

Programm Lebensgrundlage Umwelt
und ihre Sicherung (BWPLUS)

Abschlussbericht

Untersuchungen zur Toxizität der Platingruppen- elemente Pt, Pd und Rh

Bernd Sures, Sonja Zimmermann

Zoologisches Institut I, Ökologie-Parasitologie, Universität Karlsruhe

Förderkennzeichen: BWR 22012

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden durch Mittel
des Landes Baden-Württemberg gefördert.

November 2005

Inhalt

Zusammenfassung.....	3
Summary	4
1 Einleitung.....	5
2 Material und Methoden	5
2.1 Zelltests	5
2.2 Expositionsversuche mit der Dreikantmuschel.....	7
2.2.1 Bestimmung der Hitzeschockprotein-Induktion	9
2.2.2 Bestimmung der Metallothionein-Induktion.....	9
3 Ergebnisse.....	10
3.1 Zytotoxizität.....	10
3.1.1 Vitalitätstest.....	10
3.1.2 Oxidativer Stress	12
3.2 Organismische Toxizität	14
3.1.1 Metallaufnahme durch die Muscheln.....	14
3.1.2 Induktion von Hitzeschockproteinen	17
3.1.3 Metallothionein-Induktion	20
4 Diskussion.....	22
4.1 Zytotoxizität	22
4.1.1 Vitalität.....	22
4.1.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.....	23
4.2 Organismische Toxizität	24
4.2.1 Metallanreicherung.....	24
4.2.2 Induktion von Hitzeschockproteinen	25
4.2.3 Metallothionein-Induktion	28
5 Schlussfolgerung.....	29
6 Literatur.....	30
Projektspezifische Veröffentlichungen.....	35

Untersuchungen zur Toxizität der Platingruppenelemente Pt, Pd und Rh

Förderkennzeichen (BWR 22012)

Bernd Sures, Sonja Zimmermann: Zoologisches Institut I, Ökologie-Parasitologie, Universität Karlsruhe, Kornblumenstr. 13, 76128 Karlsruhe

Zusammenfassung

Im vorliegenden zweijährigen Projekt wurden biologische Effekte der Platingruppenelemente (PGE) Pt, Pd und Rh im Vergleich zu anderen Schwermetallen auf zellulärer und organischer Ebene untersucht. Nach 24-stündiger Exposition von Lungenepithelzellen (BEAS-2B) mit verschiedenen Metallsalzen lag im MTT-Test die höchste LC₅₀ mit 1,2 mmol/l für RhCl₃ vor, gefolgt von NiCl₂ mit 0,8 mmol/l und dann Pt(NO₃)₂ und PdSO₄ mit jeweils 0,4 mmol/l. Für PtCl₄ bzw. CrO₃ ergab sich eine LC₅₀ von 0,05 mmol/l bzw. 0,02 mmol/l. Der niedrigste LC₅₀-Wert wurde mit 0,005 mmol/l für CdCl₂ ermittelt. Zusätzlich führten Pt(NO₃)₂, PtCl₄ und CrO₃ während 2-stündiger Exposition in den Zellen zu einer verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS). Dabei erzielte PtCl₄ den stärksten Effekt, gefolgt von CrO₃ und Pt(NO₃)₂. Damit lag die Zytotoxizität der PGE in einem ähnlichen Bereich wie die anderer Schwermetalle.

Neben den Zelltests wurden Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) mit verschiedenen Einzelementlösungen (Pt, Pd, Rh, Pb und Cd) bzw. Partikel-gebundenen PGE (Katalysatormaterialien, Versickerbeckensediment, Klärschlamm) exponiert. Bei allen Ansätzen war während der 10wöchigen Exposition im Muschelweichgewebe eine mehrwöchige, gegenüber der Kontrolle eindeutig erhöhte Induktion von Hitzeschockproteinen (HSP70) zu erkennen, wobei bei der Exposition mit Einzelementlösungen der HSP-Anstieg früher erfolgte als bei der Exposition mit partikulären Metallen. Obwohl bei der Exposition mit Einzelementlösungen Pt in wesentlich stärkerem Maße von den Muscheln angereichert wurde als Pd und Rh, war die HSP-Induktion bei Pd höher und bei Rh vergleichbar mit der von Pt. Pb und Cd erzielten hingegen deutlich niedrigere Effekte als die drei PGE.

Neben der HSP-Induktion, führten Pt, Pd und Cd zu einer Induktion der Metallothionein (MT)-Produktion im Muschelweichgewebe. Die stärkste Induktion wurde durch Cd verursacht, gefolgt von Pd und Pt. Dabei lag ein hoch signifikanter ($p < 0,001$), linearer Zusammenhang zwischen der MT-Konzentration und dem Metallgehalt in den Dreikantmuscheln vor. Rh und Pb induzierten hingegen keine Metallothionein-Bildung.

Somit stellen Hitzeschockproteine und Metallothioneine vielversprechende Biomarker für Kfz-bürtige PGE dar, die auch in vielen anderen Testorganismen zur Anwendung kommen könnten.

Von den drei Kfz-emittierten Platinmetallen dürfte vor allem Pd von (öko-)toxikologischem Interesse sein. Für eine zuverlässige Abschätzung des Risikopotentials Kfz-bürtiger PGE bedarf es jedoch weiterer toxikologischer Untersuchungen und Freilandstudien zur Erfassung der aktuellen Kontaminationssituation.

Summary

In the present project, which ran over 2 years, toxic effects of the platinum group elements (PGE) Pt, Pd and Rh were compared with those of other heavy metals. Therefore, cell tests as well as exposure studies with mussels were performed.

Following 24h exposure to metal salts, the LC₅₀ of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) was highest for RhCl₃ (1.2 mmol/L), followed by NiCl₂ (0.8 mmol/L), Pt(NO₃)₂ and PdSO₄ (0.4 mmol/L), PtCl₄ (0.05 mmol/L), CrO₃ (0.02 mmol/L) and CdCl₂ (0.005 mmol/L). Additionally, Pt(NO₃)₂, PtCl₄ and CrO₃ enhanced the cellular production of reactive oxygen species (ROS).

Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) were exposed to single element standard solutions (Pt, Pd, Rh, Pb or Cd) and particle bound PGE (catalyst material, sediment of drainage basin, sewage sludge), respectively. Every metal source caused a temporary increase of the production of heat shock proteins (HSP70) in the mussel soft tissue during 10 weeks of exposure. For soluble metals the increase in HSP70 was earlier than for particle bound PGE. Following exposure to standard solutions, the HSP induction decreased in the order Pd > Pt ≥ Rh > Pb > Cd.

Furthermore, Pt, Pd and Cd induced the production of metallothionein (MT) in the zebra mussels. The strongest effect was found for Cd, followed by Pd and Pt. There was a highly significant (p<0.001) linear correlation between the MT levels and the metal concentrations in the mussel soft tissue. No MT induction was observed for Rh and Pb.

Consequently, heat shock proteins and MT are promising biomarker for traffic related PGE, which may be used in a high variety of test organisms. Among the PGE, Pd seems to be the metal of highest (eco-)toxicological interest. Nevertheless, for a valid evaluation of the environmental risk further toxicological studies as well as field investigations have to be done.

1 Einleitung

Die in Autoabgaskatalysatoren enthaltenen Platingruppenelemente (PGE) Pt, Pd und Rh werden beim Fahrbetrieb mit dem Autoabgas emittiert (z.B. PALACIOS et al., 2000) und gelangen somit in die Umwelt. Studien weisen weltweit nach, dass die Umweltkontaminationen mit PGE stetig ansteigen (Überblick in HOPPSTOCK & SURES, 2004). Obwohl die Edelmetalle überwiegend in metallischer Form und an Partikel gebunden freigesetzt werden, konnte in den letzten Jahren die biologische Verfügbarkeit von Pt, Pd und Rh für Pflanzen und auch Tiere eindeutig nachgewiesen werden (Überblick in HOPPSTOCK & SURES, 2004; RAVINDRA et al., 2004; ZIMMERMANN & SURES, 2004). So lagen z.B. die Aufnahmeraten für Pt und Rh bei Dreikantmuscheln in dem gleichen Bereich wie die anderer Kfz-emittierter Metalle (z.B. Pb, Sb) und Pd erreichte sogar Aufnahmeraten, die zwischen denen der beiden essentiellen Elemente Fe und Cu lagen (ZIMMERMANN et al., 2002). Demzufolge ist es notwendig, mögliche toxische Folgen eines vermehrten Eintrages der PGE in die Umwelt zu untersuchen. Daher wurden im vorliegenden zweijährigen Projekt verschiedene toxikologische Experimente auf zellulärer und organischer Ebene durchgeführt. An humanen Bronchialepithelzellen wurde die Vitalität nach Exposition mit löslichen PGE-Salzen bestimmt und anschließend die LC_{50} (Konzentration, bei der 50% der Zellen sterben) ermittelt. Eine weitere Fragestellung war, inwiefern PGE oxidativen Stress in den Zellen auslösen. Zur Untersuchung der organismischen Toxizität wurden Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) nach Exposition mit löslichen PGE-Salzen bzw. mit Partikel-gebundenen PGE (zerriebenes Katalysatormaterial, Versickerbeckensediment oder Klärschlamm) auf die Induktion von Hitzeschockproteinen (HSP70) und metallbindenden Proteinen (Metallothioneine) hin untersucht. Diese beiden Parameter wurden ausgewählt, da sie als Biomarker für zahlreiche Schwermetalle eingesetzt werden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob die HSP- bzw. Metallothionein-Induktion auch als Biomarker für PGE geeignet ist.

2 Material und Methoden

2.1 Zelltests

Für die Experimente zur Zytotoxizität kam die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B (ATCC) zum Einsatz. In 96-well-Mikrotiterplatten wurden je 50.000 Zellen/well ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, damit die Zellen anwachsen konnten. Die Metallexpositionen erfolgten mit den Metallsalzen $Pt(NO_3)_2$, $PtCl_4$, $PdSO_4 \cdot 2 H_2O$, $RhCl_3 \cdot 3 H_2O$, $CdCl_2$, CrO_3 und $NiCl_2$ (alle Merck, Darmstadt). Da die Exposition mit einem Metallkation stets mit der Anwesenheit des entsprechenden Anions verbunden ist, das seinerseits

Effekte auslösen kann, wurden zusätzlich verschiedene Anionen getestet. Hierzu wurden die Natriumsalze NaNO_3 , NaCl und Na_2SO_4 (alle Merck, Darmstadt) eingesetzt. Für den Vitalitätstest bzw. den Test auf oxidativen Stress mit Metallsalzen wurden zunächst Stammlösungen (1000 mg/l) mit dem Zellkulturmedium (Keratinocyte Growth Medium, KGM; Cambrex, Apen) bzw. mit HBSS (Gibco, Eggenstein) angesetzt, die Ansätze dann für 5 min bei 1500 g zentrifugiert und der klare Überstand für die weiteren Verdünnungsschritte verwendet. Da sich die Salze zum Teil schlecht in dem Medium lösten, wurde der tatsächliche Metallgehalt der Stammlösung mittels elektrothermaler Atomabsorptionsspektrometrie (ET-AAS) bzw. Atomemissionsspektrometrie (ICP-AES) gemessen.

Für den Vitalitätstest erfolgte die Metallexposition der Zellen über 24 h im Brutschrank. Anschließend wurde die Zellvitalität in Abhängigkeit von der Expositionskonzentration mittels MTT-Test bestimmt, bei dem die Aktivität einer mitochondrialen Dehydrogenase untersucht wird (FENT, 2003). Das Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid; Sigma, Seelze) wird nur von lebenden Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien mit NADH zu blauvioletten Formazan-Kristallen reduziert. Die Intensität der Blaufärbung wird photometrisch quantifiziert und ist somit direkt proportional zum Anteil lebender Zellen.

Eine Möglichkeit zum Nachweis für allgemeinen Zellstress ist die Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die für eine Reihe von Zellschädigungen verantwortlich sind. Beim sogenannten DCF-Test dient die Oxidation von $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat) zu DCF (2',7'-dichloro-fluorescein) durch ROS als Indikatorreaktion für oxidativen Zellstress. Daher wurde vor der Metallexposition pro Well (mit je 50.000 Bronchialepithelzellen) 100 μl 50 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (Molecular Probes, Göttingen) auf die Zellen gegeben und die Platte für 40 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde auf Eis die Farbstofflösung abgesaugt und die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen. Von den vorbereiteten Metalllösungen wurden 200 μl pro Well auf die Zellen gegeben und sofort am Fluoreszenzreader (FL 600 Fluorescence Plate Reader; Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall) bei 485/530 nm der Anstieg der Fluoreszenz über 2 h gemessen. Anschließend wurde für jeden Expositionsansatz die Steigung der linearen Fluoreszenzzunahme ermittelt und auf die Steigung des Kontrollansatzes normiert. Die relativen Steigungen konnten dann gegen die Expositionskonzentrationen aufgetragen werden. Bei beiden Tests wurde jeder Versuchsansatz dreifach mit Zellen aus drei verschiedenen Passagen, also insgesamt neunmal durchgeführt.

