Ein *in vitro* Testsystem zur Abschätzung human-immuntoxischer Wirkungen von Umweltchemikalien

Winfried Ahne
Tierärztliche Fakultät der Ludwig Maximilians Universität D-München

Zusammenfassung
Es wird ein in vitro Testsystem mit isolierten humanen Leukozyten zur Ermittlung von immuntoxischen Wirkungen der polychlorierten Biphenylen (PCB) vorgestellt. Die Produktion der Interleukine IL-1alpha, IL-2 und des Tumornekrosefaktors (TNF-alpha) von stimulierten humanen Leukozyten wurde durch 0,05 ng PCB 77 und PCB 126 zwischen 60 und 80% gehemmt.

Summary: An in vitro *test system for evaluation of human-immunotoxicological actions of polychlorinated biphenyls (PCB)*
An in vitro test system using isolated human leukocytes for evaluation of immunotoxicological actions of polychlorinated biphenyls (PCB) is described. Immunotoxic effects of PCB 77, PCB 126 could be demonstrated by evaluation of the production of interleukin IL-1alpha, IL-2 and the tumor necrosis factor (TNF-alpha) of stimulated human leukocytes. The release of IL-1alpha, IL-2 and TNF-alpha was suppressed up to 60-80% by 0,05 ng of the PCB.

Keywords: PCB, immunotoxicity, cytokines, human leukocytes

1 Problemstellung

Angesichts der Belastung der Umwelt mit Industriechemikalien, Pharmawirkstoffen, Insektiziden, Pestiziden und anderen Stoffen, ist in weiten Teilen der Bevölkerung eine zunehmend kritische Einstellung zum Umweltverhalten des Menschen zu beobachten. Die in den siebziger Jahren massenweise produzierten polychlorierten Biphenyle sind weitgehend Synonyme für Schadstoffe, Umweltgifte und Altlasten (Rudolph und Boje, 1986; Berndt, 1995).

Mangels entsprechender Testverfahren ist man kaum in der Lage, die realen Gefährdungspotentiale der Umweltchemikalien für den Menschen zu ermitteln. Dies gilt insbesondere auch für Substanzen mit mutmasslichen immuntoxischen Potentialen. Da zur Feststellung der Immuntoxizität von Umweltchemikalien bisher keine offiziellen Prüfrichtlinien vorliegen, wird erwogen, diese durch die Einführung zusätzlicher Endpunkte innerhalb bereits für andere toxikologische Bereiche durchgeführter Tierversuche zu ermitteln (Rusche, pers. Mitteilung). Bei den gesetzmässigen Prüfverfahren der Fremdstoffe werden in der Regel Tierversuche vorgeschrieben. Diese sind im allgemeinen ethisch nicht vertretbar, da tierartspezifische Toxizitätsendpunkte (z.B. Mortalität, Morbidität, Mutagenität, Kanzerogenität, Neurotoxizität, Immuntoxizität) als artspezifisch zu interpretiern sind und somit auf den Menschen bezogen wenig Aussagekraft beinhalten. Ansätze zur Testung immuntoxischer Wirkungen von Schadstoffen aufgrund von Biomarkern, wie z.B. den Zytokinen werden heute verfolgt (Ghezzi, 1994).

