

Thomas Schulz

**Zur Eignung von Primaten als Tiermodell in
der Toxikologie unter besonderer Berücksichtigung
der polyhalogenierten Dibenzodioxine**



Cuvillier Verlag Göttingen

Aus der Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin
des Zentrums Umwelt- und Arbeitsmedizin
in der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Zur Eignung von Primaten als Tiermodell in der Toxikologie unter
besonderer Berücksichtigung der polyhalogenierten Dibenzodioxine

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
in der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

von

Dr. rer. nat. Thomas Schulz

Göttingen 2000

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Schulz, Thomas:

Zur Eignung von Primaten als Tiermodell in der Toxikologie unter besonderer Berücksichtigung der polyhalogenierten Dibenzodioxine / von Thomas Schulz. -

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2000

Zugl.: Göttingen, Univ., Habil.-Schr., 2001

ISBN 3-89873-417-X

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2002

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2000

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-417-X

Publizierte Inhalte der Medizinischen Habilitationsschrift von
Herrn Privatdozenten Dr. rer. nat. Thomas Schulz
Nach § 11 der Habilitationsordnung der Universität Göttingen

Göttingen 2002

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Primaten in der biomedizinischen Forschung	1
1.1.1. Primaten in der Toxikologie	1
1.1.2. Marmosetaffen	2
1.2. Fremdstoffmetabolismus	2
1.2.1. Substratauswahl für die Cytochrome P450	6
1.2.2. Glutathiontransferasen	6
1.2.3. Induktion der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme	7
1.3. Polychlorierte Dibenzo-p-Dioxine	7
1.3.1. Dioxinbelastung in der Allgemeinbevölkerung	8
1.3.2. Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Dioxine, Toxizitätsäquivalente	9
1.3.3. Bromierte und gemischthalogenierte Kongenere	10
1.3.4. Speziesunterschiede in der Toxizität und Kinetik des TCDD	10
1.4. Fragestellung der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Chemikalien	12
2.2. Behandlung der Tiere	13
2.2.1. Blutabnahme bei Ratten und Marmosets	14
2.2.2. In-vivo-Untersuchungen an Marmosets	14
2.2.3. Organ- und Gewebepreparation	14
2.3. Biochemische und analytische Verfahren	15
2.3.1. Herstellung der subzellulären Fraktionen aus Blut, Leber und anderen Organen	15
2.3.2. Bestimmung der GST-Aktivität mit Methylchlorid	16
2.3.3. Bestimmung der GST-Aktivität mit Dichlormethan	16
2.3.4. Bestimmung der GST-Aktivität mit EPNP	17
2.3.5. Bestimmung der GST-Aktivität mit Chlordinitrobenzol	17
2.3.6. Bestimmung der Alkoxyresorufin-O-Dealkylaseaktivität	17
2.3.7. Inhibitionsstudien mit Furafyllin	17
2.3.8. Bestimmung der Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität	17
2.3.9. Bestimmung der Cumarinhydroxylaseaktivität	18
2.3.10. Bestimmung der Arylhydrocarbonhydroxylaseaktivität	18
2.3.11. Bestimmung der Phenacetin-O-Deethylaseaktivität	18
2.3.12. Bestimmung der Chlorzoxazon-6-Hydroxylaseaktivität	19
2.3.13. Bestimmung der Tolbutamid-4-Hydroxylaseaktivität	20
2.3.14. Bestimmung der Testosteron-6 β -Hydroxylaseaktivität	21