2.2 Expositionsversuche mit der Dreikantmuschel

Die Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) stammten aus dem Ablauf des Mondsees (Mondseeache) in Österreich. Die Muscheln hatten eine durchschnittliche Schalenlänge von (20 ± 3 mm) und eine durchschnittliche Masse von ($1,04 \pm 0,55$ g). Die Exposition der Dreikantmuscheln erfolgte in 20 L Plasticaquarien mit belüftetem Leitungswasser, dem die Metalle in Form von Einzelementlösungen (Pt, Pd und Rh: 1000 µg/ml, Ultra Scientific, Wesel; Pb und Cd: 1000 µg/ml, Merck, Darmstadt) bzw. als partikuläres Material (siehe Tab. 1) zugesetzt waren. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Versuchsgruppen. In Experiment I mit Einzelementlösungen wurde das Hälterungswasser zweimal pro Woche gewechselt und die Metalle neu verabreicht. In Experiment II mit partikulären Metallquellen erfolgte nur einmal pro Woche ein Wasserwechsel. Die maximale Expositionsdauer betrug 10 Wochen. Aus jedem Ansatz wurde wöchentlich eine Muschelprobe (ca. 100 Tiere) entnommen. Nach der Exposition wurden die Muscheln zur Entleerung des Darms für 2 Tage in unkontaminiertes Wasser überführt (vgl. RODITI & FISHER, 1999). Anschließend wurden die Muscheln getötet und das Weichgewebe präpariert. Die Weichgewebe der Muscheln eines Versuchsansatzes und eines Expositionszeitpunktes wurden zu einer Sammelprobe (ca. 100 Tiere) vereinigt und mit einem Dispergierstab homogenisiert. Ein Aliquot des Homogenats wurde gefriergetrocknet und anschließend auf die Metallgehalte untersucht. Das restliche Homogenat wurde bis zur Weiterverarbeitung für die Bestimmung des HSP- bzw. Metallothionein-Gehaltes bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 1: Übersicht über die für die Muschelexpositionen eingesetzten partikulären Metallquellen

Metallquelle	Metallgehalt	Beschreibung
Sub	-	Katalysatorträgermaterial ohne PGE (Substrat), Engelhard Technologies GmbH, Nienburg/Weser Korngröße: $2,08 \pm 2,07$ µm
KatE	360 µg/g Pt 4980 µg/g Pd 360 µg/g Rh	Zerriebenes Katalysatormaterial, Engelhard Technologies GmbH, Nienburg/Weser Korngröße: $0,61 \pm 0,40$ µm
KatD1	2410 ± 30 µg/g Pt < 40 µg/g Pd 602 ± 7 µg/g Rh	Zerriebener Pt-Katalysator, Degussa AG, Hanau Korngröße: $0,71 \pm 0,86$ µm
KatD2	< 40 µg/g Pt 2660 ± 30 µg/g Pd 614 ± 7 µg/g Rh	Zerriebener Pd-Katalysator, Degussa AG, Hanau Korngröße: $0,90 \pm 1,01$ µm
Sed	134 ± 23 ng/g Pt 41 ± 24 ng/g Pd 25 ± 3 ng/g Rh	Sediment aus einem Absetzbecken an der Bundesautobahn BAB5 bei Köln/Siegburg, Umweltbundesamt, Berlin Korngröße: < 90 µm
KS	49 ± 31 ng/g Pt 31 ± 14 ng/g Pd 14 ± 4 ng/g Rh	Klärschlamm aus einer kommunalen Kläranlage, Umweltbundesamt, Berlin Korngröße: < 90 µm

Tab. 2: Übersicht über die Versuchsgruppen der beiden Muschelexpositionsversuche und Angabe der Wasserparameter ($\bar{x} \pm SD$)

Experiment	Gruppe	Exposition	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	pH-Wert
I	Kontrolle	-	12,4 ± 0,5	686 ± 54	8,1 ± 0,5
I	Pt	500 µg/l Pt(IV) ¹	12,5 ± 0,8	630 ± 77	8,1 ± 0,5
I	Pd	500 µg/l Pd(II) ¹	12,4 ± 0,6	646 ± 52	8,1 ± 0,5
I	Rh	500 µg/l Rh(III) ¹	11,8 ± 0,5	610 ± 86	8,2 ± 0,4
I	Pb	500 µg/l Pb(II) ¹	12,4 ± 0,8	654 ± 59	8,0 ± 0,6
I	Cd	500 µg/l Cd(II) ¹	12,3 ± 0,7	640 ± 66	8,1 ± 0,5
II	KoSub	100 mg/l Sub ²	15,6 ± 1,3	611 ± 47	7,9 ± 0,3
II	KatE	100 mg/l KatE ²	15,2 ± 1,2	605 ± 50	8,0 ± 0,4
II	KatD	100 mg/l KatD1 ² 100 mg/l KatD2 ²	14,9 ± 1,2	605 ± 49	8,1 ± 0,3
II	Sed	500 mg/l Sed ²	14,9 ± 1,3	608 ± 52	8,0 ± 0,3
II	KS	300 mg/l KS ²	15,1 ± 1,2	627 ± 57	7,9 ± 0,4

¹: Einzelementlösung

²: partikuläre Metallquelle, vgl. Tab. 1

Bei der Exposition mit Einzelementlösungen erfolgte die Bestimmung des Pt-, Pd-, Rh-, Cd- bzw. Pb-Gehaltes mittels elektrothermaler Atomabsorptionsspektrometrie (ET-AAS) nach Mikrowellenaufschluss des Muschelweichgewebes (siehe SURES et al., 1995; ZIMMERMANN et al., 2003). Im Experiment mit partikulärem Material wurden die PGE in Abhängigkeit von ihrer zu erwartenden Konzentration mittels ET-AAS oder adsorptiver Voltammetrie (ACSV) bzw. totalreflektierender Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) bestimmt (siehe ZIMMERMANN et al., 2003). In den Muscheln, die mit Versickerbeckensediment bzw. Klärschlamm exponiert waren, wurden zusätzlich die Gehalte an As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Sb, Sn, Zn mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) ermittelt.

Die Metallgehalte im Muschelweichgewebe wurden über der Expositionsdauer aufgetragen. Anschließend wurden die Aufnahmezeiten der einzelnen Metalle als Steigung der Regressionsgeraden während der linearen Anstiegsphase der Metallakkumulation ermittelt.

2.2.1 Bestimmung der Hitzeschockprotein-Induktion

Die Isolierung und Bestimmung der Hitzeschockproteine (HSP) wurde in Anlehnung an die von SURES (2002) und TOKALOV & GUTZEIT (2003) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Der Nachweis des Hitzeschockproteins HSP70 erfolgte aus einem Zellrohaufschluss. Dieser wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und das HSP70 über zwei aufeinander folgende Antikörperbindungen mit anschließender Enhanced Chemiluminescence-Reaktion (ECL-Kit, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) detektiert. Voraussetzung für diese Technik ist die am sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase. Dieses Enzym setzt als Substrat Luminol über eine Oxidationsreaktion um, wobei Licht ausgesendet wird, das mittels eines Films detektiert wird. Für die semiquantitative HSP-Bestimmung wurde der Schwärzungsgrad der Proteinbanden auf dem Film computerunterstützt ermittelt und der relative HSP70-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle bestimmt. In Experiment II wurde zur Ermittlung des absoluten HSP70-Gehaltes zusätzlich ein HSP70-Standard (HSP70 Standard aus Rinderhirn, H9776, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) bekannter Konzentration bei der HSP70-Bestimmung mitgeführt.

2.2.2 Bestimmung der Metallothionein-Induktion

Die Metallothionein-Induktion im Muschelweichgewebe wurde mittels der Silbersättigungsmethode (SCHEUHAMMER & CHERIAN, 1985) bestimmt. Diese Methode beruht auf dem Effekt, dass Silberionen mit sehr hoher Affinität an Metallothionein (MT) binden. Dabei verdrängen sie andere, weniger stark bindende Metalle, auch solche, welche die Bildung des Metallothioneins ursprünglich induziert haben. Über eine Ag-Bestimmung mittels ET-AAS kann der MT-Gehalt ermittelt werden, da pro Mol MT 17 Mol Ag^+ gebunden werden (SCHEUHAMMER & CHERIAN, 1985).

Für den Zellaufschluss wurden bis zu 1g homogenisiertes Muschelweichgewebe mit 3 ml 0,25 M Sucroselösung versetzt und mit einem Dispergierstab (Ultra-Turrax T 25) homogenisiert. Nach Zentrifugation (20.000 g, 4°C, 20 Min.) wurden 600 µl des Überstands mit 500 µl Silbernitratlösung (20 mg/l) versetzt und bei Raumtemperatur (RT) für 20 Minuten inkubiert. Zur Abtrennung des überschüssigen Silbers und hitzelabiler Proteine erfolgte die Zugabe von 100 µl einer Erythrozyten-Suspension (Red Blood Cells from Sheep, Sigma, Taufkirchen) in Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline, PBS) und ein 10minütiger Kochschritt im Wasserbad mit anschließender Zentrifugation (1.200 g, RT). Dieser Reinigungsschritt wurde zweimal wiederholt. Der letzte Zentrifugationsschritt erfolgte bei 16.000 g für 15 Minuten.

Da in *in vitro* Bindungsstudien von NIELSON et al. (1985) Pt(IV) bzw. Pd(II) das an MT gebundene Silber weitgehend vertrieb, Cd hingegen nur einen kleinen und Rh und Pb keinen Einfluss auf die Bindung des Ag an MT zeigte, wurden in den aufbereiteten Zellextrakten neben dem Ag-Gehalt auch die Konzentration des Metalls, mit dem die entsprechende Gruppe exponiert war, gemessen.

3 Ergebnisse

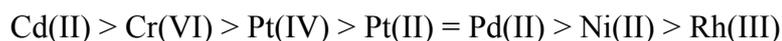
3.1 Zytotoxizität

3.1.1 Vitalitätstest

Der Einfluss verschiedener PGE-Salze im Vergleich zu anderen Schwermetallsalzen auf die Vitalität von Lungenepithelzellen in Abhängigkeit von der Expositionskonzentration ist in Abb. 1 dargestellt. Bei allen untersuchten Metallen nahm nach Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes mit zunehmender Expositionskonzentration die relative Zellvitalität ab. Diese Abnahme erfolgte bei den meisten Metallen innerhalb eines Konzentrationsbereiches von mindestens einer Größenordnung, während beim Pd die relative Vitalität deutlich schneller abfiel.

Im Vergleich zu den Metallkationen war für die korrespondierenden Anionen Chlorid, Nitrat und Sulfat im getesteten Konzentrationsbereich (bis über 1 mmol/l) kein Einfluss auf die Vitalität der Zellen zu beobachten, so dass der Einfluss der Metallsalze auf die Zellvitalität ausschließlich auf die Metallkationen zurückzuführen ist.

Mit Hilfe der Vitalitätskurven wurden die LC_{50} -Werte für die verschiedenen Metalle bestimmt. Die höchste LC_{50} lag mit 1,2 mmol/l für Rh(III) vor, gefolgt von Ni(II) mit 0,8 mmol/l und dann Pt(II) und Pd(II) mit jeweils 0,4 mmol/l. Für Pt(IV) bzw. Cr(VI) ergab sich eine LC_{50} von 0,05 mmol/l bzw. 0,02 mmol/l. Der niedrigste LC_{50} -Wert wurde mit 0,005 mmol/l für Cd(II) ermittelt. Hieraus ergibt sich für die Toxizität der Metalle die Reihenfolge:



Damit lag die Zytotoxizität von Pt(IV), Pt(II) und Pd(II) zwischen denen von Cr(VI) und Ni(II). Rh zeigte hingegen erst bei höheren Konzentrationen einen letalen Effekt.

