

Anthropogene und biogene Schadstoffe in Lebensmitteln: Immun- und neurotoxische Wirkmechanismen

Watzl, B., Hänsch, G.M.¹, Schmezer, P.², Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B.L.

Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, ¹Institut für Immunologie, Universität Heidelberg, ²Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung Risikofaktoren und Toxikologie, Heidelberg

Zusammenfassung

Schadstoffe in Lebensmitteln werden als ein möglicher Faktor bei der Auslösung von Lebensmittel-Allergien diskutiert. Experimentelle Beweise für Schadstoff-verstärkte allergische Reaktionen im Gastrointestinaltrakt liegen bisher jedoch nicht vor. Ziel dieses Verbundvorhabens war die Klärung der Frage, ob anthropogene und biogene Schadstoffe die intestinale Barriere beeinträchtigen und die Immunantwort gegen Lebensmittel-Allergene modulieren. Als anthropogene Schadstoffe wurden Aflatoxin B₁ (AFB) sowie Quecksilberchlorid (HgCl₂) und als biogener Schadstoff Weizenkeimagglutinin (WGA) eingesetzt.

Die *in vivo*-Applikation von AFB bei BN-Ratten führte in den mesenterialen Lymphknoten zu einer signifikanten Zunahme der CD8⁺-Zellen. Zusätzlich waren in dieser Zellpopulation vermehrt Zellen mit den Aktivierungsmarker CD71 nachzuweisen. Daraus kann ein CD8-spezifischer Effekt von AFB abgeleitet werden. Die Immunantwort gegen das Modellallergen OVA war jedoch nicht beeinflusst.

HgCl₂ und MeHgCl wirkten bei den intestinalen Epithelzellen in einer Konzentration von 36,8 bzw. 40 µM zyto- und genotoxisch. Darunter liegende Konzentrationen an HgCl₂ (0,78-12,5 µM) erhöhten die Permeabilität eines epithelialen Zellmonolayers (Caco-2) für Fluoreszein sowie in Ussing-Kammern den Kurzschlußstrom des Dickdarmgewebes, was ebenfalls als Hinweis für eine Stimulation der Permeabilität angesehen werden kann.

Die *in vivo*-Untersuchungen wurden mit gegen OVA immunisierten Tieren durchgeführt. Die einmalige Behandlung mit HgCl₂ (1 mg/kg KG) erhöhte 5 Tage nach der oralen Provokation mit OVA signifikant die anti-OVA-IgE- sowie -IgG-Serumkonzentration. Durch die orale OVA-Applikation erfolgte auch eine Aktivierung mukosaler Mastzellen (RMCP-II-Freisetzung), die bei den einmalig mit HgCl₂ behandelten Tieren auch noch 5 Tage nach der

oralen Provokation nachzuweisen war. Die Bestimmung von Oberflächenmolekülen auf Lymphozyten ergab eine vermehrte Aktivierung von CD4/CD25-positiven Zellen. Auch die mehrmalige Behandlung mit einer niedrigen HgCl₂-Dosis (5 x 0,2 mg/kg KG) führte zu einer deutlichen Stimulation der Immunantwort gegen OVA, wobei diese jedoch geringer ausgeprägt war. Ein direkter Effekt von HgCl₂ (5 x 0,2 mg/kg KG) auf mesenteriale Lymphozyten kann aufgrund von Untersuchungen zu genotoxischen Wirkungen als Ursache der Immuntoxizität nicht ausgeschlossen werden. Bei Tieren, die nicht mit OVA immunisiert wurden, induzierte Hg keine Immuntoxizität.

Im Gegensatz zu HgCl₂ führte die Behandlung mit WGA zu einer Suppression der anti-OVA-IgE-Bildung. Unabhängig davon konnte bei den mukosalem Mastzellen eine Aktivierung durch WGA unmittelbar nach der oralen Applikation nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist, daß die beobachteten Effekte mit einer Dosis erzielt wurden, die nur um den Faktor 10 über der bei überwiegend vegetarischer Ernährung aufgenommenen Gesamtmenge an Lektinen liegt.

