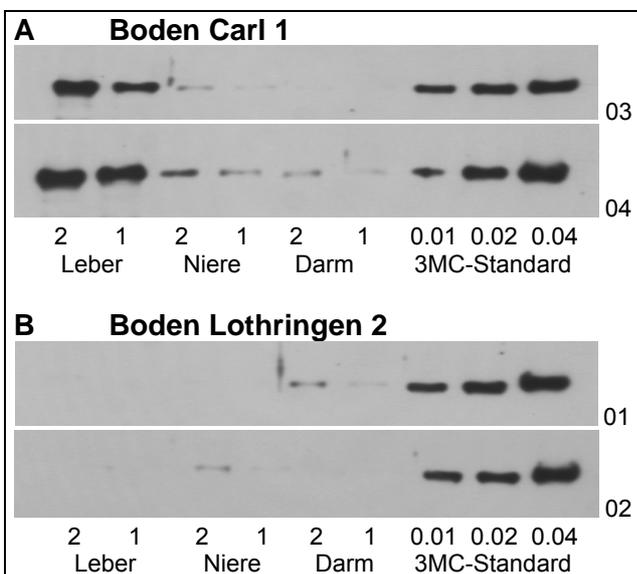


Abbildung 15. Bestimmung von CYP1A1 in verschiedenen Geweben der Ratte nach oraler Aufnahme PAK-belasteter Böden. Western-Blot mit dem monoklonalen Antikörper MAb 1A3-03. Angegeben ist die Menge des im Blot eingesetzten Proteins in μg . 3MC-Standard: Standard-Präparation von Lebermikrosomen aus 3-Methylcholanthren-behandelten Ratten.

A: Boden Carl 1 (Tiere RT-03 und RT-04)

B: Boden Lothringen 2 (Tiere RT-01 und RT-02)

Wie die Western-Blot-Analysen und die EROD-Bestimmungen zeigen (Abbildungen 15 - 17), wird durch kontinuierliche Schadstoffzufuhr über das Futter nur durch den Boden CA1, nicht aber durch LO2, eine CYP1A1-Induktion in der Leber hervorgerufen. Allerdings liegen auch die mit dem hochkontaminierten Boden CA1 erzielten EROD-Aktivitäten nur ca. 2.5-fach über dem Hintergrund (Abbildungen 17). Ein Vergleich mit bereits veröffentlichten Daten aus Expositionsversuchen mit Ratten (Roos et al., 1996; Roos et al. 2000) zeigt, dass sich die hier erzielten Ergebnisse trotz unterschiedlicher Bodendosierungen gut in die bekannten Befunde einpassen (Abbildung 16). In den früheren Expositionsstudien betrug der Bodenanteil im Futter 5 %, er mußte in den hier durchgeführten Versuchen aus Gründen der Angleichung an die Minischwein-Versuche auf 0.42 % herabgesetzt werden. Bezieht man sich auf die aufgenommenen Schadstoffdosen, so ergibt sich, dass sich die Schadstoff-Exposition mit dem Boden CA1 aufgrund seiner hohen PAK-Kontamination im Bereich der früher durchgeführten

Versuche bewegt, die Exposition durch den Boden LO2 liegt im Schwellenbereich für die CYP1A1-Induktion.