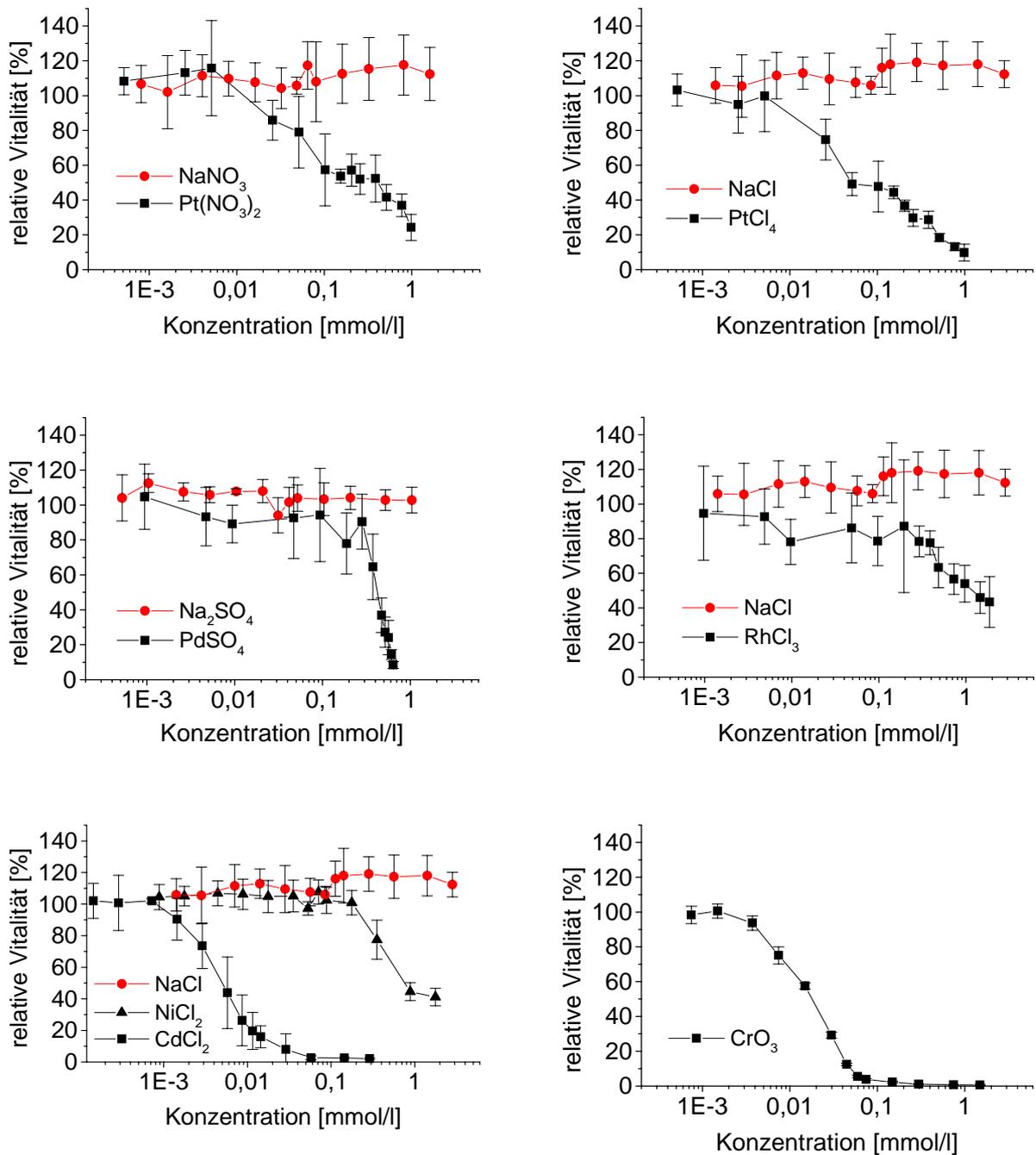


Abb. 1. Relative Vitalität (bezogen auf den Ansatz mit nicht exponierten Zellen) von BEAS-2B Zellen in Abhängigkeit von der Metall- bzw. Anionen-Konzentration nach 24h Exposition mit verschiedenen Metallsalzen ($\text{Pt}(\text{NO}_3)_2$, PtCl_4 , PdSO_4 , RhCl_3 , CdCl_2 , NiCl_2 , CrO_3) im Vergleich zur Kontrollexposition mit den entsprechenden Na-Salzen (NaNO_3 , NaCl , Na_2SO_4). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 9 Einzelmessungen.

3.1.2 Oxidativer Stress

Als ein Parameter für allgemeinen Zellstress wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) untersucht. Es wurden die gleichen Metallsalze wie beim Vitalitätstest verwendet. Die relativen ROS-Konzentrationen in den Lungenepithelzellen während zweistündiger Exposition mit verschiedenen Metallsalzen sind in Abhängigkeit von der Expositionskonzentration in Abb. 2 dargestellt. Bei Pt(II), Pt(IV) und Cr(VI) stieg bis zum Erreichen des Maximums die relative ROS-Konzentration kontinuierlich an und fiel anschließend stark ab. Im Gegensatz dazu war für die korrespondierenden Anionen Nitrat und Chlorid in dem untersuchten Konzentrationsbereich kein Einfluss auf die ROS-Bildung zu beobachten. Somit führten die beiden Pt-Spezies und Cr(VI) zu einer verstärkten ROS-Bildung in den BEAS-2B Zellen. Den stärksten Effekt auf die ROS-Bildung erzielte Pt(IV), gefolgt von Cr(VI) und dann Pt(II).

Neben Pt(II), Pt(IV) und Cr(VI) zeigte auch Pd(II) und Rh(III) ab einer bestimmten Konzentration einen Abfall der relativen ROS-Konzentration. Diese Effektkonzentration lag bei 0,02 mmol/l für Rh(III), 0,03 mmol/l für Pd(II), 0,04 mmol/l für Pt(II), 0,2 mmol/l für Cr(VI) und 0,3 mmol/l für Pt(IV).

Bei CdCl₂ und NiCl₂ war über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich kein Unterschied zwischen der Metall- und der Kontrollexposition zu erkennen (Abb. 2). Somit zeigten Cd(II) und Ni(II) in dem eingesetzten Konzentrationsbereich keinen Effekt auf die zelluläre ROS-Bildung.

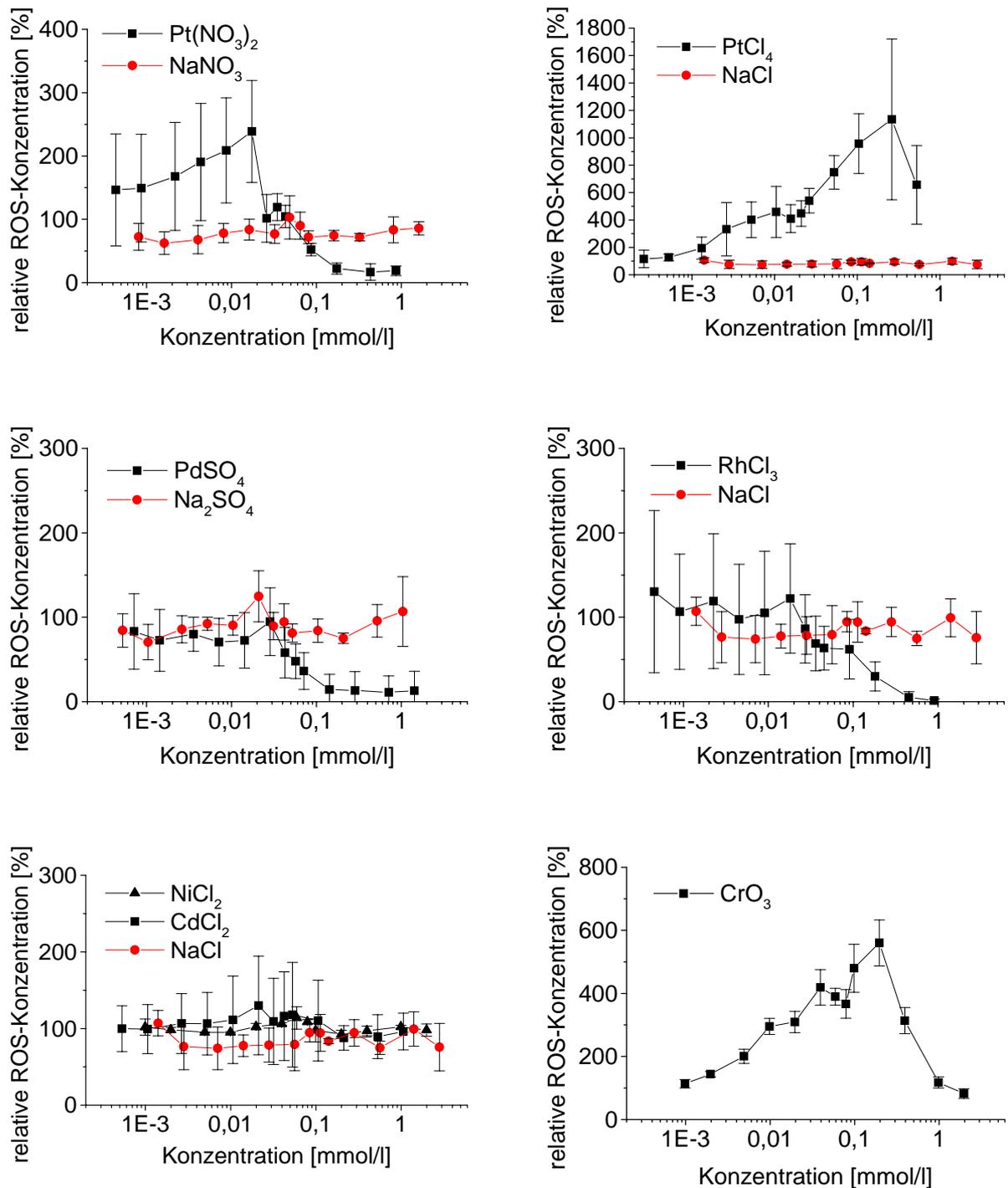


Abb. 2. Relative ROS-Konzentration (bezogen auf den Ansatz mit nicht exponierten Zellen) in BEAS-2B Zellen in Abhängigkeit von der Metall- bzw. Anionen-Konzentration während 2h Exposition mit verschiedenen Metallsalzen (Pt(NO₃)₂, PtCl₄, PdSO₄, RhCl₃, CdCl₂, NiCl₂, CrO₃) im Vergleich zur Kontrollexposition mit den entsprechenden Na-Salzen (NaNO₃, NaCl, Na₂SO₄). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 9 Einzelmessungen.

3.2 Organismische Toxizität

3.2.1 Metallaufnahme durch die Muscheln

Der Verlauf der Metallkonzentrationen im Weichgewebe der Dreikantmuschel während 10wöchiger Exposition mit Einzelelementlösungen der Metalle Pt, Pd, Rh, Cd bzw. Pb ist in der Abb. 3 dargestellt. Bei allen Metallen stieg die Konzentration im Muschelweichgewebe mit der Expositionsdauer an. In der Kontrolle lagen die Pt-, Pd-, Rh- und Pb-Werte unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenzen der ET-AAS (NG als dreifache Standardabweichung des Blindwertes; Pt: 430 ng/g, Pd: 140 ng/g, Rh: 20 ng/g, Cd: 2 ng/g, Pb 40 ng/g) während der Cd-Gehalt 3 µg/g betrug. Die stärkste Metallanreicherung in den Muscheln lag für Cd(II) vor, gefolgt von Pt(IV), Pd(II), Pb(II) und Rh(III). Nach 10wöchiger Exposition waren die Metallkonzentrationen im gefriergetrockneten Muschelweichgewebe um den Faktor 579 (Cd), 311 (Pt), 66 (Pd), 39 (Pb) und 37 (Rh) höher verglichen mit der eingesetzten Expositionskonzentration von 500 µg/l Metall im Hälterungswasser, wobei Cd, Pt und Pb in der 10. Woche bereits das Akkumulationsplateau erreicht hatten, während sich die Pd- und Rh-Gehalte noch in der Anstiegsphase befanden.

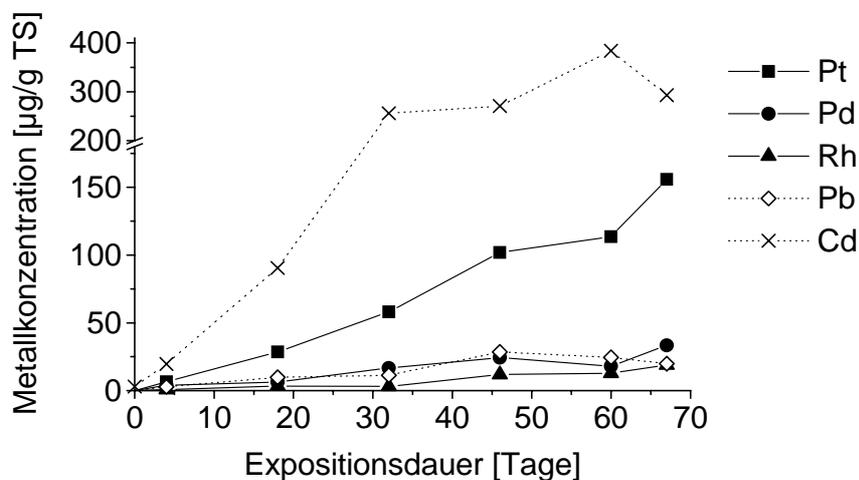


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der Metallanreicherung im Weichgewebe der Dreikantmuschel während 10wöchiger Exposition mit Einzelelementlösungen

Aufgrund der relativ hohen Nachweisgrenzen konnte bei der Exposition mit partikulären PGE-Quellen nur in den beiden Ansätzen mit Katalysatormaterial (KatE und KatD) Pd und Rh mittels Atomabsorptionsspektrometrie nachgewiesen werden (Abb. 4). Für die Pt-Bestimmung wurde daher die wesentlich sensitivere adsorptive Voltammetrie (ACSV) eingesetzt. Zudem wurden bei

den Muschelproben des Sed- bzw. KS-Ansatzes die Pt- und Rh-Gehalte voltammetrisch bestimmt und die Pd-Gehalte mittels totalreflektierender Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) nach Anreicherung in Quecksilber ermittelt (NG: Pt: 0,03 ng/g, Pd: 0,5 ng/g, Rh: 0,3 ng/g). Da die PGE-Bestimmung mittels ACSV bzw. TXRF jedoch sehr aufwendig ist und in Dortmund durchgeführt werden musste, wurden mit diesen Verfahren bislang nur die Muschelproben der 1. und 10. Expositionswoche analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 und Tabelle 3 ersichtlich.