Die in diesem Verbundvorhaben ermittelten Daten zeigen, daß anthropogene und biogene Schadstoffe die Immunantwort gegen OVA bei immunisierten Tieren modulieren. Für die Bewertung der Wirkungen beim Menschen spielen Konzentration und Applikationsschema der eingesetzten Schadstoffe eine wichtige Rolle. Im Vergleich mit den geschätzten humanen Expositionswerten liegen hier die untersuchten Dosen deutlich höher. Unter Berücksichtigung der üblichen toxikologischen Sicherheitsfaktoren ist jedoch bei Hg für Menschen mit einer Prädisposition für Allergien bzw. mit einer vorliegenden Allergie eine analoge Immunantwort nicht auszuschließen.

Anthropogenic and biogenic contaminants in food: Immunotoxic effects

Anthropogenic and biogenic contaminants in food: immuno- and neurotoxic mechanisms

Watzl, B., Hänsch, G.M., Schmezer, P., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B.L.

Summary

Food contaminants are suggested to be potential factors contributing to the recently increased incidence of food allergies. However, experimental evidence for contaminant-potentiated allergic reactions in the gastrointestinal tract are largely lacking. The objective of our interdisciplinary project was to investigate whether anthropogenic and biogenic contaminants impair the intestinal barrier and whether they modulate the immune response to food allergens. As anthropogenic contaminants the mycotoxin aflatoxin B₁ (AFB) and mercuric chloride (HgCl₂) and as a biogenic contaminant wheat germ agglutinin (WGA) was used.

The multiple *in vivo* application of AFB to BN rats induced a significant increase of CD8⁺ cells in the mesenteric lymph nodes. In addition, there were more CD8⁺ cells expressing the activation marker CD71. These results indicate a CD8⁺ lymphocyte-specific effect of AFB. However, the immune response towards the model allergen ovalbumin (OVA) was not affected.

HgCl₂ and MeHgCl at concentrations of 36.8 and 40 μM respectively, were cyto- and genotoxic towards rat intestinal epithelial cells. Lower concentrations of HgCl₂ (0,78-12,5 μM) increased the permeability of an epithelial monolayer (Caco-2) for fluorescein and the short-circuit current of the large intestinal tissue, which is indicative of an enhanced permeability of the tissue. An *in vivo*-model of food allergy was used to assess the impact of HgCl₂ on the induction of food allergies. BN rats were immunized intraperitoneally with OVA. A single treatment with HgCl₂ (1 mg/kg b.w.) resulted in significantly elevated anti-OVA-IgE- and -IgG serum concentrations 5 days after the oral challenge. The oral OVA application initiated the activation of mucosal mast cells (RMCP II release), which persisted in the mercury-treated animals for 5 days post oral challenge. Lymphocytes from mercury-treated animals showed a higher percentage of cells expressing the surface markers CD4/CD25. The multiple treatment with low HgCl₂ doses (5 x 0,2 mg/kg b.w.) also stimulated the immune

response against OVA, however, the effect was less significant. A direct effect of HgCl₂ (5 x 0,2 mg/kg b.w.) on mesenteric lymphocytes as a cause of its immunotoxic effect can not be excluded based on our results from genotoxicity studies. Exposure of animals to Hg which were not immunized with OVA did not result in immunotoxicity.

In contrast to the effects of mercury the treatment with WGA resulted in a suppression of the anti-OVA-IgE-production. However, at the same time mucosal mast cells were activated in these animals after oral exposure to WGA. The observed effects of WGA were achieved with dosages which were 10 x higher than the concentration of total lectins in humans consuming a mostly vegetarian diet.