In der vorliegenden Arbeit wird anhand eines *in vitro* Testsystems der Einfluss von polychlorierten Biphenylen (PCB 76, PCB 126) und Cyclosporin A (CsA), als bekannte immunsuppressive Substanz, auf die Produktion der Interleukine IL-1alpha, IL-2 und den Tumornekrosefaktor (TNF-alpha) mit humanen Leukozyten untersucht. PCBs werden für bisher kaum geklärte Veränderungen im tierischen und menschlichen Organismus verantwortlich gemacht. Sie wirken u.a. auf den Hormonhaushalt, auf die Reproduktionsfähigkeit, auf das zentrale Nervensystem, und sie beeinflussen möglicherweise auch das Immunsystem. Als problematisch hat sich die Bioakkumulation der PCBs erwiesen. Bodendeposition (1-3 mg/m^2), Wasser (Mittelmeer: 2 ng/l) und insbesondere aquatische Organismen (z.B. Muscheln: 10-310 ng/kg, Garnelen: 40-480 ng/kg, Seezunge: 40-130 ng/kg, Hering (Leber): 210-800 ng/kg, Kabeljau (Leber): 960-5200 ng/kg) sind auch heute noch (15 Jahre nach dem Ausbringungsverbot) mit PCBs belastet (Berndt, 1995). Cyclosporin A, ein aus *Tolyplocadium inflatum* gewonnenes zyklisches Oligopeptid, findet in der Transplantationsmedizin weiten Einsatz (Jackson et al., 1985).

2 Experimentelle Durchführung

Untersucht wurden die koplanaren polychlorierten Biphenyle PCB 77, PCB 126 und CsA. Die PCBs wurden als zertifizierte Referenzsubstanzen (je 10 ng/µl in Ethanol gelöst, Reinheitsgehalt 99,5%) vom Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Augsburg, bezogen. Die PCB-Verdünnungen wurden mit Zellkulturmedium (TC 199) hergestellt. Aus Vorversuchen ist der Toxizitätsendpunkt bei einer Verdünnung von 1:100 für das Lösungsmittel Ethanol ermittelt worden. CsA (Reinheitsgrad von mindestend 95%) wurde von der Fa. Sigma, Deisenhofen, bezogen. Die CsA-Verdünnungen sind ebenfalls mit Zellkulturmedium hergestellt worden.

Von einem gesunden Probanden wurden 20 ml frisch gewonnenes, heparinisiertes Blut unter sterilen Kautelen für 3 Versuch-

ansätze aufgearbeitet. Mittels Gradientenzentrifugation (Histopaque 1077, Sigma, Deisenhofen) wurden die Gesamtleukozyten isoliert. Die abgenommene Leukozytenfraktion ist mit Lipopolysaccharid LPS (5 µg/ml) und mit Phytohämagglutinin PHA (5 µg/ml) haltigem Zellkulturmedium auf 10^6 Zellen/ml eingestellt worden. 1 ml dieser Leukozytensuspensionen wurde jeweils zusammen mit 0,1 ml der in 10er Potenzen verdünnten PCB 77, PCB 126 bzw. CsA-Lösungen in sterile 2 ml Eppendorf-tubes eingefüllt und bei 37°C inkubiert. Die Kontrollen sind in gleicher Weise, jedoch ohne PCB bzw. CsA-Zusatz behandelt worden. Zum Zeitpunkt 0 sowie nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die entnommenen Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren.

Die von den Leukozyten freigesetzten Zytokine IL-1alpha, IL-2 und TNF-alpha wurden vermittels eines Immunoassays (*Enzym Linked Immuno Sorbent Assay*, ELISA, *Amersham Life Science*, Buckinghamshire, England) mit jeweils zwei spezifischen monoklonalen Antikörpern quantitativ erfasst. Die Testsysteme wiesen eine Sensitivität von 5 pg/ml auf, der Testbereich umfasste 5-1000 pg/ml. Quantifiziert wurden die Zytokine aufgrund der Interpolation der Extinktionswerte mit den Standardwerten. Für jeden Test wurden neue Standardkurven erstellt. Die photometrischen Messungen erfolgten mit einem mikroprozessorgesteuerten Photometer, die Daten (Mittelwerte) wurden mittels der linearen Regressionsanalyse ausgewertet.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Stimulierung der Gesamtleukozyten induzierte eine kaskadenähnliche Zytokinefreisetzung, wobei erste Signale (TNF-alpha, IL-1alpha), von den aktivierten Monozyten, nachfolgende (IL-2) von den T-Lymphozyten ausgingen. Die infolge der Stimulierung induzierten (Kontrollen) und die unter 0,05 ng PCB 77 bzw. PCB 126 Einfluß erzielten Zytokinewerte sind in den Diagrammen 1, 2 und 3 dargestellt. Die Diagramme 4, 5 und 6 geben die erreichten Zytokinewerte unter dem Einfluß von 10000 bis 10 ng CsA wider. 10 ng CsA zeigten einen deutlichen supprimierenden Effekt (92%) auf die Freisetzung von IL-2, was dem bekannten Hauptwirkungsmechanismus von CsA entspricht. Die TNF-