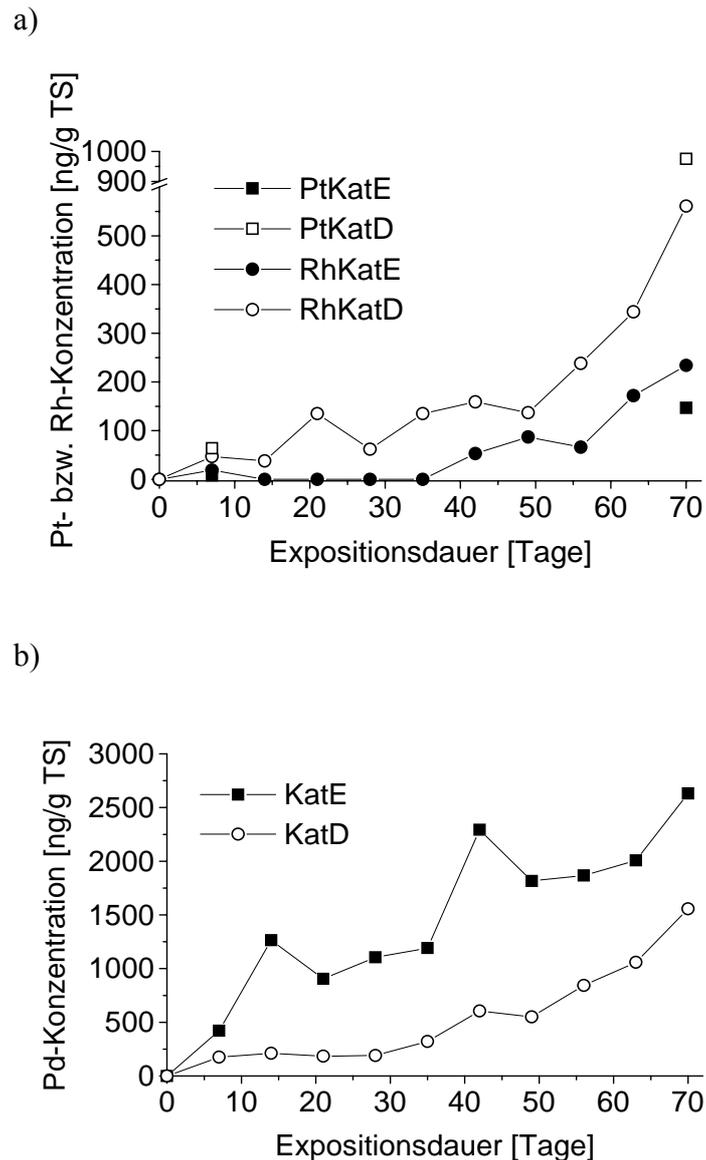


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Anreicherung von Pt bzw. Rh (a) und Pd (b) im Weichgewebe der Dreikantmuschel während 10wöchiger Exposition mit zerriebenen Katalysatormaterialien (vgl. Tab. 1).

In den Dreikantmuscheln der beiden Ansätze mit Katalysatormaterial lag eine deutliche zeitliche Zunahme der PGE-Gehalte vor (Abb. 4). Dabei wurde Pd am stärksten angereichert. Dies traf auch auf den Ansatz mit der Pt/Pd-Katalysatormaterialmischung (KatD) zu, bei dem die Expositionskonzentrationen von Pt und Pd nahezu identisch waren. Entsprechend der Unterschiede in den PGE-Gehalten der eingesetzten Metallquellen war in den Muscheln des KatD-Ansatzes die Pt- und Rh-Akkumulation höher, die Pd-Akkumulation jedoch niedriger verglichen mit dem KatE-Ansatz. Nach 10-wöchiger Exposition waren die PGE-Konzentrationen im Muschelweichgewebe des KatD-Ansatzes um den Faktor 4,0 (Pt), 5,8 (Pd) bzw. 4,6 (Rh) höher verglichen mit der eingesetzten Expositionskonzentration an Partikel gebundenen Metallen im Hälterungswasser von 241 µg/l Pt, 266 µg/l Pd bzw. 122 µg/l Rh. Für den KatE-Ansatz ergaben sich bezogen auf die Expositionskonzentrationen von 36 µg/l Pt, 498 µg/l Pd bzw. 36 µg/l Rh Anreicherungsfaktoren von 4,1 (Pt), 5,2 (Pd) bzw. 6,5 (Rh).

Im Gegensatz zu den Ansätzen mit Katalysatormaterialien waren die PGE-Gehalte (mit Ausnahme des Pt-Gehaltes im KS-Ansatz) in den Muscheln des KoSub-, Sed- bzw. KS-Ansatzes nach 10-wöchiger Exposition niedriger verglichen mit den Werten der Muscheln, die nur eine Woche exponiert waren (Tab. 3). In allen Proben lagen die höchsten PGE-Gehalte für Pd vor.

Tab. 3: PGE-Gehalte im Weichgewebe der Dreikantmuschel nach 1- bzw. 10-wöchiger Exposition mit zerriebenem Katalysatorträgermaterial (KoSub), Sediment aus einem Absetzbecken an der BAB 5 (Sed) bzw. mit Klärschlamm (KS)

Gruppe	Expositionsdauer [Wochen]	Pt [ng/g TS]	Pd [ng/g TS]	Rh [ng/g TS]
KoSub	1	2,2	- ¹	38,6
	10	2,5	116,7	5,1
Sed	1	1,3	63,8	7,6
	10	0,9	22,9	0,7
KS	1	4,4	119,9	4,2
	10	6,7	44,2	0,4

¹: nicht bestimmt

Neben den PGE-Konzentrationen wurden in den Muscheln aus dem Sed- bzw. KS-Ansatz zusätzlich die Gehalte an As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Sb, Sn, Zn analysiert. Mit Ausnahme von Mn war beim Sed-Ansatz für alle untersuchten Metalle eine Zunahme der Metallkonzentration im Muschelweichgewebe mit ansteigender Expositionsdauer zu beobachten (SOM, 2004). Dabei nahm die Anreicherung (Metallgehalt der 10. Woche verglichen mit dem Ausgangswert vor der Exposition) in der Reihenfolge Sb > Pb > Sn > Zn > Cr > Cu > As ab. Die Konzentrationen an Cd und Co stiegen hingegen nur geringfügig während der 10wöchigen Exposition an. Weiterhin nahmen die Muscheln des KS-Ansatzes As, Cd, Co, Cr, Sb, Sn und Zn aus dem Klärschlamm

Toxizität der Platingruppenelemente

auf, wobei die Zunahme der Metallkonzentrationen im Muschelweichgewebe bei den meisten Metallen erst ab dem 49. Tag einsetzte (SOM, 2004).

Aus dem zeitlichen Verlauf der Metallgehalte im Muschelweichgewebe wurde bei den Expositionen mit Einzelelementlösungen bzw. Katalysatormaterialien während der linearen Anstiegsphase die tägliche Metallzunahme im Muschelgewebe bestimmt (siehe Tab. 4). Die Metallaufnahme der PGE aus den Einzelelementlösungen waren um 1-3 Größenordnungen höher verglichen mit den PGE aus den Katalysatormaterialien. Bei den Ansätzen mit Einzelelementlösungen lag die höchste Aufnahmerate für Cd vor, gefolgt von Pt, dann Pb und Pd und schließlich Rh. Bei den Ansätzen mit Katalysatormaterialien zeigte Pd die höchste Aufnahmerate. Die Aufnahmeraten von Pd und Pt waren abhängig von den eingesetzten Katalysatormaterialien und spiegeln die PGE-Verhältnisse in den Materialien wider.

Tab. 4: Metallanreicherung während der Exposition von *Dreissena polymorpha* mit Einzelelementlösungen (Pt, Pd, Rh, Pb, Cd) bzw. Katalysatormaterialien (KatE und KatD) ermittelt durch lineare Regression (R: Regressionskoeffizient, P: Signifikanzniveau) in der linearen Anstiegsphase der Metallakkumulation

Gruppe	Metall	Tägl. Metallzunahme im Weichgewebe [µg/g/d]	Lineare Anstiegsphase [d]	R	P
Pt	Pt	2,05	0-46	0,964	< 0,01
Pd	Pd	0,51	0-46	0,984	< 0,01
Rh	Rh	0,24	0-46	0,976	< 0,01
Pb	Pb	0,55	0-46	0,949	< 0,05
Cd	Cd	7,73	0-30	0,975	< 0,05
KatE	Pt	0,002 ¹	1-70 ¹	- ¹	- ¹
	Pd	0,032	0-70	0,918	< 0,0001
	Rh	0,006	35-70	0,940	< 0,01
KatD	Pt	0,014 ¹	1-70 ¹	- ¹	- ¹
	Pd	0,019	0-70	0,918	< 0,0001
	Rh	0,006	0-70	0,870	< 0,01

¹: Die Berechnung der Aufnahmerate beruht auf nur 2 Datenpunkten, da der Pt-Gehalt in den Muscheln nur in der 1. und 10. Woche bestimmt wurde

3.2.2 Induktion von Hitzeschockproteinen

Sowohl bei der Verwendung von Einzelementlösungen als auch von partikulären Metallquellen war während 10wöchiger Exposition eine eindeutige Induktion von Hitzeschockproteinen im Muschelweichgewebe zu erkennen (Abb. 5 und 6).

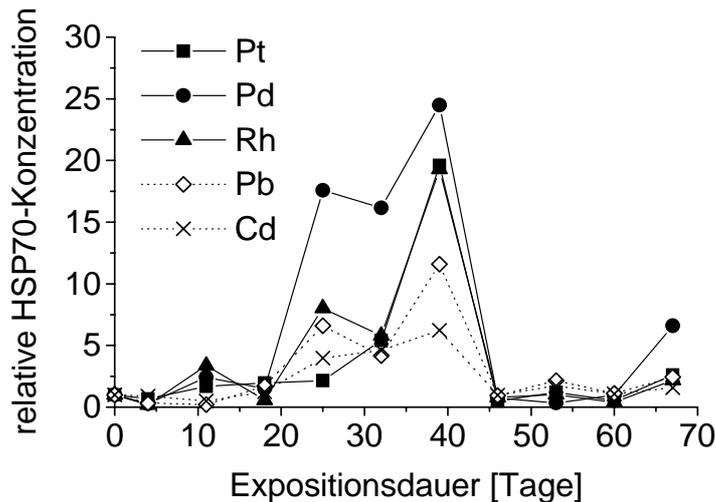


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der relativen HSP70-Konzentration (bezogen auf die Kontrolle) im Weichgewebe der Dreikantmuschel während 10wöchiger Exposition mit Einzelementlösungen

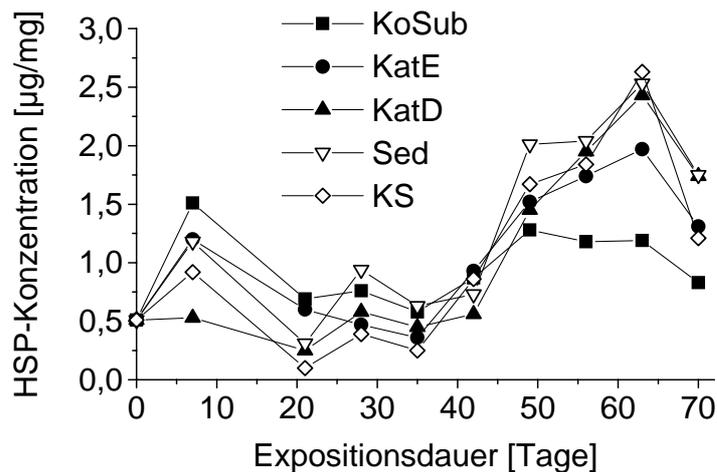


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf der HSP70-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Gesamtprotein] im Weichgewebe der Dreikantmuschel während 10wöchiger Exposition mit partikulären PGE-Quellen (KoSub: Kontrolle mit Katalysatorträgermaterial ohne PGE, KatE + KatD: Katalysatormaterialien, Sed: Sediment aus einem Absetzbecken an der Autobahn, KS: Klärschlamm, vgl. Tab. 1).

Toxizität der Platingruppenelemente

Bei der Exposition mit Metalllösungen zeigten alle untersuchten Metalle einen eindeutigen Effekt auf die HSP70-Induktion zwischen der 3. und 7. Expositionswoche (Abb. 5). Die stärkste HSP70-Induktion wurde durch Pd verursacht, gefolgt von Rh und Pt. Deutlich niedrigere Effekte erzielten Pb und Cd. In der 6. Woche, dem Zeitpunkt der maximalen HSP70-Induktion, waren die HSP70-Gehalte in den exponierten Muscheln um den Faktor 25 (Pd), 20 (Pt), 19 (Rh), 12 (Pb) und 6 (Cd) höher als in den Kontrollmuscheln.