Inhaltsverzeichnis

	Seite
2.3.15. TCDD-Analyse	21
2.3.16. PHDD-Analyse	21
2.3.17. Klinisch-chemische Analysen	22
2.3.18. RT-PCR	22
2.3.19. Reinigung und Sequenzierung	23
2.3.20. Peptidsynthese, Herstellung der Antikörper	23
2.3.21. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunblot	24
2.3.22. Säulenchromatographie	25
2.4. Statistische Methoden	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Kinetik der PHDDs	26
3.1.1. Kinetik der PHDDs in der Ratte	26
3.1.2. Kinetik der PHDDs in Marmosets	29
3.1.3. Leber-Fett-Verteilung der PHDDs in Marmosets und Ratte	31
3.2. Biologische Effekte nach PHDD-Behandlung	32
3.2.1. Biologische Effekte nach PHDD-Behandlung von Ratten	32
3.2.2. Biologische Effekte nach PHDD-Behandlung von Marmosets	33
3.2.2.1. In-vivo Untersuchung des Coffeinmetabolismus	33
3.2.2.2. EROD-Aktivität in subzellulären Fraktionen der Marmosetleber	34
3.3. Unterschiede in den Dosis-Wirkungsbeziehungen in Ratte und Marmoset	35
3.3.1. EROD- und MROD-Aktivität nach Induktion durch TCDD	35
3.3.2. Vergleich der EROD-Aktivität mit der hepatischen TCDD-Konzentration in Ratte und Marmoset nach unterschiedlichen Dosierungen	37
3.3.3. Klinisch-chemische Untersuchungen in TCDD-behandelten Marmosets	38
3.3.4. Klinisch-chemische Untersuchungen in TCDD-behandelten Ratten	40
3.4. Vergleich der EROD-Aktivität und der hepatischen PHDD-Konzentration	42
3.4.1. Vergleich der EROD-Aktivität und der hepatischen PHDD-Konzentration in der Ratte	42
3.4.2. Vergleich der EROD-Aktivität und der hepatischen PHDD-Konzentration im Marmoset	43
3.5. Biochemische Charakterisierung von Cytochromen P450 in Dioxin-behandel- ten Marmosets	44
3.5.1. Furafyllin-inhibition im Marmoset	48
3.5.2. Induktion der Cytochrome P450 in der Marmosetlunge	51

Inhaltsverzeichnis

	Seite
3.6. Biochemische Charakterisierung von Cytochromen P450 in Phenobarbital-, Rifampicin-, oder Clofibrat-behandelten Marmosets	52
3.6.1. Zur Kinetik und Inhibition der Tolbutamidhydroxylase im Marmoset	56
3.7. Identifizierung des CYP2E1 im Marmoset	58
3.8. Untersuchungen von Cytochromen P450 in der Leber des Rhesusaffen	63
3.9. Untersuchungen der Glutathiontransferase T1 in Marmoset und Mensch	67
3.9.1. Herstellung eines spezifischen Antipeptidantikörpers gegen rGSTT1	68
3.9.2. Partialreinigung einer GST aus der Marmosetleber	69
4. Diskussion	71
4.1. PHDD-Kinetik und Gewebeverteilung in Ratte und Marmoset, Vergleich mit dem Menschen	71
4.2. Biologische Effekte nach Behandlung mit PHDDs	75
4.3. Biochemische Charakterisierung der Dioxininduzierbarkeit	78
4.4. Biochemische Charakterisierung der Rifampicininduzierbarkeit	82
4.5. Identifizierung von CYP2E1 im Marmoset	84
4.6. Untersuchung der GSTT1 in Mensch und Marmoset	87
4.7. Primaten und Fremdstoffmetabolismus	90
4.8. Schlußfolgerungen	92
5. Zusammenfassung	94
6. Anhang mit Verzeichnis der Abkürzungen	96
7. Literaturverzeichnis	97

1. Einleitung

1.1. Primaten in der biomedizinischen Forschung

Primaten werden in den vergangenen 50 Jahren in verschiedenen Gebieten der biomedizinischen Forschung als Tiermodelle eingesetzt. So wurde der Polio-Impfstoff tierexperimentell an Rhesusaffen untersucht (Hendrickx und Henrickson, 1988). Zur Zeit finden Primaten Verwendung in der AIDS-Forschung, auch hier finden Versuche zur Testung von Impfstoffen an diesen Tieren statt (Kaup et al., 1998).