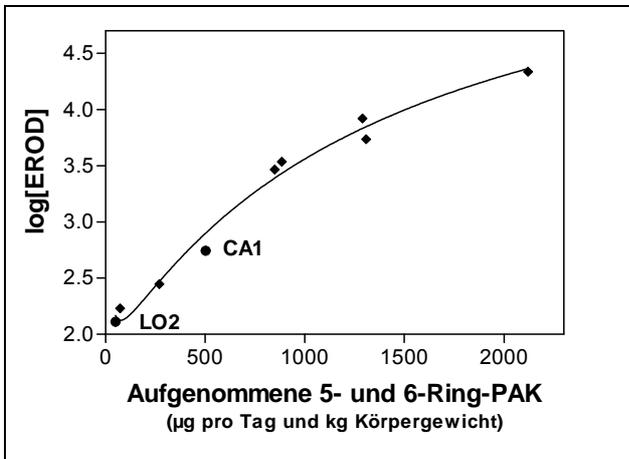


Abbildung 16. Induktion der lebermikrosomalen EROD-Aktivität bei Ratten durch orale Aufnahme der Böden CA1 und LO2 im Vergleich mit früher erhaltenen Ergebnissen. Die Schadstoffzufuhr erfolgte durch die tägliche Futteraufnahme. Die zusätzlichen Daten stammen aus Versuchen eines von der EU geförderten Projekts zur Risikobeurteilung PAK-belasteter Böden.

Bodenanteile im Futter:

CA1, LO2: 0.42 %

Böden aus EU-Studie: 5.0 %

Zwischen den beiden Applikationsmodi, Einmalgabe und Verteilung über das gesamte Futter, unterscheidet sich das Ausmaß der CYP1A1-Induktion trotz identischer täglicher Schadstoffaufnahmen enorm. Bei Einmalgabe der täglichen Dosis in konzentrierter Form werden durch die Böden CA1 und LO2 in allen Organen weitaus höhere CYP1A1-Spiegel erzielt als bei einer über den Tag verteilten Schadstoffzufuhr. Letztere führt selbst mit dem hoch kontaminierten Boden CA1 nur zu einer leichten aber signifikanten Erhöhung der EROD-Aktivität in Leber und Niere, während mit dem geringer belasteten Boden LO2 kein signifikanter Effekt mehr festzustellen ist (Abbildung 17). In Zahlen ausgedrückt sollen die applikationsbedingten Unterschiede in der CYP1A1-Induktion noch einmal am Beispiel des Bodens CA1 verdeutlicht werden: Während mit diesem Boden eine über den Tag verteilte Schadstoffaufnahme zu einer Erhöhung der lebermikrosomalen EROD-Aktivität um $420 \text{ pMol Resorufin} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ führt, bewirkt ein Bolus aber eine Erhöhung um $9270 \text{ pMol Resorufin} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Die beiden hier angewandten Applikationsschemata lassen sich grob als Modelle für chronische oder akute Expositionen auffassen. Die Ergebnisse machen deutlich, dass zur Beurteilung der von aufgenommenen Schadstoffen auslösbaren Effekte die tägliche Dosis für sich betrachtet kein ausreichender Parameter ist. Um den Effekt einer Einmaldosis durch Verteilung über den Tag zu erreichen, sind schätzungsweise zehnfach höhere Dosen notwendig. Als ‚worst case‘ hinsichtlich der Induktion von CYP1A1 ist die Einmalaufnahme einer größeren Menge schadstoffbelasteten Materials zu betrachten. Langzeit-Phänomene wie die Schadstoff-Akkumulation bleiben von dieser Betrachtung ausgenommen.