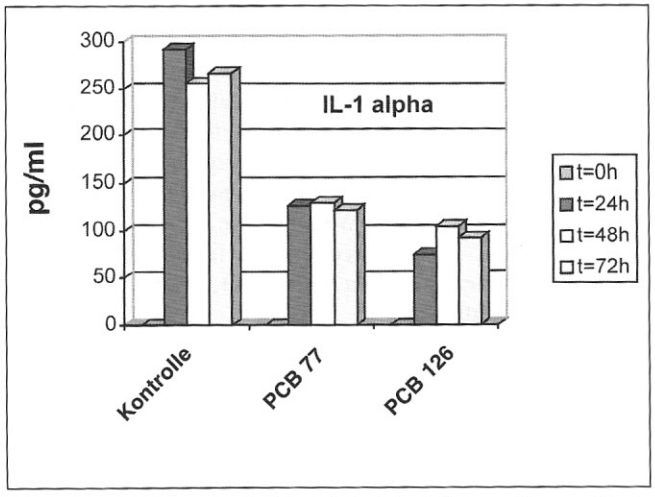

Abb. 1: Beeinflussung der IL-1alpha Produktion mitogenstimulierter humaner Leukozyten durch 0,05 ng PCB 77 und PCB 126

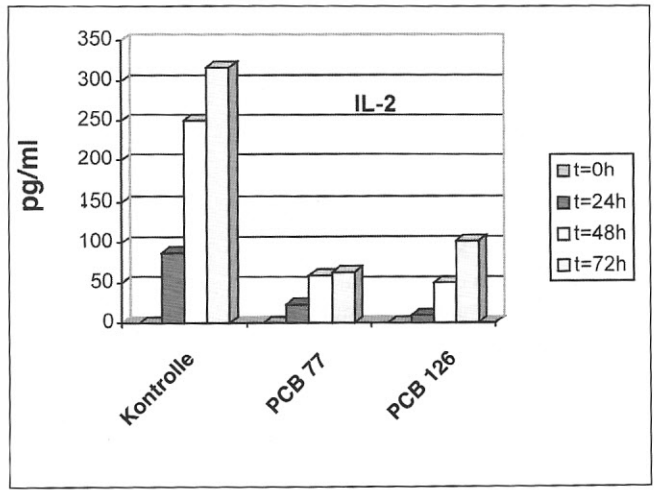

Abb. 2: Beeinflussung der IL-2 Produktion mitogenstimulierter humaner Leukozyten durch 0,05 ng PCB 77 und PCB 126

