

Toxikokinetik, Metabolismus und EROD-induzierende Wirkung von fluorierten Dibenzodioxinen und Dibenzofuranen.

R. Weber¹, D. Schrenk², H.-J. Schmitz², L. Pöllinger³ und H. Hagenmaier¹

¹Organisch chemisches Institut und ²toxikologisches Institut der Universität Tübingen

³Karolinska Institut, Hudding Universität, Hudding Schweden

Einleitung

In den vergangenen Jahren mehrten sich Anfragen aus der aluminiumproduzierenden und glasverarbeitenden Industrie nach der ökotoxikologischen Relevanz fluorierter Dioxine (PFDD) und fluorierter Furane (PFDF). Hierzu bedarf es neben der Untersuchung des Auftretens in der Umwelt einer toxikologischen Bewertung.

Bei den polychlorierten und bromierten Dibenzodioxinen sind die 2,3,7,8-substituierten-Kongenerere die biologisch am potentesten Kongenerere. 2,3,7,8 TCDD wirkt in der Leber von Nagern als Tumorpromotor [1,2] und ist für verschiedene chronisch- und subchronisch-toxische Wirkungen verantwortlich [3]. Für die PCDD/F wurde eine gute Übereinstimmung zwischen der Bindung an den Dioxinrezeptor, der Induktion von Cytochrom (CYP) P4501A1 und dem toxischem Potential festgestellt [3,4]. Im empfindlichen EROD-Test wird die Induktion der 7-Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)-Aktivität als Maß für die CYP1A1-Induktion gemessen [5,6].

Die induzierende Potenz von 2,3,7,8 TFDD/F wurde in Hepa-1 Zellen untersucht. Ferner wurde der Einfluß von 2,3,7,8-TFDD auf die Transkription eines transfizierten XRE (Xenobiotic Responsive Element)- Rezeptorgen-Konstruktes als Parameter für eine Aktivierung des Dioxinrezeptors überprüft.

Für die toxikokinetische Untersuchung wurde die Eliminationsgeschwindigkeit des 2,3,7,8 TFDD in Blut und Leber von NMRI-Mäusen bestimmt. Der metabolische Abbau der fluorierten Dioxine und Furane wurde in Leberhomogenat von NMRI-Mäusen untersucht.

Materialien und Methoden.

Männliche NMRI-Mäuse (Körpergewicht 20-23g) wurden mit einer einmaligen intraperitonealen Dosis von 100µg/kg 2,3,7,8 TFDD behandelt. Die Mäuse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten zur Blutentnahme mit Äther narkotisiert. Nach Töten der Tiere wurde die Leber entnommen und Blut und Leber auf TFDD untersucht.

Leberhomogenate wurden aus männlichen NMRI-Mäusen gewonnen. Für das induzierte Homogenat wurden die Tiere vor Entnahme der Leber dreimal im 24h-Rhythmus jeweils mit 900 mg β-Naphthoflavon behandelt (β-Naphthoflavon wurde in Maiskeimöl gelöst und intraperitoneal injiziert). Die Lebern wurden mit steriler Kochsalzlösung blutfrei gespült und in 4 ml Tris/Saccharose (5 mM Tris, 250 mM, Saccharose, pH 7,4) zerkleinert. Es wurde gekühlt homogenisiert, abzentrifugiert und bei -70°C aufbewahrt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C in 200 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,4), 200 µl 1 mM MgCl₂, 200 µl 5 mM NADP, 200 µl 50 mM Natriumisocitrat, 40 µl Isocitratdehydrogenase (Boeringer, Mannheim) und Leberhomogenat mit einem Proteingehalt von jeweils 1,2 mg. Die Zugabe von 1-10 nM Substrat erfolgte in 10µl DMSO. Die Inkubation wurde jeweils mit 1 ml Toluol gestoppt und interner Standard zugegeben. Die Extraktion der PFDD/F erfolgt durch zweimalige 15minütige Ultraschallbehandlung in jeweils 1 ml Toluol. Die organische Phase wurde auf 40µl eingengt und die Proben mittels HRGC/LRMS analysiert. Für die Untersuchung der CYP1A1 Induktion wurden Hepa-1 Zellen 48 Stunden lang mit 2,3,7,8 TCDD/F oder 9 h mit 2,3,7,8 TFDD/F inkubiert und die EROD-Aktivität gemessen wie beschrieben. [6]

Ergebnisse und Diskussion

Der EROD-Test [Abb.1] ergab für 2,3,7,8 TFDD eine 10-100 fach geringere induzierende Potenz als für 2,3,7,8 TCDD. Es konnte gezeigt werden, daß TFDD die Transkription eines XRE-Reportergen-Konstruktes in Hepa-1 Zellen mit circa 10 fach niedrigeren Potenz als TCDD induziert [siehe auch 7]. Daraus kann auf eine Dioxinrezeptor-vermittelten Induktionsmechanismus geschlossen werden.