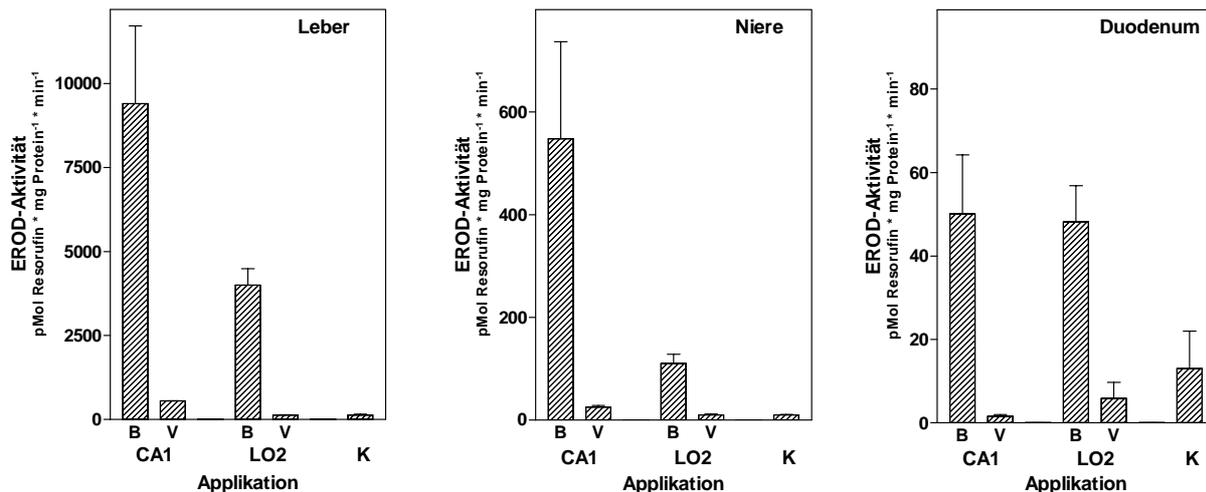


Abbildung 17. Vergleich der CYP1A1-Induktion in verschiedenen Geweben der Ratte bei unterschiedlicher Applikation der PAK-haltigen Böden CA1 und Lothringen 2. Die Böden wurden über eine Einmaldosis (B) oder über den Tag verteilt (V) oral verabreicht. In allen Versuchen betrug die tägliche Bodendosis 0.5 g Boden pro kg Körpergewicht. K, nicht-exponierte Kontrollgruppe.

Schlußfolgerungen

Die im Projekt erzielten Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse in Bezug auf schadstoffbedingte Effekte in höheren Säugetieren, woraus sich neue relevante Parameter zur Abschätzung des Humanrisikos hinsichtlich PAK-kontaminierter Materialien ableiten lassen. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die differentielle Induktion von CYP1A1 in verschiedenen Geweben relevant. Gleichzeitig bekommt die Frage nach einem geeigneten Tiermodell für den Menschen durch die unterschiedlichen Induktionsprofile in verschiedenen Organen von Minischwein und Ratte einen neuen Impuls.

● ***CYP1A1 wird beim Minischwein durch orale Aufnahme PAK-kontaminierter Böden in einem für Menschen relevanten Dosisbereich induziert***

Die hier applizierten Bodendosen bewegen sich in einer Größenordnung wie sie auch durch im Freien spielende Kinder aufgenommen werden (Paustenbach et al., 1992; Stubenrauch, 1994; Calabrese et al., 1997; Stanek & Calabrese, 2000). Die selbst durch niedrig-kontaminierte Böden bewirkte signifikante CYP1A1-Induktion erlaubt die Schlußfolgerung, dass je nach Kontamination auch noch mit weitaus geringeren Bodendosen als hier verwendet Induktionseffekte zu erwarten sind. So läßt sich anhand des Bodengehaltes an 5- und 6-Ring-PAK kalkulieren, dass der durch den Boden LO2 bei einer täglichen Dosis von 500 mg Boden/kg Körpergewicht erzielte Induktionseffekt mit dem Boden CA1 schon bei einer Dosierung von 60 mg Boden/kg Körpergewicht erreicht wird. Wie aus den Versuchen mit

Ratten hervorgeht, ist der Induktionseffekt offenbar unabhängig von der aufgenommenen Bodenmenge, sondern nur abhängig von den darin jeweils enthaltenen Schadstoffen, d.h. identische Schadstoffdosen, die über verschiedene Bodenmengen aufgenommen werden, haben die gleiche Induktionswirkung. Fazit der Untersuchungen ist, dass bei Kindern, die auf PAK-belasteten Flächen spielen, mit erhöhten CYP1A1-Spiegeln in verschiedenen Geweben gerechnet werden kann.