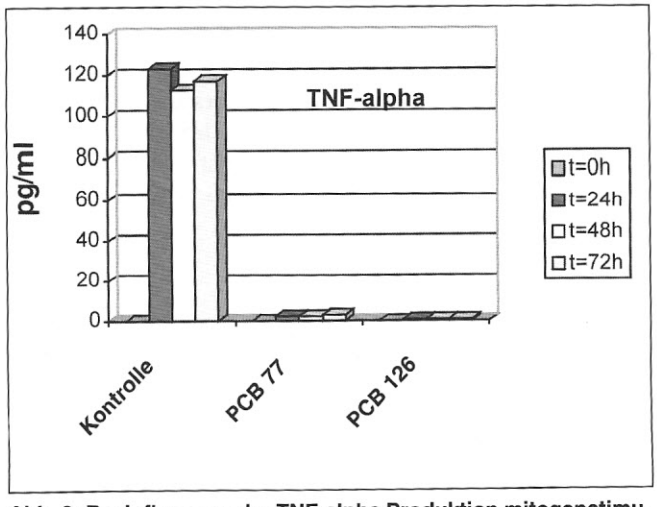

Abb. 3: Beeinflussung der TNF-alpha Produktion mitogenstimulierter humaner Leukozyten durch 0,05 ng PCB 77 und PCB 126

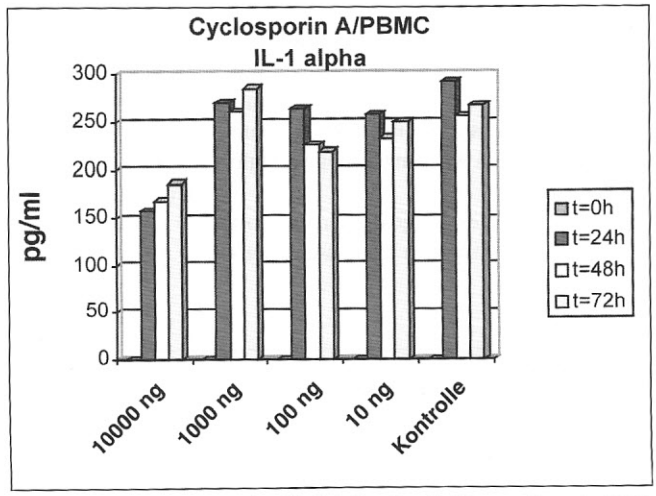

Abb. 4: Beeinflussung der IL-1alpha Produktion mitogenstimulierter humaner Leukozyten durch 10000 - 10 ng CsA

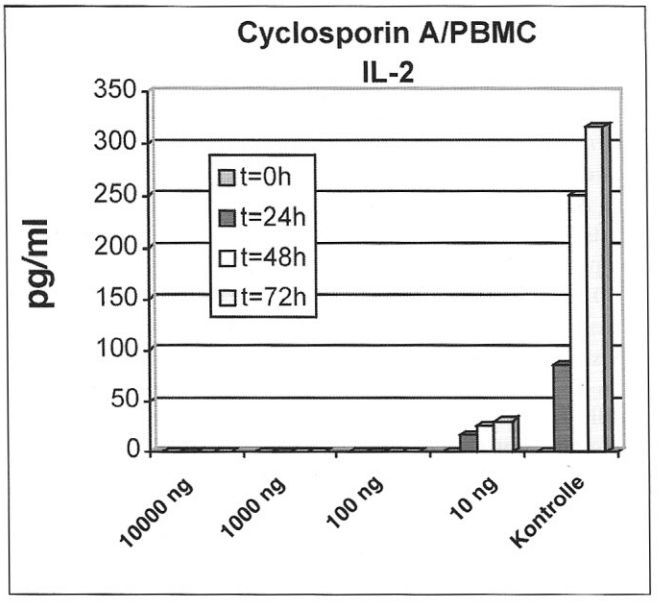

Abb. 5: Beeinflussung der IL-2 Produktion mitogenstimulierter humaner Leukozyten durch 10000 - 10 ng CsA

