

Forschungsberichtsblatt

Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS)

Förderkennzeichen: BWB 99004

**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

Dezember 2001

1. Kurzbeschreibung der Forschungsergebnisse

Einleitung und Fragestellung

Fremdstoffmetabolisierende Cytochrome P450 werden im Säugetierorganismus durch Schadstoffe in ihrer Expression moduliert und lassen sich somit als Effektbiomarker diagnostisch nutzen. Die durch eine Schadstoffaufnahme ausgelösten biochemischen Vorgänge sowie zwischengeschaltete Resorptions- und Transport-Prozesse, die bis zur Induktion im Zielgewebe führen, lassen sich in ihrer Komplexität zur Zeit *in vitro* nicht simulieren. Somit stellen die zunächst an geeigneten Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse die Grundlage für entsprechende zu entwickelnde Testverfahren dar. Im vorgestellten Projekt haben wir das Minischwein als Modellorganismus für die orale Aufnahme kontaminierter Böden benutzt. Fokussiert haben wir unsere Untersuchungen 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.

Ergebnisse

Die im Projekt erzielten Ergebnisse erstrecken sich auf vier Bereiche:

- (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.

zu (1). Mit modifizierten Aufarbeitungsmethoden konnten aus verschiedenen Geweben von Minischweinen Mikrosomen mit spektroskopisch und enzymatisch intaktem Cytochrom P450 gewonnen werden. Insbesondere erwies sich für die Mikrosomen-Isolierung aus Duodenum und Niere der Einsatz von Protease-Inhibitorgemischen als notwendig. Für die immunchemische Quantifizierung von CYP1A1 und CYP2E1 des Minischweins konnten jeweils kreuzreagierende Antikörper, die gegen die orthologen Enzyme der Ratte gewonnen wurden, identifiziert werden.

zu (2). Enzymatische und immunchemische Analysen zeigen, dass CYP1A1 konstitutiv in Leber, Niere und Duodenum von Minischweinen nicht oder in nicht nennenswertem Umfang exprimiert wird.

zu (3). Nach oraler Aufnahme PAK-kontaminierter Böden kommt es zu einer dosisabhängigen CYP1A1-Induktion in Duodenum, Leber und Niere der Minischweine. Niedrigbelastete Böden, die nur geringe Effekte in der Leber hervorrufen, können eine deutliche CYP1A1-Induktion im Duodenum bewirken. Auch in Leukozyten von Minischweinen konnte eine Induktion von CYP1A1 auf Proteinebene nach Aufnahme PAK-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.

zu (4). 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 zudem zeigen, dass sich die Art und Weise der täglichen oralen PAK-Aufnahme deutlich auf das Ausmaß der CYP1A1-Induktion auswirkt. So bewirkt eine über den Tag verteilte Schadstoffaufnahme eine wesentlich geringere CYP1A1-Induktion als eine Gabe der identischen Dosis als einmaliger Bolus.

Als wesentliche Ergebnisse der Studie sind zusammengefaßt zu nennen:

- (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.

Schlußfolgerungen

Das Cytochrom P450-Enzym CYP1A1 hat sich beim Minischwein als geeigneter Biomarker für die Exposition gegenüber PAK erwiesen. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, dass CYP1A1 aufgenommene PAK in reaktive Metabolite umsetzt, ein Teilschritt der chemisch induzierten Carcinogenese. 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 Bedeutung der CYP1A1-Expression für adverse Effekte ist im Hinblick auf die Induktion in verschiedenen Organen nicht immer klar. Hier ist eine Analyse des Zusammenspiels von CYP1A1 bei der Schadstoffprozessierung mit weiteren Phase I- und Phase II-Enzymen notwendig, die als zusätzliche Biomarker im Zuge einer Risikobewertung einzubeziehen sind. 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, die die Basis für eine zwischenartliche Vergleichsmöglichkeit sowie für die Methodenentwicklung liefern muß.

2. Fortschritte in Wissenschaft und/oder Technik

Durch die Studien konnte zum erstenmal gezeigt werden, dass oral aufgenommene PAK-kontaminierte Böden in Dosen, die in einem realistischen Bereich der Aufnahme durch Menschen liegen, das fremdstoffmetabolisierende P450-Enzym CYP1A1 in verschiedenen Organen von Versuchstieren induziert wird. Durch die Induktion des Biomarkers nicht nur im Eintrittsgewebe dem Duodenum sondern auch in Leber, Niere, Lunge und Milz wird der Weg der Schadstoffe im Organismus verfolgbar gemacht.

Die Studien machen deutlich, dass verschiedene Spezies – hier Minischweine und Ratten – organspezifisch unterschiedliche Antwortprofile hinsichtlich der Induktion von P450-Enzymen zeigen und somit unterschiedliche Strategien der Schadstoffabwehr verfolgen. Dies ist ein neuer Aspekt, der für die Auswahl eines geeigneten Tiermodells für den Menschen sehr bedeutsam ist.

3. Empfehlungen aus den Forschungsergebnissen für die Praxis

Die im Projekt erzielten Ergebnisse unterstreichen die Erfordernis, aussagekräftige und kostengünstige *in vitro*-Testsysteme hinsichtlich einer realistischen Risikoabschätzung für den Menschen zu entwickeln. Diese Tests müssen die biochemischen Antworten des für die Fragestellung als geeignet eingestuften Tiermodells reflektieren. Eine direkte Umsetzung in die Praxis ist zur Zeit aber noch nicht möglich. Sukzessive muß zunächst eine Matrix relevanter Biomarker und Prozesse festgelegt werden, die dann in einer *in vitro*- oder einer mathematischen Simulation Berücksichtigung finden.

4. 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. *Biochem Pharmacol*

Poster/Abstracts

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

Roos, P.H.

Cytochrom P450 CYP1A1 des Darms und der Leber als sensitiver Effektbiomarker 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.