Bei 2,3,7,8 TFDF konnte über einen weiten Konzentrationsbereich keine Induktion festgestellt werden. Dieser Befund könnte durch ein Zusammenwirken einer schnellen Metabolisierung verbunden mit einer schwächeren Bindung an den Dioxinrezeptor erklärt werden

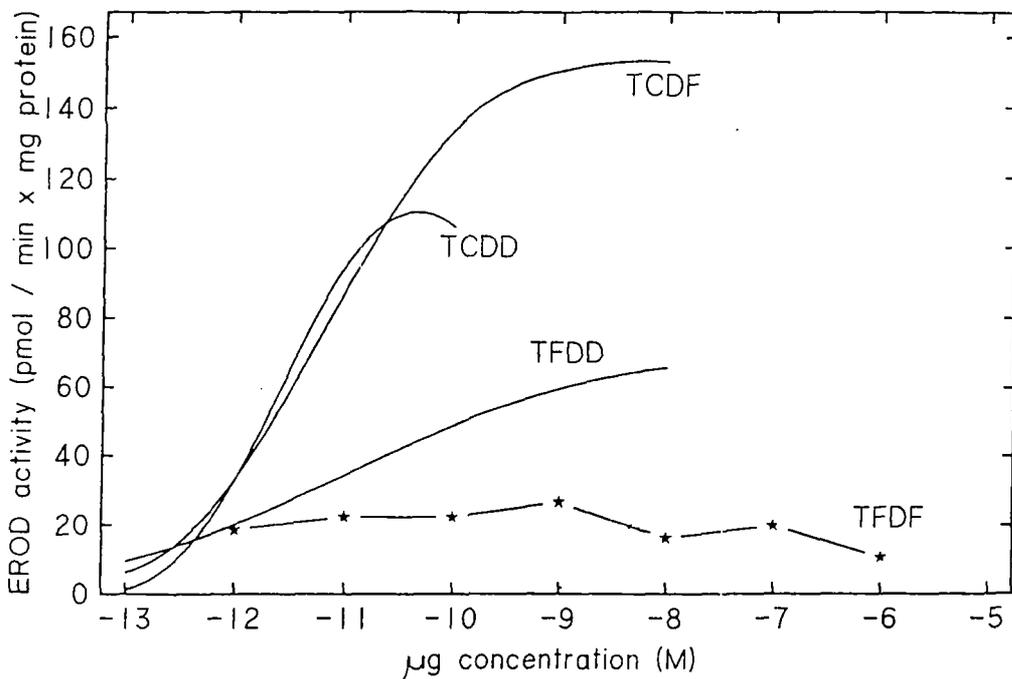


Abbildung 1: EROD Aktivität von 2,3,7,8 TFDD/TFDF und 2,3,7,8 TCDD/TCDF auf Hepa-1 Zellen

Eine Metabolisierung der fluorierten Dioxine und Furane konnte durch den Abbau in Leberhomogenat nachgewiesen werden [Abb.2]. Die Metabolisierung findet in hitzeinaktiviertem Homogenat nicht statt und ist NADPH-abhängig. Beim Vergleich von Leberhomogenat von mit β -Naphthoflavon behandelten Mäusen mit Homogenat aus unbehandelten Tieren wurde 2,3,7,8 TFDD/F und die nicht 2,3,7,8 substituierten PFDD/F durch Homogenat aus behandelten Mäusen deutlich schneller abgebaut. Es ist damit wahrscheinlich, daß für die Metabolisierung die β -Naphthoflavon-induzierbaren CYP1A1/1A2 verantwortlich sind. Der Abbau der 2,3,7,8 substituierten Kongenere ist dabei erwartungsgemäß langsamer als die Metabolisierung der nicht 2,3,7,8 substituierten Kongenere. Für den Abbau der OFDD/F scheint die Induktion in der Leber keine Rolle zu spielen.

Während man innerhalb der Inkubationszeit von 120 Minuten für 2,3,7,8, TCDD/F keine Abnahme feststellen konnte, war von 2,3,7,8 TFDD nach dieser Zeit noch ca. 25% der Ausgangskonzentration vorhanden, von 2,3,7,8 TFDF nur noch 3%.