1.1.1. Primaten in der Toxikologie

In der Toxikologie wurde die besondere Bedeutung der Primaten erstmalig in Folge der Thalidomidkatastrophe offenbar; eine ausführliche Zusammenstellung der Hintergründe wurde bereits vorgestellt (Neubert und Neubert, 1997). Seit den 60er Jahren haben Primaten Eingang in die Prüfung von Arzneimitteln gefunden und werden - neben dem Hund - als Nichtnagetierspezies in Untersuchungen insbesondere des Arzneistoffmetabolismus eingesetzt. Zu den verwendeten Spezies gehören der Rhesusaffe (*Macaca mulatta*), der Cynomolgusaffe (*Macaca fascicularis*) und der Marmosettaffe (*Callithrix jacchus*). Letzterer ist ein Neuweltaffe und wesentlich kleiner als die beiden Makakkenarten. Weitere Vorteile, die für den Einsatz des Marmosets sprechen, sind die leichte Handhabbarkeit und eine gute Reproduktion in der Zucht. Damit entfällt die Notwendigkeit von Wildfängen, die bei Primaten zum einen aus ethischen Gründen problematisch sind und zum anderen durch die Möglichkeit der Durchseuchung mit virulenten Humanpathogenen (Marburgfieber) eine Gefahr für das Laborpersonal darstellen (Johnson, 1990).

Im Metabolismus von Arbeitsstoffen, Arzneistoffen und Umweltchemikalien wurden in den vergangenen Jahrzehnten eine Reihe von fundamentalen Unterschieden zwischen Mensch und den - in der Forschung besonders häufig eingesetzten - Nagetieren festgestellt (Guengerich, 1997; Hengstler et al., 1999). Für den Einsatz von Primaten werden insbesondere die enge phylogenetische Verwandtschaft mit dem Menschen als auch die dem Menschen vergleichbare Empfindlichkeit gegen Thalidomid als Begründung herangezogen.

Eine Voraussetzung für den rationalen Einsatz von Primaten in der Erforschung des Fremdstoffmetabolismus ist die gründliche Kenntnis der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme (FME) und ihrer Regulation in den betroffenen Spezies.

Die Vertiefung dieser Kenntnisse war das Anliegen der vorgelegten Schrift.

Die toxikokinetischen Studien ausgewählter polyhalogener Dibenzo-p-Dioxine (PHDD) wurden mit funktionalen Untersuchungen verschiedener FME ergänzt.

Auf den folgenden Seiten werden zuerst die Marmosettaffen kurz dargestellt – die im Gegensatz zum Rhesusaffen noch nicht allgemein bekannt sind - bevor eine Übersicht über die FME und die ausgesuchten Problembereiche folgt. Abschließend wird die Bedeutung der PHDDs kurz dargestellt.

1.1.2. Marmosettaffen

Am Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie der Freien Universität Berlin existiert seit 20 Jahren eine Marmosetkolonie. Die Kolonie besteht aus 100 Zuchtpaaren, deren Verpaarung durch ein Computerprogramm überwacht wird, um Inzucht zu vermeiden. In der Vergangenheit sind große Marmosetkolonien, wie die des englischen Unternehmens ICI / Zeneca, aufgrund von Inzuchtproblemen zusammengebrochen (PD Dr. Wolfgang Heger, persönliche Mitteilung).

Zur Zeit verwenden verschiedene pharmazeutische Unternehmen Marmosets in der präklinischen Forschung.

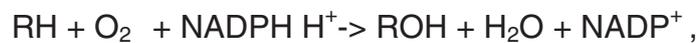
Ausgewachsene Marmosets wiegen etwa 300 bis 400 g, werden mit 18 Monaten geschlechtsreif und werfen nach einer Tragzeit von ca 140 Tagen Zwillinge oder Drillinge.