Im Vergleich dazu erfolgte der Anstieg der HSP70-Konzentration im Weichgewebe der mit partikulären Metallen exponierten Muscheln erst in der 7. Woche (Abb. 6). Die HSP70-Konzentrationen der KatE-, KatD-, Sed- bzw. KS-Gruppe waren ab diesem Zeitpunkt signifikant ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test) höher als in den Wochen zuvor, während bei der Kontrolle mit Katalysatorträgermaterial (KoSub) diesbezüglich kein signifikanter Unterschied festzustellen war. Die maximalen HSP70-Werte wurden mit Ausnahme der KoSub-Gruppe in der 9. Expositionswoche ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt war die HSP70-Induktion bei der KatD-, Sed- und KS-Gruppe auf einem vergleichbaren Niveau, das das der KatE-Gruppe übertraf.

Über den Anfangszeitpunkt des HSP70-Anstieges kann die Metallkonzentration im Muschelweichgewebe abgeschätzt werden, bei der die HSP-Induktion einsetzte. Diese Schwellenwertkonzentrationen schwankten bei der Exposition mit Metalllösungen in Abhängigkeit vom Metall im Bereich von 3 – 173 $\mu\text{g/g}$, bei der Exposition mit Katalysatormaterialien zwischen 0,005 und 2,3 $\mu\text{g/g}$ (Tab. 5). Somit lagen die Schwellenwerte bei der Exposition mit partikulärem Material, das gleichzeitig alle drei PGE enthielt, wesentlich niedriger als bei der Exposition mit einzelnen Elementlösungen.

Tab. 5: Startzeitraum der HSP70-Induktion und entsprechende Metallkonzentration im Muschelweichgewebe in diesem Zeitraum

Gruppe	Metall	Startzeitraum der HSP Induktion	Metall-Gehalt im Muschelweichgewebe [$\mu\text{g/g}$]
Pt	Pt	25. – 32. Tag	43 – 58
Pd	Pd	18. – 25. Tag	6 – 12
Rh	Rh	18. – 25. Tag	3
Pb	Pb	18. – 25. Tag	10 – 11
Cd	Cd	18. – 25. Tag	91 – 173
KatE	Pt	42. - 49. Tag	0,009 – 0,010 ¹
	Pd		1,8 – 2,3
	Rh		0,005 – 0,009
KatD	Pt	42. - 49. Tag	0,57 – 0,67 ¹
	Pd		0,55 – 0,61
	Rh		0,14 – 0,16

¹: Grobe Abschätzung durch Interpolation der Pt-Gehalte der 1. und 10. Expositionswoche

In beiden Experimenten zeigte Rh die niedrigste Schwellenwertkonzentration von den untersuchten Metallen. Bei der Exposition mit Einzelementlösungen folgte anschließend Pd und Pb und dann Pt. Den höchsten Schwellenwert besaß Cd, der etwa 30fach höher war verglichen mit Rh. Die Verhältnisse der Schwellenwerte aus den Ansätzen mit Katalysatormaterialien spiegeln genau die Verhältnisse der Metallgehalte in den Materialien wider. So waren bei den Muscheln des KatD-Ansatzes die Schwellenwerte für Pt und Pd vergleichbar, der Schwellenwert für Rh jedoch deutlich niedriger, beim KatE-Ansatz übertraf hingegen Pd deutlich die beiden anderen Edelmetalle, die wiederum vergleichbare Schwellenwerte besaßen.

3.2.3 Metallothionein-Induktion

Der zeitliche Verlauf der relativen MT-Konzentrationen im Muschelweichgewebe des Expositionsversuches mit Einzelementlösungen ist in Abb. 7 dargestellt. Bei der Kontrolle wie auch der Rh- bzw. Pb-Gruppe war über den gesamten Versuchszeitraum keine MT-Induktion zu beobachten. Im Gegensatz dazu stieg die relative MT-Konzentration bei den Muscheln, die mit Pt, Pd bzw. Cd exponiert waren, klar an. Der Anstieg der relativen MT-Konzentration erfolgte bei der Exposition mit Cd deutlich später, aber stärker verglichen mit Pt und Pd. Nach 10wöchiger Exposition lagen in den Muscheln der Cd-, Pd- bzw. Pt-Gruppe 141-, 37- bzw. 27-fach höhere MT-Werte vor verglichen mit dem Ausgangswert vor Beginn der Exposition.

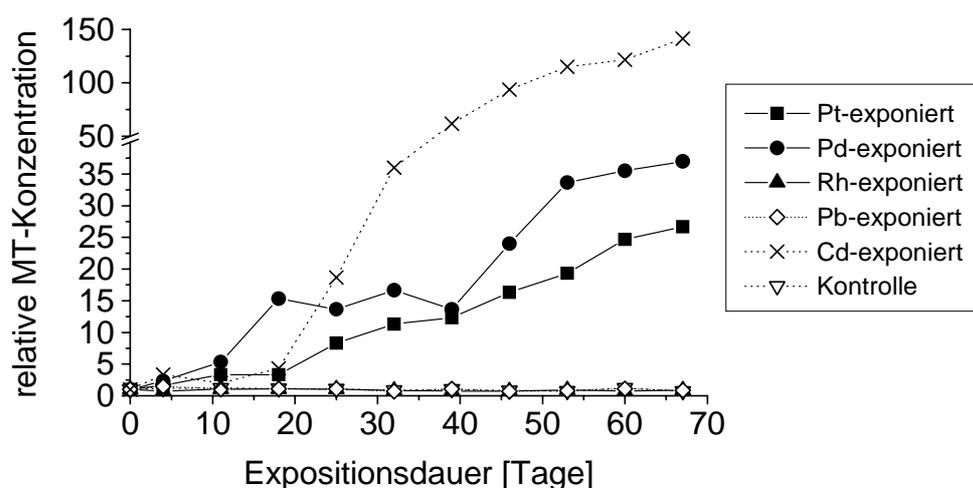
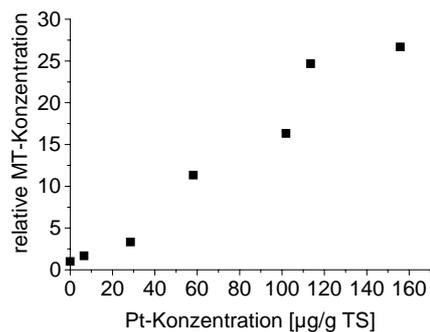


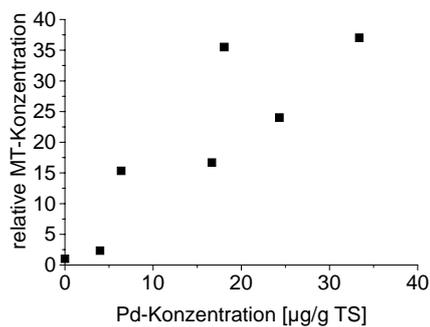
Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der relativen MT-Konzentration (bezogen auf den Ausgangswert vor der Exposition) im Weichgewebe der Dreikantmuschel während 10wöchiger Exposition mit Einzelementlösungen

In Abb. 8 sind die relativen MT-Konzentrationen über den Metallgehalten im Weichgewebe der mit Pt, Pd bzw. Cd exponierten Muscheln aufgetragen. Rangkorrelationsanalysen nach Spearman zeigten bei allen drei Metallen einen hoch signifikanten ($p < 0,001$) Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern. Die einfache Regressionsanalyse ergab für einen linearen Zusammenhang einen Regressionskoeffizienten von 0,979 für Pt, 0,881 für Pd und 0,884 für Cd.

a)



b)



c)

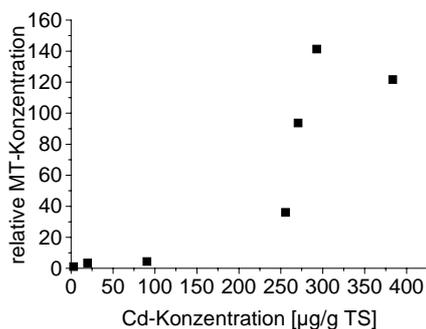


Abb. 8 Korrelation der relativen MT-Konzentration mit dem Metallgehalt im Weichgewebe der mit Pt (a), Pd (b) bzw. Cd (c) exponierten Muscheln

4 Diskussion

4.1 Zytotoxizität

In der Anfangsphase des vorliegenden Projektes wurden Zelltests mit Metallstandard-Lösungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die säurehaltigen Einzelementlösungen als Metallquelle für Zytotoxizitätstests nicht geeignet sind, da das Solvent selbst die Zellvitalität wahrscheinlich über die Veränderung des pH-Wertes im Zellmedium zu stark beeinflusst. Bei der Muschelexposition kann ein Nebeneffekt durch die Säure der Einzelementlösungen hingegen ausgeschlossen werden, da im Hälterungswasser aufgrund der Pufferkapazität des Wassers keine pH-Änderung durch den Metallzusatz zu beobachten war. Auch bei den Zelltests könnte eine Abpufferung der Säure eventuell hilfreich sein. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass sich durch die pH-Verschiebung die Löslichkeit der Metalle wesentlich verschlechtern kann.

Aufgrund dieser Probleme wurden für die Zelltests Metallsalze eingesetzt, die in Zellkulturmedium gelöst wurden. Beim Ansetzen der Metall-Stammlösungen stellte sich jedoch heraus, dass sich die Metalle teilweise nur zu einem Bruchteil in den Zellkulturmedien lösten. Dabei variierte die Löslichkeit der Metallsalze in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Kulturmediums. So lösten sich im Kulturmedium der BEAS-2B Zellen bezogen auf die Metallkationen-Konzentration $\text{Pt}(\text{NO}_3)_2$ nur zu 56 %, PtCl_4 zu 45 %, $\text{PdSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ zu 72 %, $\text{RhCl}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ zu 39 % und CdCl_2 zu 36 %. Daher war es notwendig, die verwendeten Stammlösungen vor den Zelltests auf die tatsächlich im Medium gelösten Metallgehalte hin zu untersuchen.

4.1.1 Vitalität

Die Ergebnisse der Vitalitätstests mit Lungenepithelzellen ergaben, dass die Zytotoxizität von Pt(II), Pt(IV), Pd(II) und Rh(III) im Bereich derer von Cr(VI) und Ni(II) liegt. Innerhalb der PGE zeigte Rh(III) den geringsten letalen Effekt, gefolgt von Pd(II) und Pt(II) und dann Pt(IV). Für PdSO_4 wurde eine LC_{50} von 0,4 mmol/l ermittelt. Vergleichbare Werte sind auch im WHO-Bericht für Palladium (WHO, 2002) zu finden, der in Abhängigkeit von der Zelllinie für PdCl_2 eine LC_{50} angibt, die zwischen 0,1 und 0,4 mmol/l schwankt. Bei Ratten liegt die LD_{50} für PdCl_2 in Abhängigkeit vom Applikationsweg bei 5 mg/kg (intravenös), 6 mg/kg (intratracheal), 70 mg/kg (intraperitoneal) bzw. 200 mg/kg (oral) (MOORE et al., 1975). Im Vergleich dazu ergaben erste Untersuchungen an Ratten zur akuten Toxizität von intravenös verabreichtem PtCl_4 eine LD_{50} , die zwischen 26 mg/kg (40 % Mortalität) und 31 mg/kg (90 % Mortalität) lag (MOORE et al., 1975). Für oral appliziertes PtCl_4 bzw. $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ wird in

Sicherheitsdatenblättern (Merck, Darmstadt) eine LD₅₀(Ratte) von 276 mg/kg bzw. 753 mg/kg angegeben.

4.1.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Im ROS-Test konnte erstmals eine erhöhte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Zellen, die mit Pt(II) bzw. Pt(IV) exponiert waren, nachgewiesen werden. Dabei war die maximale relative ROS-Konzentration bei der Exposition mit Pt(IV) etwa zweifach höher als bei der Exposition mit Cr(VI). Pt(II) führte hingegen zu einer zweifach niedrigeren ROS-Bildung verglichen mit Cr(VI). Eine Induktion von oxidativen Stress durch Cr(VI) wurde bereits in der Literatur beschrieben (ERCAL et al., 2001; BAGCHI et al., 2002); daneben führen auch Ni(II), Co(II) und Fe(II) zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen (HARRIS & SHI, 2003). Zellen, die unter oxidativem Stress stehen, zeigen verschiedene Dysfunktionen, die auf die Reaktion von ROS mit Lipiden, Proteinen und DNA zurückzuführen sind (ERCAL et al., 2001). Daher wird angenommen, dass der durch Metalle induzierte oxidative Stress zumindest teilweise für die toxischen Effekte der Metalle verantwortlich ist (ERCAL et al., 2001). Auch für Pt(II) und Pt(IV) könnte somit ein solcher Mechanismus vorliegen. Im Gegensatz zu den beiden Pt-Spezies zeigten Pd(II) und Rh(III) keinen Effekt auf die ROS-Bildung.