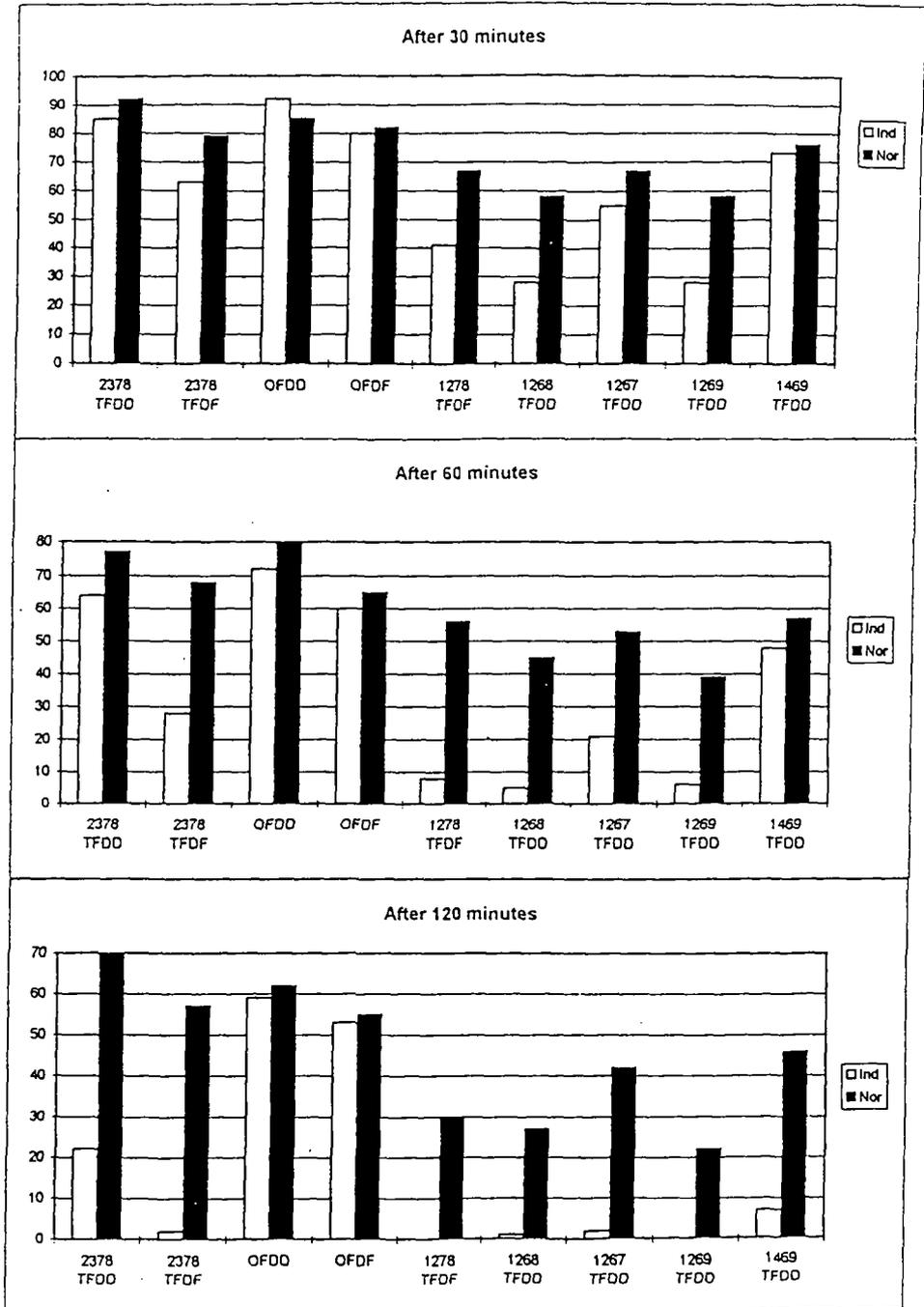


Abbildung 2: Metabolischer Abbau fluorierter Dibenzodioxine und Dibenzofurane in Mäuseleberhomogenat von mit β -Naphthoflavon behandelten Mäusen (Ind) und unbehandelten Mäusen (Nor) (0 min.=100%; 5 nM Σ Dioxin/Furan in 1,2 mg Protein)

Mit diesem Ergebnis konnte sowohl die fehlende EROD-Aktivität des 2,3,7,8 TFDF als auch die Ergebnisse der toxikokinetischen Eliminationsstudie von 2,3,7,8 TFDD in männlichen NMRI-Mäusen erklärt werden. Bei der biphasischen Elimination von 2,3,7,8 TFDD in Mäusen war eine Halbwertszeit von ca. 5 min. (schnelle Phase)/2,5 h (langsame Phase) in Blut und von 30 min. (schnelle Phase)/4,5 h (langsame Phase) in Leber gefunden worden [Abb.3]. Dies bedeutet eine dramatische Verkürzung im Vergleich zum 2,3,7,8 TCDD mit einer Halbwertszeit von 8,5 Tagen in der Leber von Mäusen [8].