- ***Eine orale PAK-Exposition führt zu einer erhöhten CYP1A1-Expression in verschiedenen Organen von Minischweinen***

Die Tatsache, dass CYP1A1 nach oraler PAK-Aufnahme in einer Reihe verschiedener Organe induziert wird, läßt den Weg der Schadstoffe im Organismus nachzeichnen. Unsere Ergebnisse machen deutlich, dass Effekte der oral aufgenommenen Schadstoffe nicht nur im primär resorbierenden Gewebe ausgelöst werden und auch nicht auf die Leber als **dem** Filter- und Entgiftungsorgan beschränkt bleiben. Vielmehr zeigt die Induktion von CYP1A1 in Niere, Lunge und Milz an, dass nicht-metabolisierte PAK auch diese Organe erreichen. Wie die Erfahrungen zeigen, ist eine reproduzierbare Analyse von PAK in den betreffenden Organen schwierig, ihre Anwesenheit läßt sich in den verschiedenen Organen aber leicht indirekt durch erhöhte CYP1A1-Spiegel nachweisen. Während in Zellen eindringende PAK das CYP1A1-Signal erhöhen werden sie selbst in zunehmendem Maße metabolisiert und ausgeschieden und sind dann aufgrund ihrer kurzen Verweilzeit im betreffenden Organ nicht mehr nachweisbar.

Die Verteilung von PAK in verschiedene Körperkompartimente und damit zusammenhängend die Induktion von CYP1A1 hat Bedeutung für PAK-induzierte pathogenetische Vorgänge. Aufgrund ihrer spezifischen biochemischen Ausstattung sind die einzelnen Organe unterschiedlich empfänglich für zum Beispiel carcinogenetische Prozesse. In diesem Zusammenhang wird die Balance zwischen Enzymen der Phase I, wie CYP1A1, und Enzymen der Phase II, als wichtige Größe diskutiert (Nebert, 1991). Diese Balance soll dafür sorgen, dass die durch CYP1A1 primär gebildeten reaktiven Metabolite durch konjugierende Phase II-Enzyme schnell abgefangen und unschädlich gemacht werden. Über das Verhältnis von Phase I- und Phase II-Aktivitäten in verschiedenen Organen insbesondere unter dem modulierenden Einfluß von Schadstoffen ist nur wenig bekannt, so dass hier noch Forschungsbedarf besteht. Erst die Kenntnis hierüber gestattet eine Bewertung der Induktionseffekte in verschiedenen Organen unter dem Risikoaspekt und der Projektion auf Spätfolgen.

- ***Minischweine und Ratten zeigen zwei prinzipiell verschiedene Induktionsprofile***

Die beiden hier eingesetzten Tiermodelle demonstrieren, auf welche unterschiedliche Weise ein Organismus auf oral aufgenommene Schadstoffe reagieren kann. Während das Minischwein mit einer enorm gesteigerten CYP1A1-Aktivität im Duodenum antwortet, finden wir bei der Ratte eine bevorzugte CYP1A1-Induktion in der Leber. Unsere Interpretation ist, dass wir es hier mit zwei prinzipiell unterschiedlichen Abwehrstrategien der beiden Spezies für oral aufgenommene Schadstoffe zu tun haben: Beim Minischwein werden resorbierte PAK bereits im Darm mit hoher enzymatischer Kapazität metabolisiert. Diesem Mechanismus entkommene PAK werden durch eine ebenfalls erhöhte Aktivität in der Leber abgefangen. Bei der Ratte hingegen scheint sich die PAK-Metabolisierung auf die Leber zu konzentrieren. Da für den Menschen keine vergleichbaren Daten existieren, kann man zunächst nur spekulieren, welchem Tiermodell er in dieser Beziehung näher kommt. Aufgrund seiner schon erwähnten biochemischen und physiologischen Eigenschaften tendieren wir zur Zeit dazu, das Minischwein als geeignetes Tiermodell zu betrachten. Da diese Frage einer experimentellen Klärung nicht zugänglich ist, werden alternative Lösungswege besprochen werden müssen, die hier nicht näher ausgeführt werden sollen.