Bei Pt(II), Pt(IV), Pd(II), Rh(III) und Cr(VI) war ab einer bestimmten Expositionskonzentration ein Abfall der relativen ROS-Konzentration zu beobachten. Bei Cd(II) und Ni(II) trat in dem untersuchten Konzentrationsbereich bis 2 mmol/l dieser Effekt nicht auf. Die Abnahme der ROS-Konzentration kann dadurch erklärt werden, dass ab einer bestimmten Effektkonzentration Zellschäden auftraten, die zu einer verringerten ROS-Bildung führten. Diese Effektkonzentration schwankte in Abhängigkeit von der Metall-Spezies zwischen 0,02 und 0,3 mmol/l und nahm in der Reihenfolge Rh(III) < Pd(II) < Pt(II) < Cr(VI) < Pt(IV) zu. Diese Reihenfolge unterscheidet sich deutlich von der Reihenfolge wie sie anhand des Vitalitätstests für die LC₅₀ ermittelt wurde. Während beim MTT-Test die LC₅₀ der PGE mit Ausnahme von Rh(II) im Bereich zwischen Ni(II) und Cr(VI) zu finden ist, übertreffen bei den Effektkonzentrationen aus dem ROS-Test die PGE mit Ausnahme von Pt(IV) sogar das Cr(VI).

Die Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse beider Tests könnte zum einen in der unterschiedlichen Expositionsdauer liegen, die beim MTT-Test 24h und beim ROS-Test nur 2h betrug. Zum anderen basieren die beiden Tests auf unterschiedlichen Nachweismechanismen. Dem MTT-Test liegt zugrunde, dass das Tetrazoliumsalz MTT nur von lebenden Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien enzymatisch zu blauviolettten Formazan-Kristallen reduziert wird. Damit stellt die Aktivität eines mitochondrialen Enzyms das Maß für die Zellvitalität dar. Beim ROS-Test wird hingegen die Konzentration eines Fluoreszenzfarbstoffs gemessen, der durch ROS oxidiert und damit aktiviert wird. Der bei einigen Metallen auftretende plötzliche Abfall der relativen ROS-Konzentration mit zunehmender Expositionskonzentration

kann dadurch erklärt werden, dass die bei der normalen mitochondrialen Aktivität entstehenden oxidativen Spezies nicht mehr in dem Maße gebildet werden können, weil die Metalle den Grundumsatz der Zelle reduzieren. Die Reduktion des Grundumsatzes wirkt sich wiederum auf die Zellvitalität aus. Somit kann der Abfall der ROS-Konzentration als Abnahme der Zellvitalität interpretiert werden.

4.2. Organismische Toxizität

Für die Untersuchung der organismischen Toxizität der PGE wurde die Dreikantmuschel (*Dreissena polymorpha*) ausgewählt, da diese Muschel weltweit als Testorganismus in Laborstudien und auch als Bioindikator in Freilanduntersuchungen eingesetzt wird. Dabei eignet sie sich sowohl als Effektkindikator als auch als Akkumulationsindikator für zahlreiche Schadstoffe.

4.2.1 Metallanreicherung

In den Dreikantmuscheln wurde die Aufnahme von Pt, Pd und Rh nach Exposition mit Einzelelementlösungen und auch mit Katalysatormaterialien nachgewiesen. Erwartungsgemäß nahmen hingegen die PGE-Gehalte in den Muscheln, die mit Katalysatorträgermaterial (ohne PGE) exponiert waren, in der 10. Woche nicht gegenüber der 1. Woche zu. Mit Ausnahme der Pt-Gehalte in den mit Klärschlamm exponierten Muscheln war auch bei den mit Versickerbeckensediment bzw. Klärschlamm exponierten Muscheln keine Zunahme der PGE-Gehalte zwischen der 1. und 10. Woche festzustellen. Im Gegensatz dazu nahmen in einem Langzeit-Expositionsversuch über 26 Wochen mit Straßentaub, dessen PGE-Gehalte in einem vergleichbaren Bereich lagen, die Dreikantmuscheln deutlich Pt, Pd und Rh auf (ZIMMERMANN et al., 2002). Die fehlende Metallanreicherung in der Sed- bzw. KS-Gruppe könnte dadurch erklärt werden, dass relativ leicht lösliche und damit biologisch verfügbare PGE-Spezies im Sediment bzw. Klärschlamm schon vor der Probenahme ausgeschwemmt wurden (FLIEGEL et al., 2004).

Beim Expositionsversuch mit Einzelelementlösungen variierte die Metallanreicherung im Weichgewebe von *D. polymorpha* von Metall zu Metall. Nach 10wöchiger Exposition lagen - bezogen auf die eingesetzte Expositionskonzentration im Hälterungswasser von 500 µg/L - je nach Metall 37- bis 579fach höhere Metallgehalte im gefriergetrockneten Muschelweichgewebe vor. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die tatsächlich im Hälterungswasser vorliegende Metallkonzentration wesentlich niedriger ist als die eingesetzte Expositionskonzentration und in Abhängigkeit vom Metall erheblich variiert (SINGER et al., 2005). Außerdem hatten Pd und Rh im Gegensatz zu Cd, Pt und Pb in der 10. Expositionswoche noch nicht das

Akkumulationsplateau erreicht, was die relativ niedrigen Gehalte an Pd und Rh in den Muscheln erklären könnte. Aus diesen Gründen sind in der vorliegenden Arbeit Metallaufnahmeleistungen besser zum Vergleich der Bioakkumulation der verschiedenen Metalle geeignet als Anreicherungsfaktoren, die sich auf die Metallkonzentrationen im Hälterungswasser beziehen. Die Aufnahmeleistungen der verschiedenen Metalle nahmen in der Reihenfolge Cd > Pt > Pb > Pd > Rh ab. Die höchste Aufnahmeleistung lag mit 7,7 µg/g/d für Cd vor. Eine vergleichbare Rate erhielt EVERAARTS (1990), der *Mytilus edulis* für 40 Tage in Wasser mit einer Cd-Konzentration von 50 µg/l exponierte und dabei eine tägliche Cd-Aufnahmeleistung von 7,18 µg/g in der Niere, 4,17 µg/g im Hepatopankreas, 3,44 µg/g in den Kiemen, 2,79 µg/g im Fuß, 0,82 µg/g in den Adduktoren und 0,69 µg/g im Mantel fand. In der vorliegenden Arbeit war die Aufnahmeleistung von Pt nur 4fach geringer verglichen mit Cd, aber 4 bzw. 8,5fach höher als die Aufnahmeleistung von Pd bzw. Rh.

Auch bei der Exposition mit Katalysatormaterialien unterschieden sich die Aufnahmeleistungen der drei PGE, wobei die Aufnahmeleistungen von Pt bzw. Pd vom Katalysatormaterial abhängen und die PGE-Verhältnisse der Metallquelle widerspiegeln. Bei beiden Katalysatormaterialien zeigte Pd die höchste Aufnahmeleistung innerhalb der PGE. Bei der Betrachtung der Anreicherungsfaktoren zeigten hingegen alle drei PGE vergleichbare Werte. Entsprechende Ergebnisse fanden auch MOLDOVAN et al. (2001) und ZIMMERMANN et al. (2005) für Wasserasseln bzw. Dreikantmuscheln, die mit Katalysatormaterial exponiert waren. Dies deutet auf eine Aufnahme der PGE in partikulärer Form hin. Im Gegensatz dazu nahm die Bioakkumulation der PGE in Expositionsversuchen mit Straßen- bzw. Tunnelstäuben oder Gewässersedimenten in der Reihenfolge Pd > Pt > Rh ab (MOLDOVAN et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 2002), was dadurch erklärt werden kann, dass die verschiedenen PGE unterschiedlichen Transformationsprozesse in der Umwelt unterliegen (MOLDOVAN et al., 1999; JARVIS et al., 2001; EK et al., 2004a).

4.2.2 Induktion von Hitzeschockproteinen

Sowohl bei der Exposition mit Einzelelementlösungen als auch mit partikulären Metallquellen erfolgte neben der Metallanreicherung eine erhöhte Produktion von Hitzeschockproteinen in den Dreikantmuscheln. Diese Stressproteine werden häufig als Biomarker für subletale Konzentrationen verschiedenster Umweltchemikalien oder aber für erhöhte Umgebungstemperaturen eingesetzt (SANDERS, 1993; LEWIS et al., 1999; KÖHLER et al., 2001). Während für verschiedene Metallspezies wie z.B. Cd²⁺ und Pb²⁺ bekannt ist, dass sie die Produktion von HSP in verschiedenen Organismen induzieren (SANDERS, 1993), lagen diesbezüglich bisher keine Kenntnisse für die PGE vor. In der vorliegenden Arbeit konnte nun im Expositionsversuch mit Einzelelementlösungen gezeigt werden, dass alle drei PGE stärkere Inducer sind als die beiden Vergleichsmetalle Cd und Pb. Innerhalb der PGE zeigte Pd den

stärksten Effekt auf die HSP70-Induktion, obwohl Pd deutlich schwächer von den Muscheln angereichert wurde als Pt.

Bei der Exposition mit partikulärem Material war das Ausmaß der HSP70-Induktion bei allen Metallquellen mit Ausnahme des KatE-Materials vergleichbar. Obwohl beim KatE-Ansatz die maximale HSP70-Konzentration etwas niedriger war, hob sie sich wie bei den anderen Ansätzen deutlich vom Kontrollansatz mit Katalysatorträgermaterial (ohne PGE) ab. Daher ist die Anwesenheit der Partikel alleine nicht ausschlaggebend für die erhöhte HSP-Konzentration, sondern es bedarf zusätzlich der Präsenz der Metalle. Die Diskrepanz zwischen dem KatE-Ansatz und den anderen Versuchsgruppen (KatD-, Sed-, bzw. KS-Ansatz) könnte auf die unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Metalle in den verschiedenen Ansätzen zurückzuführen sein.

Obwohl im Sed- bzw. KS-Ansatz deutlich geringere PGE-Gehalte vorlagen als im KatD-Ansatz, zeigten alle drei Ansätze einen vergleichbaren Verlauf der HSP-Konzentration. Dies könnte auf die Begleitstoffe im Sediment bzw. Klärschlamm zurückzuführen sein. In zahlreichen Studien wurde für Stoffe wie z.B. As, Cd, Cr, Cu, Pb Zn, polychlorierte Biphenyle (PCBs) und polyaromatische Kohlenstoffe (PAKs) ein Potential zur HSP-Induktion nachgewiesen (DYER et al., 1993; KRAAK et al., 1994; WERNER et al., 1998; SCHRÖDER et al., 1999; CLAYTON et al., 2000). Da in der vorliegenden Arbeit die Muscheln u.a. As, Cd, Co, Cr, Sb, Sn und Zn aus dem Versickerbeckensediment bzw. Klärschlamm aufnahmen, liegt der Schluss nahe, dass die Begleitstoffe zumindest zum Teil zur HSP-Induktion beitragen.

Auch der Zeitpunkt, ab dem die HSP70-Induktion einsetzt, ist abhängig vom Stressor (RADLOWSKA & PEMPKOWIAK, 2002; SANDERS, 1993; LEWIS et al., 1999). Bei der Exposition mit Einzelelementlösungen lag kein wesentlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen vor. Nur bei der Exposition mit Pt-Lösung erfolgte der Anstieg verglichen mit den anderen Gruppen etwas später. Auch bei dem Experiment mit partikulären Metallquellen traten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im Startpunkt der HSP-Induktion auf. Vergleicht man jedoch die beiden Experimente miteinander, so führten die Partikel-gebundenen Metalle zu einem deutlich späteren HSP70-Anstieg in den Muscheln als die löslichen Metalle. Dies kann dadurch erklärt werden, dass partikuläre Metalle in der Regel langsamer aufgenommen werden als lösliche (vgl. BOISSON et al., 1998; WOOD et al., 2002).

Der Zeitpunkt des HSP70-Anstieges hängt vom Überschreiten einer Schwellenwertkonzentration des Stressors für die HSP-Induktion im Muschelweichgewebe ab. Dieser Schwellenwert wurde anhand des Startzeitpunktes des HSP70-Anstieges abgeschätzt. Bei der Einzelelement-Exposition mit Einzelelementlösungen lag für Rh (3 µg/g) der niedrigste Schwellenwert vor, gefolgt von Pd (6-12 µg/g) und Pb (10-11 µg/g). Im Vergleich dazu fanden CLAYTON et al. (2000) bei *D. polymorpha* für Cu eine Induktionsschwelle von 29 µg/g. Deutlich höhere Schwellenwerte wurden in der vorliegenden Arbeit für Pt (43-58 µg/g) und Cd (91-173 µg/g)

ermittelt. Folglich scheinen vor allem Rh und Pd ernstzunehmende Stressoren für die HSP70-Induktion zu sein. Im Vergleich zur Exposition mit Einzelelementlösungen waren bei der Exposition mit Katalysatormaterial die Schwellenwerte um eine bis mehrere Größenordnungen niedriger. Da bei der Exposition mit partikulärem Material gleichzeitig alle drei PGE auf die Muscheln wirkten, lag hier sehr wahrscheinlich ein Summeneffekt auf die HSP-Induktion vor.