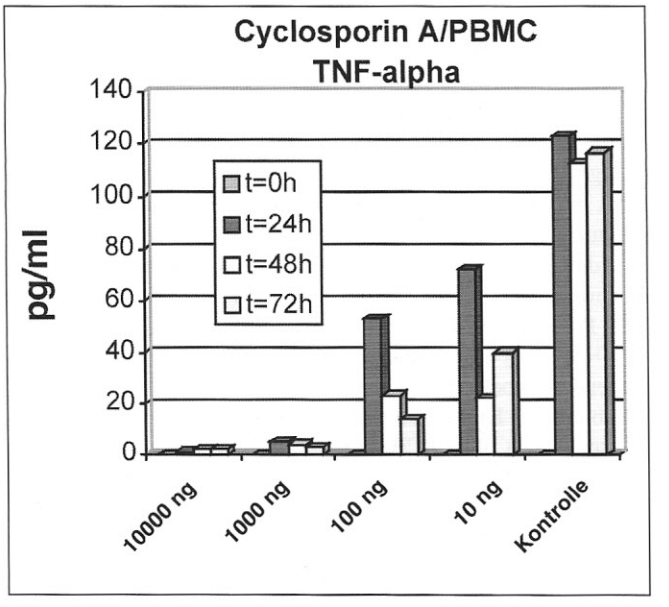

Abb. 6: Beeinflussung der TNF-alpha Produktion mitogenstimulierter humaner Leukozyten durch 10000 - 10 ng CsA

alpha Produktion wurde durch 10 ng CsA bis zu 66% gehemmt, die Produktion von IL-1alpha ist dagegen kaum (4%) beeinflußt worden. Aus den Untersuchungen kann gefolgert werden, daß die PCBs 77 und 126 immuntoxische Wirkungen besitzen, die T-Zellen, Monozyten/Makrophagen und B-Zellen einbeziehen.

Eine Beeinflussung der Produktion und Freisetzung von Zytokinen muß im immunologischen Regelkreis Konsequenzen nach sich ziehen, da hierdurch die Drehscheibe der Steuerung der Immunantwort wesentlich beeinträchtigt wird (Warr and Cohen, 1991; Oppenheim and Shevach, 1991). Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, sind die untersuchten PCBs in ng Konzentrationen in der Lage, die Zytokineproduktion stimulierter Human-Leukozyten zu supprimieren. Die erzielten Ergebnisse konnten durch eine umfangreichere Versuchsreihe mit humanem Vollblut bestätigt werden (Jarre und Ahne unpubl.).

Der Einsatz des vorgestellten *in vitro* Testsystems erwies sich als äusserst sensitiv und erscheint als Screeningtest durchaus geeignet, immuntoxische Wirkungen von Umweltchemikalien auch ohne Tierexperimente zu ermitteln.

Literatur

Berndt, J. (1995). *Umweltbiochemie*. UTB-Taschenbuch, Bd. 1838. Stuttgart: Gustav Fischer.

Ghezzi, P. (1994). From the concept of cytokines as pathogenetic mediators to *in vitro* immunotoxicology testing. *Eur. Cytokine Netw. 5*, 415-417.

Jackson, N. M., O'Connor, R. P. and Humes, H. D. (1985). Cyclosporine interactions with renal proximal tubule cells and subcellular membranes. *Clin. Res. 33*, 487.

Oppenheim, J. and Shevach, M. (1991). *Immunophysiology. The role of cells and cytokines in immunity and inflammation*. Oxford: University Press.

Rudolph, P. und Boje, R. (1986). Ökotoxikologie - Grundlagen für die ökologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz. In J. Vogel, A. Heigl und K. Schäfer (Hrsg.), *Handbuch des Umweltschutzes* (1-105). Landsberg/Lech: Ecomed Verlagsgesellschaft mbH.

Warr, W. and Cohen, N. (1991). Phylogenesis of immuno functions. *CRC Press, Boca Raton, USA*, 1-326.

Danksagung

Der Autor dankt der Andreas-Stihl-Stiftung, D-71336 Waiblingen, für die finanzielle Unterstützung der Arbeit sowie Frau Dr. Brigitte Rusche, Akademie für Tierschutz, D-85579 Neubiberg, für die wertvolle fachliche Diskussionen.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Winfried Ahne
Tierärztliche Fakultät
Ludwig Maximilians Universität
Veterinärstr. 13
D-80539 München