In conclusion, our data clearly show that anthropogenic and biogenic food contaminants can modulate the immune response towards OVA in immunized animals. In order to evaluate, how these effects transfer to the human situation, concentration and mode of application of contaminants are of particular relevance. Humans are exposed to much lower concentrations than what we have used in our animal studies. On the basis of common toxicological safety factors, however, a similar immunomodulatory effect of Hg in humans with a predisposition for allergies can not be excluded.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
2.	Material und Methoden	11
2.1	Versuchstiere	11
2.2	Blutgewinnung	11
2.3	Zellisolierung	12
2.4	Durchflußzytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen	12
2.5	Lymphozytenproliferation	12
2.6	Bestimmung der Rattenmastzellprotease II (RMCP II) im Serum	12
2.7	Bestimmung anti-OVA spezifischer IgE- und IgG-Antikörper	13
2.8	Bestimmung von Interleukin-4 und Interferon- γ	13
2.9	Bestimmung von Zytotoxizität und Genotoxizität	13
2.10	Bestimmung der intestinalen Permeabilität sowie elektrophysiologischer Parameter	13
3.	Ergebnisse	15
3.1	Aflatoxin B ₁ (AFB)	15
3.1.1	Mehrmalige Applikation einer hohen AFB-Dosis (1 mg/kg KG) <i>in vivo</i>	15
3.1.2	Mehrmalige Applikation einer niedrigen AFB-Dosis (100 μ g/kg KG) <i>in vivo</i>	16
3.1.3	Zyto- und Genotoxizität von AFB	18
3.2	Quecksilberchlorid (HgCl ₂)	20
3.2.1	Zyto- und Genotoxizität <i>in vitro</i>	20
3.2.2	Zyto- und Genotoxizität <i>in vivo</i>	21
3.2.3	Einfluß auf intestinale Permeabilität	22
3.2.4	Immuntoxizität von HgCl ₂ (5 x 1 mg/kg KG) bei naiven Tieren	23
3.2.5	Immuntoxizität einer hohen HgCl ₂ -Dosis (1 x 1 mg/kg KG) bei immunisierten Tieren	24

3.2.6	Immuntoxizität einer niedrigen HgCl_2 (5 x 0,2 mg/kg KG) bei immunisierten Tieren	27
3.3	Weizenkeimagglutinin (WGA)	28
3.3.1	Einfluß auf intestinale Permeabilität	28
3.3.2	Immuntoxizität von WGA (5 x 10 mg/kg KG) bei immunisierten Tieren	29
4.	Diskussion	33
5.	Literatur	39

1. Einleitung

Die Inzidenz von Lebensmittel-Allergien hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen, die Ursachen hierfür sind jedoch gegenwärtig nicht bekannt. Als mögliche Faktoren für diese Zunahme stehen u.a. verschiedene Schadstoffe in der Diskussion. Die orale Aufnahme von Schadstoffen führt primär zu einer Schadstoffexposition des Gastrointestinaltrakts einschließlich der Zellen des Darm-assoziierten Immunsystems. Experimentelle Untersuchungen zur Toxizität von Schadstoffen im gastrointestinalen Gewebe sind von hoher Bedeutung für die Klärung der Frage, welche Rolle Schadstoffe bei der Auslösung von Lebensmittel-Allergien spielen können. Die Vielfalt der in Umwelt und Lebensmitteln vorhandenen Schadstoffe sowie die geringe Zugänglichkeit der für die Auslösung von Lebensmittel-Allergien wichtigen Organe (Gastrointestinaltrakt und Darm-assoziiertes Immunsystem) beim Menschen erschwert jedoch die Klärung der Frage, welche Substanzen hierbei von Bedeutung sind.

Im Unterschied zu Inhalations-Allergien (Behrendt 1989, Rusznak et al. 1994) sind bei Lebensmittel-Allergien bisher kaum Untersuchungen zum Einfluß von Schadstoffen auf die Auslösung von Lebensmittel-Allergien durchgeführt worden. Der Gastrointestinaltrakt besitzt zusammen mit dem Darm-assoziierten Immunsystem eine zentrale Rolle bei der Erkennung und immunologischen Prozessierung alimentärer Antigene. In Lebensmitteln vorhandene Schadstoffe könnten die selektive Permeabilität der Darmwand beeinträchtigen sowie Komponenten des Darm-assoziierten Immunsystems bzw. dessen Regulationsmechanismen stören. Des weiteren weisen Untersuchungen zur Immunphysiologie des Gastrointestinaltraktes auf eine direkte Wechselwirkung zwischen Zellen des Nerven- und Immunsystems hin (Bienenstock 1993, McKay et al. 1993), so daß immuntoxische Wirkungen von Schadstoffen möglicherweise auch die Folge von neurotoxischen Wirkungen sind. Schadstoffe könnten die Auslösung von Lebensmittel-Allergien fördern, indem sie:

- (1) direkt das Darmepithel schädigen (Schwermetalle, Lektine)
- (2) die neurale Regulation der intestinalen Permeabilität beeinträchtigen (Schwermetalle)
- (3) Immunzellen unspezifisch schädigen (Schwermetalle, Mykotoxine, Lektine)

- (4) direkt die Mediatorenfreisetzung der Mastzellen stimulieren (Schwermetalle, Lektine) (5) als Haptene wirken und die Allergenität von Nahrungsproteinen erhöhen (Schwermetalle)
- (6) einen Adjuvanseffekt bei der IgE-Antikörperbildung ausüben (Schwermetalle).

Für unsere Untersuchungen wurden sowohl anthropogene als auch biogene Schadstoffe berücksichtigt, da beide Gruppen von Schadstoffen die postulierten Mechanismen induzieren können. Als Beispiel für anthropogene Schadstoffe wurden Mykotoxine und Schadstoffe in die Untersuchungen aufgenommen, als Beispiel für eine biogene Gruppe die Lektine (Weizenkeimagglutinin).

Mykotoxine:

Die Kontamination von Lebensmitteln mit Mykotoxinen wird weltweit als ein gesundheitliches Risiko gesehen, über dessen Folgen, besonders für das Immunsystem, bisher wenig bekannt ist (Pier 1991). In 20 % des in der EG angebauten Getreides und daraus hergestellter Lebensmittel finden sich Mykotoxine (Smith et al. 1994). Obwohl die durchschnittliche Aufnahme einzelner Mykotoxine in der EG sehr niedrig ist, kommt es in der Praxis durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel kurzzeitig zu hohen Mykotoxinbelastungen. Ein Mykotoxin, das hauptsächlich in importierten Lebensmitteln sowie Futtermitteln und dadurch auch in bestimmten tierischen Lebensmitteln vorhanden ist, ist das Aflatoxin B₁ (AFB). AFB wird hauptsächlich im Dünndarm resorbiert und gelangt über mesenteriale Blutgefäße auch in die mesenterialen Lymphknoten (Kumagai 1989) und somit auch in das Darm-assoziierte Immunsystem. Im Tierversuch hemmt AFB in einer Konzentration von 30-700 µg/kg KG/d die Antikörperbildung, die Aktivität der Natürlichen Killerzellen sowie die Lymphozytenproliferation (Sharma 1993). Gegenwärtig ist unbekannt, inwieweit AFB zu einer Beeinträchtigung des Darm-assoziierten Immunsystems führt. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß Schimmelpilze wie *Penicillium lanosoceruleum* an der Auslösung von Lebensmittel-Allergien beteiligt sein können (Fiocchi et al. 1995).

Quecksilber:

Quecksilber (Hg)-Verbindungen werden täglich in einer Menge von 8-12 µg/d mit der Nahrung aufgenommen, wobei in Abhängigkeit von individuellen

Ernährungsgewohnheiten Extremwerte von bis zu 203 µg/d beobachtet wurden (MacIntosh et al. 1996, Public Health Committee 1996). Zusätzlich erfolgt bei Personen mit amalgamhaltigen Zahnfüllungen eine Freisetzung von Hg aus Amalgam in Höhe von 4-5 µg/d (Halbach 1995), so daß die Hg-Aufnahme bei Amalgamträgern in der Größenordnung von 12-17 µg/d liegt. Eine gesundheitliche Bewertung solcher Hg-Expositionen ist gegenwärtig schwierig, da wenig kontrollierte Studien bisher durchgeführt wurden (Ratcliffe et al. 1996). Bei Amalgamträgern mit Entzündungen der Mundschleimhäute wurde jedoch eine Sensibilisierung der Lymphozyten gegen Hg-Verbindungen nachgewiesen (Stejskal et al. 1996).