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete zeitliche Verlauf der HSP70-Konzentration wurde auch für andere Schwermetalle (ECKWERT et al., 1997), für Paracetamol (NEUHAUS-STEINMETZ & RENSING, 1997), für Sodiumdodecylsulfat (SDS) (VIJAYAN et al., 1998) und für Oxyfluorfen (HASSANEIN et al., 1999) beschrieben. Teilt man den zeitlichen Verlauf der HSP70-Induktion der verschiedenen Expositionsansätze ein, dann ergeben sich drei Phasen. Die erste Phase stellt den Bereich der zellulären Homöostase dar. Der Gehalt an zellulärem HSP70 ist ausreichend, um die durch geringe Konzentrationen an Schadstoffe auftretende Toxizität zu kompensieren. Es ist nur eine kleine Stressreaktion zu beobachten. In der zweiten Phase wird aufgrund der Stressantwort der HSP70-Gehalt in der Zelle drastisch erhöht und erreicht am Ende der Phase ein Maximum. Ein weiterer Anstieg des Schadstoffgehaltes im Organismus führt zu einer schwerwiegenden Schädigung des zellulären Proteinbiosynthese-Apparates bis hin zu zytotoxischen Schäden und somit zu einer Abnahme der HSP70-Induktion in der dritten Phase. PAWERT et al. (1996) und TRIESKORN & KÖHLER (1996) konnten nachweisen, dass bei höheren Metall-Expositionsdosen der Abbau von HSP70 gegenüber der Neusynthese aufgrund pathologischer Schäden zunimmt und es dadurch zu abnehmenden HSP70-Konzentrationen kommt, da für die HSP70-Synthese ein funktionierender Zellmetabolismus unbedingt notwendig ist (MEYER et al., 1995). Zusätzlich können durch Schadstoffe verursachte Membranschäden sogar zur Verringerung des HSP70-Grundgehaltes führen (KÖHLER et al., 1996).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass sich die PGE bezüglich des Verlaufs der HSP-Induktion wie andere bekannte Stressoren verhalten. Die PGE führen jedoch verglichen mit anderen Metallen wie Cd bzw. Pb zu einer stärkeren Induktion. Innerhalb der PGE stellt sich Pd als bedeutendster Stressor heraus, da dieses Metall die stärkste Stressantwort hervorruft und gleichzeitig neben Rh einen relativ niedrigen Schwellenwert für die HSP-Induktion besitzt. Da nicht nur lösliche Metalle sondern auch Partikel gebundene PGE, wie sie in der Umwelt vorkommen, zur verstärkten Bildung von Hitzeschockproteinen in den Muscheln führen, stellt die HSP70-Induktion einen möglichen Biomarker für Kfz-bürtige PGE dar. Die HSP-Induktion ist als Antwort auf Umweltstress im Tierreich weit verbreitet. Daher dürften die für die Dreikantmuscheln erzielten Ergebnisse auch auf andere Organismen übertragbar sein.

4.2.3 Metallothionein-Induktion

Neben der Stressproteinantwort wurde bei der Exposition mit Einzelelementlösungen auch die MT-Induktion in den Muscheln untersucht. Bei der MT-Bestimmung in Gewebeproben aus Expositionsversuchen mit Platinmetallen mittels der Silbersättigungsmethode nach SCHEUHAMMER & CHERIAN (1985) sind jedoch einige wichtige Punkte zu beachten. Die Methode beruht darauf, dass die an MT gebundenen Metalle vollständig durch Ag verdrängt werden. Die Affinität von Pt zu MT ist aber sehr hoch, etwa 10^7 bzw. 30 mal stärker verglichen mit Zn bzw. Cd (ZHANG et al., 1997). Auch von Pd und Rh ist bekannt, dass sie an MT binden (NIELSON et al., 1985). Da in Vorversuchen Zweifel an der vollständigen Verdrängung der an MT gebundenen Metalle durch Ag aufkamen, wurden neben dem Ag-Gehalt auch die Konzentration des Metalls, mit dem die entsprechende Gruppe exponiert war, gemessen. In der Rh- bzw. Pb-exponierten Gruppe waren keine erhöhten Ag- und Rh- bzw. Pb-Gehalte zu finden, so dass hier tatsächlich keine MT-Induktion stattfand. In der Pt- bzw. Pd-exponierten Gruppe lag hingegen kein erhöhter Ag-Gehalt jedoch eine eindeutige Zunahme der Pt- bzw. Pd-Gehalte in den aufbereiteten Weichgewebeeextrakten vor, was durch eine gegenüber Ag stärkere Bindung der beiden Metalle an MT zu erklären ist. Diese Theorie wird durch *in vitro* Bindungsstudien von NIELSON et al. (1985) bestätigt, in denen Pt(IV) bzw. Pd(II) das an MT gebundene Silber zu 91% bzw. 92% vertrieb, Cd hingegen nur zu 11% und Rh und Pb keinen Einfluss auf die Bindung des Ag an MT zeigten.

Die Ergebnisse der MT-Bestimmung der vorliegenden Arbeit zeigten während der 10wöchigen Exposition mit Pt bzw. Pd einen kontinuierlichen Anstieg der MT-Konzentration im Muschelweichgewebe. Dabei war die MT-Induktion in der Pd-exponierten Gruppe höher als in der Pt-exponierten Gruppe. Im Gegensatz dazu führte Rh zu keiner gegenüber der Kontrolle erhöhten MT-Bildung. Im Vergleich zu Pt und Pd zeigte Cd einen noch stärkeren Effekt, während Pb keine Wirkung auf die MT-Induktion erzielte. Diese Ergebnisse stimmen mit den für Cd und Pb vorhandenen Literaturdaten überein. Cd gehört zu den stärksten Inducern der MT-Expression (HIGH et al., 1996), während Pb dafür bekannt ist, dass es keine MT-Bildung induziert (MERIAN, 1991). Bezüglich der PGE (ausgenommen Pt-haltige Zytostatika für die Krebstherapie) liegen bislang nur sehr wenige Kenntnisse zur MT-Induktion vor. In Expositionsversuchen mit Pt(IV)- bzw. Pd(IV)-Verbindungen konnte in der Leber und Niere von Kaninchen eine erhöhte MT-Synthese nachgewiesen werden (ZHONG et al., 1997; ZHANG et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein hoch signifikanter, linearer Zusammenhang zwischen der MT-Konzentration und der Metall-Konzentration im Weichgewebe der mit Pt, Pd bzw. Cd exponierten Muscheln. Auch LECOEUR et al. (2004) wiesen in Dreikantmuscheln, die mit Cd exponiert waren, einen solch starken Zusammenhang nach.

Aufgrund dieser engen Korrelation zwischen dem Metall- und MT-Gehalt wird der Einsatz von MT als Biomarker für Schwermetalle wie z.B. Cd und Hg propagiert (z.B. HUANG et al., 2004; LECOEUR et al., 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass das Metallspektrum für den Einsatz von MT als Biomarker nun um die Edelmetalle Pt und Pd erweitert werden kann.

5 Schlussfolgerung

Da über die toxische Wirkung der PGE nur sehr wenig bekannt ist, trug das vorliegende, zweijährige Projekt wesentlich dazu bei, geeignete Parameter zu finden, anhand derer die biologischen Effekte der PGE auch im Vergleich zu anderen Metallen auf zellulärer und organismischer Ebene beurteilt werden können. Es zeigte sich, dass die HSP-Induktion als Biomarker für Pt, Pd und Rh sehr gut geeignet ist. Die Metallothionein-Bildung wird hingegen nur von Pt und Pd, jedoch nicht von Rh induziert. Da jedoch Pt und Pd in wesentlich stärkerem Maße im Autokatalysator eingesetzt werden als Rh, stellt auch die MT-Induktion ein vielversprechender Marker für kfz-bürtige PGE dar. Hitzeschockproteine und Metallothioneine sind in der Natur weit verbreitet, so dass diese Biomarker nicht nur in Dreikantmuscheln sondern auch in vielen anderen Testorganismen anwendbar sein dürften.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich schließen, dass von den drei Kfz-emittierten Platinmetallen vor allem Pd von (öko-)toxikologischem Interesse sein dürfte. Dafür sprechen im Wesentlichen zwei Gründe:

1. Partikel gebundenes Pd, also in der Form, wie es mit dem Autoabgas emittiert wird, zeigt im Allgemeinen eine höhere biologische Verfügbarkeit als Pt und Rh. Obwohl bislang noch in den meisten Fällen die Pt-Konzentrationen in verschiedenen Umweltkompartimenten diejenigen von Pd übertreffen, wird Pd gerade in den letzten Jahren verstärkt in der Autoabgaskatalysatoren-Herstellung eingesetzt, so dass zukünftig vor allem mit einem Anstieg der Pd-Kontaminationen zu rechnen ist.
2. Auch wenn im Zelltest für Pd im Gegensatz zu Pt keine ROS-Induktion nachzuweisen war und bezüglich der LC_{50} Pd hinter oder auf gleicher Stufe wie Pt stand, liegt die LC_{50} von Pd immerhin im Bereich bekannter toxischer Metalle wie Cr und Ni. Bei der organismischen Toxizität erwies sich Pd als bedeutendster Stressor für die HSP-Induktion, da Pd nicht nur die stärkste Stressantwort hervorrief, sondern auch neben Rh einen relativ niedrigen Schwellenwert für die HSP-Induktion besaß. Auch bei der MT-Induktion zeigte Pd einen stärkeren Effekt als Pt.

Die erzielten Ergebnisse sind von grundlegender Bedeutung für weitere Untersuchungen zur Toxizität der Platinmetalle. Eine zuverlässige Abschätzung des Risikopotentials Kfz-bürtiger Platinmetalle ist derzeit aufgrund der mangelnden Datenlage noch nicht möglich. Freilanduntersuchungen zur aktuellen PGE-Kontamination im Tierreich liegen bislang so gut wie nicht vor (vgl. HOPPSTOCK & SURES, 2004; ZIMMERMANN & SURES, 2004). In einer schwedischen Studie wurde im Blut von Greifvögeln etwa 3 ng/g Pt, 1 ng/g Pd und 0,6 ng/g Rh nachgewiesen (EK et al., 2004b). MOLDOVAN et al. (2001) analysierten in Wasserasseln aus dem Stadtgebiet von Göteborg bis zu 119 ng/g Pt, 284 ng/g Pd und 48 ng/g Rh. In der vorliegenden Arbeit wurden Schwellenwertkonzentrationen im Muschelweichgewebe für die HSP-Induktion abgeschätzt, die im Bereich dieser Freilanddaten liegen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in der Natur vorkommenden, zukünftig noch ansteigenden PGE-Konzentrationen adverse Effekte auf die Biosphäre besitzen. Von akuten Schädigungen ist jedoch eher nicht auszugehen.

6 Literatur

- BAGCHI, D., STOHS, S.J., DOWNS, B.W., BAGCHI, M., PREUSS, H.G. (2002) Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* **180**, 5-22.
- BOISSON F, BELL J U, RICHARDSON D E (1998) Platinum(II) binding to metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* **34**, 55-62
- CLAYTON, M.E., STEINMANN, R., FENT, K. (2000) Different expression patterns of heat shock proteins HSP 60 and HSP 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquat. Toxicol* **47**, 213-226.
- DYER, S.D., DICKSON, K.L., ZIMMERMANN, E.G. (1993) A laboratory evaluation of the use of stress proteins in fish to detect changes in water quality. In: LANDIS, W.G., HUGHES, J.S., LEWIS, M.A. (eds.) *Environmental Toxicology and Risk Assessment*. Amer. Soc. Test. Mat., Philadelphia, PA. pp. 247-261
- ECKWERT, H., ALBERTI, G., KÖHLER, H.R. (1997) The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology* **6**, 249-262
- EK, K.H., MORRISON, G.M., RAUCH, S. (2004a) Environmental routes for platinum group elements to biological materials – a review. *Sci. Total Environ.* **334-335**, 21-38
- EK, K.H., RAUCH, S., MORRISON, G.M., LINDBERG, P. (2004b) Platinum group elements in raptor eggs, faeces, blood, liver and kidney. *Sci. Total Environ.* **334-335**, 149-159

- ERCAL, N., GURER-ORHAN, H., AYKIN-BURNS, N. (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**, 529-39.
- EVERAARTS, J.M. (1990) Uptake and release of cadmium in various organs of the common mussel, *Mytilus edulis* (L.) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **45**, 560-567
- FENT, K. (2003) Ökotoxikologie: Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- FLIEGEL, D., BERNER, Z., ECKHARDT, D., STÜBEN, D. (2004) New data on the mobility of Pt emitted from catalytic converters. *Anal. Bioanal. Chem.* **379**, 131-136
- HARRIS, G.K., SHI, X. (2003) Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutat. Res.* **533**, 183-200.
- HASSANEIN, H., BANHAWY, M., SOLIMAN, F., ABDEL-REHIM, S., MÜLLER, W., SCHRÖDER, H. (1999) Induction of Hsp70 by the herbicide oxyfluoren (Goal) in the Egyptian Nile Fish, *Oreochromis niloticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **37**, 78-84
- HIGH, K.A., BARTHET, V.J., MCLAREN, J.W., BLAIST, J.S. (1996) Characterization of Metallothionein-like Proteins from Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1111-1118.
- HOPPSTOCK, K., SURES, B. (2004) Platinum-Group Metals. In: MERIAN, E., ANKE, M., IHNAT, M., STOEPPLER, M. (eds.) Elements and their compounds in the environment. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 1047-1086
- HUANG, Z.Y., SHEN, J.C., ZHUANG, Z.X., WANG, X.R., LEE, F.S.C. (2004) Metallothionein as a biomarker for mercury in tissues of rat fed rally with cinnabar. *Appl. Organometal. Chem.* **18**, 255-261
- JARVIS, K., PARRY, S.J., PIPER, J.M. (2001) Temporal and spatial studies of autocatalyst-derived platinum, rhodium, and palladium and selected vehicle-derived trace elements in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 1031-1036
- KÖHLER, H.R., RAHMAN, B., GRÄFF, S., BERKUS, M., TRIEBSKORN, R. (1996) Expression of the stress-70 protein family (hsp70) due to heavy metal contamination in the slug, *Deroceras reticulatum*: an approach to monitor sublethal stress conditions. *Chemosphere* **33**, 1327-1340
- KÖHLER, H.R., BARTUSSEK, C., ECKWERT, H., FARIAN, K., GRÄNZER, S., KNIGGE, T., KUNZ, N. (2001) The hepatic stress protein (hsp 70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. *J. Aquat. Ecosys. Stress Recov.* **8**, 261-279