- ***Der Aufnahmemodus hat entscheidenden Einfluß auf das Ausmaß der CYP1A1-Induktionsantwort***

Die Induktionswirkung oral aufgenommener PAK hängt nicht nur von der täglich aufgenommenen Dosis ab, sondern auch davon, wie sie über den Tag verteilt aufgenommen wird. Wie hier anhand von Expositionsversuchen mit Ratten gezeigt, bewirkt ein einmaliger Bolus eine wesentlich höhere CYP1A1-Induktion als eine Verteilung der identischen Dosis über die tägliche Futteraufnahme. So stellen unterschiedliche Weisen der Bodenaufnahme, wie sie für im Freien spielende Kinder oder in Form des Pica-Verhaltens beschrieben sind (Calabrese et al., 1997b; Walker et al., 1997; Simon, 1998), auch unterschiedliche Expositionsszenarien mit differierenden Effekten dar. Eine Berücksichtigung unserer Erkenntnisse, die sicherlich noch experimentell vertieft werden müssen, in Risikobewertungen ist wünschenswert, wie und in welcher Form, steht zur Diskussion.

- ***Die individuelle Empfänglichkeit erscheint als wichtiger Einflußfaktor für die Induzierbarkeit von CYP1A1***

Für eine Risikobewertung kontaminierter Materialien ist einerseits ihre mögliche toxische Potenz zu beurteilen. Auf der anderen Seite trifft diese Potenz aber auch auf unterschiedliche

Kompetenzen der Empfängerorganismen hiermit umzugehen. Somit sollte neben der allgemeinen Beurteilung der Schadstoffe eine individuelle Komponente der/des Betroffenen in die Bewertung einfließen, seine Suszeptibilität, die durch genotypische Merkmale, Polymorphismen, definiert wird (z.B. Nebert, 1991; Schoket et al., 2001). Der Aspekt individuell unterschiedlicher Antworten auf eine PAK-Exposition wurde im Projekt am Beispiel zweier abweichend reagierender Minischweine deutlich. In dem einen Fall wurde nach oraler Bodengabe (LO2) eine 2,5-fach höhere CYP1A1-Induktion im Duodenum festgestellt als bei anderen Tieren dieser Expositionsgruppe. Dafür, so könnte man folgern, kam es bei diesem Tier zu keiner CYP1A1-Induktion in der Leber. Im anderen Fall wurde deutlich, dass eine pathologisch bedingt ausbleibende CYP1A1-Induktion in der Leber offenbar nicht durch eine erhöhte CYP1A1-Expression in anderen Organen kompensiert wird.

Hinsichtlich einer Humandiagnostik bieten Leukozyten ein geeignetes Untersuchungsmaterial, an dem sich sowohl genotypische als auch phänotypische Merkmale untersuchen lassen. So konnten wir hier zeigen, dass sich in Leukozyten von Minischweinen CYP1A1 auf Proteinebene nach oraler PAK-Exposition nachweisen lässt. Da dieser Nachweis aber nur bei hohen eingesetzten Proteinmengen im Western-Blot gelingt, ist eine Analyse auf Transkriptebene sinnvoller und eleganter. Basierend auf dieser sensitiven Technik wäre der Nachweis weiterer relevanter Effektbio marker für PAK-Expositionen wie CYP1B1 und diverse Phase II-Enzyme machbar und wünschenswert.