1.2. Fremdstoffmetabolismus

Die meisten der exogen zugeführten Fremdstoffe, zu denen auch Arbeits- und Arzneistoffe gehören, sind so lipophil, dass sie ohne weitere metabolische Modifikationen nicht eliminiert werden können. Dies gilt auch für viele endogen synthetisierte Verbindungen, die nach erfolgreicher Signalübermittlung ebenfalls inaktiviert und eliminiert werden müssen. Dem Säugetierorganismus stehen für den Fremdstoffmetabolismus solcher Verbindungen eine Vielzahl von Enzymsystemen zur Verfügung, die sich alle durch ein bemerkenswert breites Substratspektrum auszeichnen. Es werden Phase I- und Phase II-Reaktionen unterschieden: Phase I-Reaktionen umfassen im wesentlichen oxidative Reaktionen, die zur Bildung von polaren und reaktiven Metaboliten führen. Diese Metaboliten werden dann durch Konjugierungsreaktionen der Phase II im allgemeinen hydrophiler und damit renal oder biliär eliminierbar. Hierbei entstehen in der Regel biologisch inaktive Metaboliten. Es können aber auch biologisch aktive Substanzen gebildet werden;

dies geschieht meist über die oxidativen Reaktionen. Diese aktiven Metaboliten können einerseits selbst das Wirkprinzip darstellen (z.B. Cyclophosphamid), sie können andererseits aber auch mit Proteinen oder DNA reagieren (Schulz und Hallier, 1999). Es wird diskutiert, dass etwa 25% aller Arzneistoffe und umweltrelevanten Schadstoffe ihre unerwünschten Wirkungen erst nach Aktivierung durch FMEs entfalten (Nebert, 1997).

Die bedeutendste Enzymgruppe, die Phase I-Reaktionen vermittelt, sind die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen. Die Cytochrome P450 sind Hämproteine, die zusammen mit der Cytochrom P450-Reduktase im Organismus als Monooxygenase fungieren. Die allgemeine Reaktionsgleichung für die Monooxygenierungen lautet:



wobei R einen aliphatischen oder einen aromatischen Rest darstellen kann. Die Nomenklatur der Cytochrome P450 leitet sich aus der Sequenz ab; die P450-Enzyme sind nach Familien und Unterfamilien zusammengefaßt, wobei für den Fremdstoffmetabolismus im Säugetierorganismus nur die Familien eins bis drei von Bedeutung sind.

Die Familie **CYP1** besteht nur aus drei Genen, die wegen der hohen Konservierung der Aminosäuresequenz und damit verbunden, der sehr ähnlichen Funktionen und enzymatischen Eigenschaften, in allen (Säugetier)Spezies den gleichen Namen erhielten: CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1. Zur genauen Unterscheidung werden hier immer noch die Spezies genannt, in Anlehnung an die GST-Nomenklatur ist auch die Spezifizierung mit einem kleinen Buchstaben denkbar, so z.B. hCYP1A1 für humanes CYP1A1 oder rCYP1A2 für das Rattenzym. Das einzige weitere Cytochrom P450, das als ortholog zwischen den Spezies betrachtet wird, ist CYP2E1; für alle anderen CYP-Enzyme ist der Speziesvergleich sehr schwierig, wenn nicht teilweise unmöglich.

Die Familie **CYP2** besteht aus 8 Unterfamilien, die teilweise eine Reihe von verschiedenen Genprodukten enthalten. Entwicklungsgeschichtlich wird die Diversifizierung dieser Subfamilie mit der Besiedlung des Festlandes durch Pflanzen und Tiere vor ca. 300 Millionen Jahren in Verbindung gebracht. Im Pflanzenreich wurde versucht, den Nachteil eines festen Standortes durch die Synthese sekundärer Inhaltsstoffe, die entweder als Bitterstoffe oder als Fraßgifte wirken, auszugleichen. Damit erhielten für die Pflanzenfresser die FME, die die sekundären