Diese schnelle Elimination läßt sich in Übereinstimmung mit dem Versuch in Leberhomogenat mit einer schnellen Metabolisierung des 2,3,7,8 TFDD erklären.

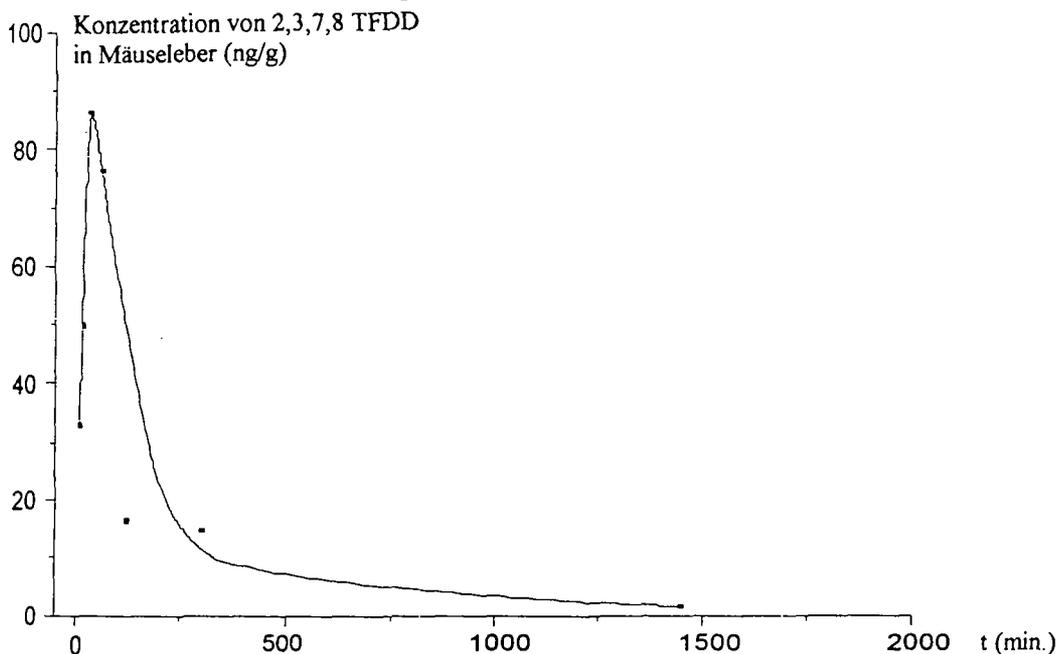


Abbildung 3: Elimination von 2,3,7,8 TFDD aus männlichen NMRI-Mäusen (Leber) nach einmaliger intraperitonealer Applikation von 100 µg/kg TFDD

Bei einem Langzeitversuch an einer männlichen NMRI-Maus konnte nach viermaliger Injektion von 30µg 2,3,7,8 TFDD im Zeitraum von 6 Wochen kein "Wasting Syndrom" und keine Induktion von CYP1A1/1A2 in der Leber festgestellt wurde.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß 2,3,7,8 TFDD zwar in der Lage ist in einem *in vitro* System den Dioxinrezeptor zu aktivieren, daß aber aufgrund seiner geringen Halbwertszeit und des Fehlens toxischer Wirkungen die Voraussetzungen für die Zuordnung eines "Toxic Equivalency Factors" (TEFs) nicht gegeben sind.

Literatur

- 1) H. C. Pitot, T. Goldsworth, H. A. Cambell, and A. Poland, *Carcinogenesis*, **8**, 1491, (1987).
- 2) D. Schrenk et al., *Carcinogenesis*, **15**, 509 (1994).
- 3) A. Poland and J.C. Knutson, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517 (1982).
- 4) S. H. Safe, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**, 371 (1986).
- 5) D. W. Nebert, F.J. Gonzales, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 945 (1987).
- 6) D. Schrenk et al., *Arch. Toxicol.*, **65**, 114 (1991).
- 7) D. Schrenk et al., *Organohalogen Compounds*, **21**, 217 (1994).
- 8) L. S. Birnbaum, *Drug Metab. Dispos.*, **14**, (1986).