Ausblick

Die im Projekt erzielten Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse in Bezug auf schadstoffbedingte Effekte in höheren Säugetieren, woraus sich neue relevante Parameter für Abschätzungen des Humanrisikos ableiten lassen. Als Konsequenz der Untersuchungen wird die Notwendigkeit für die Schaffung von Testsystemen, die eine reale Abschätzung des Risikos oral aufgenommener Schadstoffe für den Menschen erlauben, erneut unterstrichen. Diese Testsysteme müssen die Verhältnisse im als geeignet festgelegten Tiermodell reflektieren. Hierzu soll die Parametermatrix für Schadstoffwirkungen um weitere Phase I- aber auch Phase II-Enzyme erweitert werden. Insbesondere soll das erst vor einigen Jahren entdeckte CYP1B1 einbezogen werden, da es an der Aktivierung zahlreicher Procarcinogene beteiligt ist (Shimada et al., 1996), im Zusammenhang mit dem Tumorgeschehen steht (Murray et al., 1997; Trombino et al., 2000) und im Vergleich zu CYP1A1 gewebespezifisch unterschiedlich exprimiert wird (Hakkola et al., 1997; Muskhelishvili et al., 2001). Durch die analytische Erfassung komplexer Biomarker-Matrices wird eine differenziertere Risikobewertung sowohl hinsichtlich der aufgenommenen Schadstoffe/ Schadstoffgemische als auch hinsichtlich

organspezifischer Effekte ermöglicht. Als zukunftsweisende Perspektive sehen wir die Entwicklung von Protein-Chips zur Erfassung von Effektbiomarker-Profilen.

Literatur

- Anzenbacher P, Soucek P, Anzenbacherova E, Gut I, Hruby K, Svoboda Z, Květina J (1998) Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. Comparison with human samples. *Drug Metab Disp* **26**, 56 – 59.
- Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer RT (1985) Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem Pharmacol* **34**, 3337 – 3345.
- Calabrese EJ, Stanek EJ 3rd, Pekow P, Barnes RM (1997a) Soil ingestion estimates for children residing on a superfund site. *Ecotoxicol Environ Saf* **36**, 258 – 268.
- Calabrese EJ, Stanek EJ, James RC, Roberts SM (1997b) Soil ingestion: a concern for acute toxicity in children. *Environ Health Perspect* **105**, 1354 – 1358.
- Dott W, Eisenträger A, Hanstein WG, Roos PH (1999) Entwicklung und Anwendung miniaturisierter automatisierter Testverfahren zur humantoxikologischen und kotoxikologischen Bewertung von Schadstoffen in Umweltproben. In: *Innovative Techniken der Bodensanierung - Ein Beitrag zur Nachhaltigkeit* (S. Heiden, Hrsg.), pp 248 – 266. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Guengerich FP (1977) Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P450. Partial characterization of three apparently homogeneous cytochromes P450 prepared from livers of phenobarbital and 3-methylcholanthrene treated rats. *J Biol Chem* **252**, 3970 – 3979.
- Hakkola J, Pasanen M, Pelkonen O, Hukkanen J, Evisalmi S, Anttila S, Rane A, Mäntylä M, Purkunen R, Saarikoski S, Tooming M, Raunio H (1997) Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* **18**, 391 – 397.
- Ioannides C, Parke DV (1993) Induction of cytochrome P4501 as an indicator of potential chemical carcinogenesis. *Drug Metab Rev* **25**, 485 – 501.
- Květina J Svoboda Z Nobilis M, Pastera J, Anzenbacher P (1999) Experimental Goettingen minipig and beagle dog as two species used in bioequivalence studies for clinical pharmacology (5-aminosalicylic acid and atenolol as model drugs). *Gen Physiol Biophys* **18**, 80 – 85.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 – 685.
- Lee C, Riddick DS (2000) Transcriptional suppression of cytochrome P450 2C11 gene expression by 3-methylcholanthrene. *Biochem Pharmacol* **59**, 1417 – 1423.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265 – 275.
- Murray GI, Taylor MC, McFadyen MCE, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT (1997) tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* **57**, 3026 – 3031.
- Muskhelishvili L, Thompson PA, Kusewitt DF, Wang C, Kadlubar FF (2001) In situ hybridization and immunohistochemical analysis of cytochrome P450 1B1 expression in human normal tissues. *J Histochem Cytochem* **49**, 229 – 236.
- Nebert DW (1991) Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat Res* **247**, 267 – 281.
- Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* **239**, 2370 – 2378.
- Paustenbach DJ, Jernigan JD, Bass R, Kalmes R, Scott P (1992) A proposed approach to regulating contaminated soil: identify safe concentrations for seven of the most frequently encountered exposure scenarios. *Regul Toxicol Pharmacol* **16**, 21 – 56.
- Roos PH (2000a) Ökotoxikologische und humantoxikologische Risikobewertung PAK-belasteter Böden vor und nach biologischer Sanierung. *Z Umweltchem Ökotoxikol* **12**, 13 – 19.
- Roos PH (2000b) Differential induction of cytochrome P450 CYP1A1 in several organs after oral uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by rats: parameters for risk assessment. *Arch Pharmacol* **361** (suppl): R176.
- Roos PH (2000c) Cytochrome P450 als Effekt-Biomarker zur Bodenbewertung. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden* (S. Heiden, R. Erb, W. Dott, A. Eisenberger, Hrsg.), pp 147 – 165. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Roos PH (im Druck) Differential induction of CYP1A1 in duodenum, liver and kidney of rats after oral intake of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Toxicol*
- Roos PH, van Afferden M, Strotkamp D, Pfeifer F, Hanstein WG. (1996) Liver microsomal levels of CYP1A as biomarker for exposure and for bioavailability of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Environ Contam Toxicol* **30**, 107 – 113.
- Roos PH, van Afferden M, Hanstein WG. (1997) Biological effect-monitoring: Cytochrom P450 als Expositionsbiomarker für Umweltschadstoffe, pp. 19 – 55. In: *Initiativen zum Umweltschutz 7, Miniaturisierte und automatisierte Testverfahren zur human- und ökotoxikologischen Bewertung von Schadstoffen in Umweltproben* (Heiden S, Dott W, Eds). – Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Osnabrück.
- Roos PH, Tschirbs S, Welge P, Hack A, Wilhelm M (2000) Duodenal and hepatic cytochrome P450 CYP1A1 as sensitive biomarker of effect in minipigs following oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Abstract, International Congress on Environmental Health, Hannover, A 93.
- Roos PH, Tschirbs S, Welge P, Hack A, Theegarten D, Mogilevski G, Wilhelm M (angenommen). Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to PAH-contaminated soils. *Arch Toxicol*