- KRAAK, M.H.S., WINK, Y.A., STUIJFZAND, S.C., BUCKERT-DE JONG, M.C., DE GROOT, C.J., ADMIRAAL, W. (1994) Chronic ecotoxicity of Zn and Pb to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* **30**, 77-89
- LECOEUR, S., VIDEMANN, B., BERNY, P. (2004) Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environ. Res.* **94**, 184-191
- LEWIS, S., HANDY, D., CORDI, B., BILLINGHURST, Z., DEPLEDGE, M.H. (1999) Stress proteins (HSP's) methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* **8**, 351-368
- MERIAN E. (1991) Metals and their compounds in the environment : occurrence, analysis and biological relevance. VCH-Verlag, Weinheim.
- MEYER, U., SCHWEIM, P., FRACELLA, F., RENSING, L. (1995) Close correlation between heat shock response and cytotoxicity in *Neurospora crassa* treated with aliphatic; alcohols and phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 979-984
- MOLDOVAN, M., GÓMEZ, M.M., PALACIOS, M.A. (1999) Determination of platinum, rhodium and palladium in car exhaust fumes. *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1163-1169
- MOLDOVAN, M., RAUCH, S., GÓMEZ, M.M., PALACIOS, M.A., MORRISON, G.M. (2001) Bioaccumulation of palladium, platinum and rhodium from urban particulates and sediments by the freshwater isopod *Asellus aquaticus*. *Water Res.* **35**, 4175-4183
- MOORE, W., HYSELL, D., HALL, L., CAMPELL, K., STARA, J. (1975) Preliminary studies on the toxicity and metabolism of palladium and platinum. *Environ Health Persp* **10**, 63-71
- NEUHAUS-STEINMETZ, U., RENSING, L. (1997) Heat shock protein induction by certain chemical stressors is correlated with their cytotoxicity, lipophilicity and proteindenaturing capacity. *Toxicology* **123**, 185-195
- NIELSON, K.B., ATKIN, C.L., WINGE, D.R. (1985) Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.* **260**, 5342-5350.
- PALACIOS, M. A., GÓMEZ, M. M., MOLDOVAN, M., MORRISON, G., RAUCH, S., McLEOD, C., MA, R., LASERNA, J., LUCENA, P., CAROLI, S., ALIMONTI, A., PETRUCCI, F., BOCCA, B., SCHRAMMEL, P., LUSTIG, S., ZISCHKA, M., WASS, U., STENBOM, B., LUNA, M., SAENZ, J. C., SANTAMARÍA, J., TORRENS, J. M. (2000): Platinum-group elements: quantification in collected exhaust fumes and studies of catalyst surfaces. – *Sci. Total Environ.* **257**, 1 – 15.
- PAWERT, M., TRIEBSKORN, R., GRÄFF, S., BERKUS, M., SCHULZ, J., KÖHLER, H.R. (1996) Cellular alterations in collembolan midgut cells as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. *Sci. Tot. Environ.* **181**, 187-200

- RADLOWSKA, M., PEMPKOWIAK, J. (2002) Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel *Mytilus edulis*. Environment International **27**:605-608
- RAVINDRA K, BENCS L, VAN GRIEKEN R (2004) Platinum group elements in the environment and their health risk. Sci Total Environ **318**, 1-43.
- RODITI, H.A., FISHER, N.S. (1999): Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. – Limnol. Oceanogr. **44**, 1730-1749.
- SANDERS, B.M. (1993) Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. Crit. Rev. Toxicol. **23**, 49-75
- SCHEUHAMMER, A.M., CHERIAN, M.G. (1985) Quantification of metallothioneins by silver-saturation method. Toxicol. Appl. Pharmacol. **82**, 417-425.
- SCHRÖDER, H.C., BATEL, R., LAUENROTH, S., HASSANEIN, H.M.A., LACORN, M., SIMAT, T., STEINHART, H., MÜLLER, W.E.G. (1999) Induction of DNA damage and expression of heat shock protein HSP70 by polychlorinated biphenyls in the marine sponge *Suberites domuncula* Olivi. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **233**, 285-300
- SINGER, C., ZIMMERMANN, S., SURES, B. (2005) Induction of heat shock proteins (hsp70) in the Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): comparison with lead and cadmium exposures. Aquatic Toxicol. **75**, 65-75.
- SOM, A. (2004) Aufnahme und Wirkung Partikel-gebundener Metalle in Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) mit besonderer Berücksichtigung der Platingruppenelemente. Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe
- SURES, B. (2002) Charakterisierung aquatischer Wirt-Parasit-Interaktionen aus ökologischer und (öko-)toxikologischer Sicht. Habilitation, Universität Karlsruhe.
- SURES, B., TARASCHEWSKI, H., HAUG, C. (1995) Determination of trace metals (Cd, Pb) in fish by electrothermal atomic absorption spectrometry after microwave digestion. Anal. Chim. Acta **311**, 135-139
- TOKALOV S.V., GUTZEIT H.O. (2003) The heat shock-induced cell cycle arrest is attenuated by weak electromagnetic fields. Cell Prolif. **36**, 101-111.
- TRIEBSKORN, R., KÖHLER, H.R. (1996) The impact of heavy metals on the grey garden slug *Deroceras reticulatum* (Müller): metal storage, cellular effects and semi quantitative evaluation of metal toxicity. Environ. Pollut. **93**, 327-343
- VIJAYAN, M.M., PEREIRA, C., KRZYNSKI, G., IWAMA, G.K. (1998) Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. Aquat. Toxicol. **40**, 101-108

- WERNER, I., KLINE, K.F., HOLLIBAUGH, J.T. (1998) Stress protein expression in *Ampelisca abdita* (Amphipoda) exposed to sediments from San Francisco Bay. *Mar. Environ. Res.* **45**, 417-430
- WHO (2002) Environmental health criteria 226 – Palladium. World Health Organization, Geneva, Swiss.
- WOOD, C.M., GROSELL, M., HOGSTRAND, C., HANSEN, H. (2002) Kinetic of radio-labelled silver uptake and depuration in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European eel (*Anguilla anguilla*): the influence of silver speciation. *Aquat. Toxicol.* **56**, 197-213
- ZHANG, B.L., SUN, W.Y., TANG, W.X. (1997) Determination of the association constant of platinum(II) to metallothionein. *J. Inorg. Biochem.* **65**, 295-298.
- ZHANG, Q., ZHONG, W., XING, B., TANG, W., CHEN, Y. (1998) Binding properties and stoichiometries of a palladium(II) complex to metallothioneins *in vivo* and *in vitro*. *J. Inorg. Biochem.* **72**, 195-200.
- ZHONG, W., ZHANG, Q., YAN, Y., YUE, S., ZHANG, B., TANG, W. (1997) Interaction of sodium chloroplatinate and iproplatin with metallothionein *in vivo*. *J. Inorg. Biochem.* **66**, 159-164.
- ZIMMERMANN, S., SURES, B. (2004) Significance of platinum group metals emitted from automobile exhaust gas converters for the biosphere. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **11**, 194-199
- ZIMMERMANN, S., MESSERSCHMIDT, J., VON BOHLEN, A., SURES, B. (2003) Determination of Pt, Pd and Rh in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry as compared with adsorptive cathodic stripping voltammetry and total reflection X-ray fluorescence analysis. *Anal. Chim. Acta* **498**, 93 – 104.
- ZIMMERMANN, S., MESSERSCHMIDT, J., VON BOHLEN, A., SURES, B. (2005) Uptake and bioaccumulation of platinum group metals (Pd, Pt, Rh) from automobile catalyst converter materials by the Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) *Environ. Res.* **98**, 203-209.
- ZIMMERMANN, S., ALT, F., MESSERSCHMIDT, J., VON BOHLEN, A., TARASCHEWSKI, H., SURES, B. (2002): Bioavailability of traffic related platinum group elements (Pd, Pt, Rh) and 12 other heavy metals (Ag, As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb) for the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following experimental exposure to water containing road dust. - *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 2713-2718

PROJEKTSPEZIFISCHE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fachzeitschriften:

1. Zimmermann, S., Sures, B. (2004) Significance of platinum group metals from automobile exhaust gas converters for the biosphere. *Environmental Science and Pollution Research* 11:194-199, <http://dx.doi.org/10.1065/espr2004.03.193>
2. Sures, B., Zimmermann, S. (2004) Welche Wirkung haben die Platingruppenelemente Pt, Pd und Rh auf die Biosphäre? *GIT - Laborfachzeitschrift*, 8:731-733
3. Singer C, Zimmermann S, Sures B (2005) Induction of heat shock proteins (hsp70) in the Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): comparison with lead and cadmium exposures. *Aquatic Toxicology* 75, 65-75.
4. Schmid, M., Zimmermann, S., Krug, H.F., Sures, B. (in preparation) Cytotoxicity of the platinum group metals Pt, Pd and Rh as compared with other common metals. *Toxicology Letters*
5. Singer, C., Zimmermann, S., Sures, B. (in preparation) Metallothionein induction in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to cadmium, lead, platinum, palladium and rhodium. *Aquatic Toxicology*

Buchkapitel:

1. Hoppstock, K., Sures, B. (2004) Platinum-Group Metals. In: Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., Stoepler, M. (Eds.): *Elements and their compounds in the environment*. 2nd Ed, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 1047-1086
2. Sures, B., Singer, C, Zimmermann, S. (2005): *Palladium Emissions in the Environment: Analytic, Environmental Assessment and Health Effects*. Springer, Heidelberg (in press).

Diplomarbeiten:

1. Singer, C. (2003) Untersuchungen zur Induktion metallbindender Proteine und Hitzeschockproteine in Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) durch die Platingruppenelemente Platin, Palladium und Rhodium. Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe
2. Schmid, M. (2003) Cytotoxizität der Platingruppenmetalle Platin, Palladium und Rhodium. Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe
3. Som, A. (2004) Aufnahme und Wirkung Partikel-gebundener Metalle in Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) mit besonderer Berücksichtigung der Platingruppenelemente. Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe

4. Eybe, T. (2004) Analytik und Lokalisation von Platingruppenelementen (PGE) in Organismen. Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe

Präsentationen:

1. 9. Edelmetall-Forum 2004, München, 13.-14.12.2004
 - Schmid, M., Singer, C., Krug, H.F., Zimmermann, S., Sures, B.: Zytotoxizität löslicher Platingruppenelemente (Vortrag)
 - Singer, C., Som, A., Zimmermann, S., Sures, B.: Untersuchungen zur organismischen Toxizität der Platingruppenelemente (Vortrag)
2. Analytica 2004 - 19. Internationale Fachmesse und Analytica Conference, München, 11.-14.05.2004
 - Sures, B., Zimmermann, S.: Is the toxicological potential of platinum group metals underestimated? New results from field and laboratory studies. (Vortrag)
3. VIII. SETAC GLB-Tagung: New Blood in Ecotoxicology, Heidelberg, 21.-23.09.2003
 - Zimmermann, S., Sures, B.: Welche Bedeutung haben Platinmetalle aus Autoabgaskatalysatoren für die Umwelt? (Vortrag)
 - Singer, C., Zimmermann, S., Sures, B.: Untersuchungen zur Induktion von Hitzeschockproteinen und Metallothioneinen durch Platingruppenelemente in der Dreikantmuschel (*Dreissena polymorpha*) (Vortrag)
4. Deutsch-Brasilianisches Symposium - Wissenschaftliche und technologische Beiträge zur nachhaltigen Entwicklung, Tübingen, 16.-19.07.2003
 - Zimmermann, S., Krug, H.F., Sures, B.: Analysis and toxicity of the platinum group metals Pt, Pd and Rh emitted from automobile exhaust catalyts. (Poster)
5. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft in Zusammenarbeit mit der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Berlin, 10.-13.06.2003
 - Singer, C., Schmid, M., Krug H.F., Zimmermann, S., Sures, B.: Studies on the toxicological effects of platinum group elements and other traffic related metals *in vivo* and *in vitro* (Poster)