- Schoket B, Papp G, Levay K, Mrackova G, Kadlubar FF, Vincze I (2001) Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. *Mutat Res* **482**, 57 – 69.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, Sutter TR (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* **56**, 2979 – 2984.
- Simon SL (1998) Soil ingestion by humans: a review of history, data, and etiology with application to risk assessment of radioactively contaminated soil. *Health Phys* **74**, 647 – 672.
- Skaanild MT, Friis C (1997) Characterization of the P450 system in Göttingen minipigs. *Pharmacol Toxicol* **80** (suppl 2), 28 – 33.
- Skaanild MT, Friis C (1999) Cytochrome P450 sex differences in minipigs and conventional pigs. *Pharmacol Toxicol* **85**, 174 – 180.
- Spatzenegger M, Horsmans Y, Verbeek RK (2000) CYP1A1 but not CYP1A2 proteins are expressed in human lymphocytes. *Pharmacol Toxicol* **86**, 242 – 244.
- Stanek EJ 3rd, Calabrese EJ (2000) Daily soil ingestion estimates for children at a superfund site. *Risk Anal* **20**, 627 - 635.
- Stubenrauch S, Hempfling R, Simmleit N, Mathews T, Doetsch P (1994) Abschätzung der Schadstoffexposition in Abhängigkeit von Expositionsszenarien und Nutzergruppen. II. Vorschläge für orale Aufnahmeraten von Boden, Badewasser und Nahrungsmitteln des Eigenanbaus. *Z Umweltchem Ökotox* **6**, 165 – 174.
- Swindle MM, Smith AC (1998) Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand J Lab Anim Sci Suppl* **25**, 11 – 22.
- Timsit YE, Riddick DS (2000) Interference with growth hormone stimulation of hepatic cytochrome P450C11 expression in hypophysectomized male rats by 3-methylcholanthrene. *Toxicol Appl Pharmacol* **163**, 105 – 114.
- Trombino AF, Near RI, Matulka RA, Yang S, Hafer LJ, Toselli PA, Kim DW, Rogers AE, Sonenshein GE, Sherr DH (2000) Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) and AhR-regulated CYP1 gene transcripts in a rat model of mammary tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* **63**, 117 – 131.
- Vainio H (2001) Use of biomarkers in risk assessment. *Int J Hyg Environ Health* **204**, 91 – 102.
- Vanden Heuvel JP, Clark GC, Thompson CL, McCoy Z, Miller CR, Lucier GW, Bel, DA (1993) CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* **14**, 2003 – 2006.
- Towbin HT, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350 – 4354.
- Walker AR, Walker BF, Sookaria FI, Cannan RJ (1997) Pica. *J R Soc Health* **117**, 280 – 284.

Danksagungen

Wir danken dem Land Baden-Württemberg für die finanzielle Unterstützung, die unsere Untersuchungen ermöglichte. Für die enge und effiziente Kooperation hinsichtlich der Expositionsversuche mit Minischweinen sowie für die PAK-Analysen bedanken wir uns bei Priv.-Doz. Dr. A. Hack, Dipl.-Biol. P. Welge, Dr. J. Wittsipe und Prof. Dr. M. Wilhelm von der Abteilung für Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin der Ruhr-Universität Bochum. Ohne diese Kooperation, die an ein vom Umweltbundesamt geförderten Projekt von Prof. Wilhelm anknüpft, wären unsere Untersuchungen nicht möglich gewesen. Die Ultrastrukturuntersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Priv.-Doz. Dr. Dirk Theegarten und Prof. Dr. Grigori Mogilevski (beide aus der Abteilung für Allgemeine und Spezielle Pathologie, Ruhr-Universität Bochum) vorgenommen.

Anhang: Veröffentlichung der aus dem Projekt hervorgegangenen Ergebnisse

Publikationen

Roos PH (2000) Cytochrome P450 als Effekt-Biomarker zur Bodenbewertung. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden* (S. Heiden, R. Erb, W. Dott, A. Eisenträger, Hrsg.), pp 147 - 165. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Roos PH, Tschirbs S, Welge P, Hack A, Theegarten D, Mogilevski G, Wilhelm M (angenommen). Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to PAH-contaminated soils. *Arch. Toxicol.*

Roos PH, Tschirbs S, Hack A, Welge P, Wilhelm M (in Vorbereitung) The xenobiotic metabolism machinery in minipigs and rats: inter-species comparison of basal competence and inducibility

Poster/Abstracts

4. Jahrestagung der Internationalen Gesellschaft für Umweltmedizin, Hannover, 2000

Roos, P.H.

Cytochrom P450 CYP1A1 des Darms und der Leber als sensitiver Effektbio marker für oral aufgenommene polyzyklische aromaten (PAK) in Minischweinen. Poster A50

International Congress on Environmental Health, Hannover, 2000

Roos PH, Tschirbs S, Welge P, Hack A, Wilhelm M

Duodenal and Hepatic Cytochrome P450 CYP1A1 as Sensitive Biomarker of Effect in Minipigs Following Oral Exposition to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH).

Poster A93.

Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 2001

Roos PH, Tschirbs S, Welge P, Hack A, Wilhelm M

Alterations of the cytochrome P450 profile in multiple tissues of minipigs following oral intake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 363 (Suppl.), R134 (2001)

European Symposium 'Molecular Investigation of Metabolism and Transport of Drugs – From Animal to Human Tissue, Halle 2001

Roos PH, Tschirbs S, Welge P, Hack A, Wilhelm M

Different organ-specific responses of CYP1A1-induction in minipigs and rats after oral intake of PAH-contaminated soil particles. Poster P25.