Hg-Verbindungen werden in den letzten Jahren verstärkt als potentiell immuntoxisch wirkende Schadstoffe untersucht. Ein Grund hierfür ist die Kenntnis, daß die Hg-Freisetzung aus amalgamhaltigen Zahnfüllungen die tägliche Hg-Exposition des Körpers deutlich erhöhen kann. Für organische und anorganische Hg-Verbindungen konnten beim Menschen immunmodulatorische Wirkungen nachgewiesen werden (Eneström und Hultman 1995). Bei humanen Lymphozyten stimulierte die Zugabe von 1 µg/ml HgCl₂ *in vitro* die Lymphozytenproliferation (Stejskal et al. 1994). Die Ergebnisse aus den Tierversuchen zeigen ebenfalls einen Einfluß von Hg-Verbindungen auf das Immunsystem, wobei jedoch deutliche Unterschiede innerhalb einer Spezies zu beobachten sind, wie Untersuchungen mit verschiedenen Rattenstämmen vermuten lassen (Pelletier et al. 1994).

Weizenkeimagglutinin:

Als Beispiel für einen biogenen Schadstoff haben wir das Lektin Weizenkeimagglutinin (WGA) untersucht. WGA beeinflusst im Tierversuch (Ratte; 525 mg/kg KG) die Morphologie des intestinalen Gewebes (Pusztai et al. 1993). Sowohl eine Hemmung (Sjölander et al. 1984) als auch eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität durch WGA (Lorenzsonn und Olsen 1982) wurde beobachtet. *In vitro* interagiert WGA mit T- und B-Lymphozyten (z.B. Interleukin-2-Rezeptor) und beeinträchtigt dadurch verschiedene Lymphozytenfunktionen (Pusztai 1991). Des weiteren stimuliert WGA *in vitro* die Histaminsekretion aus Mastzellen (Lansman und Cochrane 1980). Nach oraler Aufnahme von Vollkorn finden sich beim Menschen Antikörper gegen WGA im Serum (Tchernychev und Wilchek 1996). Die in der Nahrung des Menschen vorhandenen Mengen an Lektinen (0-300 mg/Person) werden als zu niedrig eingeschätzt, um

antinutritive bzw. direkt toxische Wirkungen im Gastrointestinaltrakt auszuüben (Peumans und van Damme 1996). Allerdings liegen bisher keine Ergebnisse vor, inwieweit die orale Aufnahme von WGA das Darm-assoziierte Immunsystem beeinflusst.

Die in der Literatur bisher dokumentierten Untersuchungen befassen sich fast ausschließlich mit systemischen Immuneffekten dieser Schadstoffe (Pestka und Bondy 1994, Pelletier et al. 1994). Da jedoch die Zellen des Darm-assoziierten Immunsystems nach oraler Exposition die Zellen mit der höchsten Schadstoffexposition sind, stand die Untersuchung dieses lokalen Immungewebes sowie die Integrität der Darmschranke im Mittelpunkt des Projektes. Des weiteren sollten Versuchsmodelle entwickelt werden, welche das komplexe Geschehen einer Allergie simulieren und Untersuchungen von Schadstoffwirkungen in diesem Modell ermöglichen.

Die Untersuchungen hatten die Beantwortung folgender Fragen zum Ziel:

1. Können Schadstoffe die intestinale Permeabilität über zyto- und/oder neurotoxische Mechanismen beeinflussen?
2. Können Schadstoffe das Darm-assoziierte Immunsystem beeinträchtigen?
3. Können Schadstoffe bei immunisierten Tieren die Immunantwort gegenüber potentiellen Lebensmittel-Allergenen beeinträchtigen?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden Brown Norway (BN)- sowie Sprague-Dawley(SD)-Ratten eingesetzt. Die Testsubstanzen wurden in den *in vivo*-Versuchen mit einer Schlundsonde appliziert.

Versuchsschema 1: Bei den Versuchen mit nicht-immunisierten BN-Ratten wurde OVA an 5 Tagen in der Woche als Bestandteil eines OVA-freien Futters (C1000, Altromin, Lage) den Tieren verabreicht (5 x 20 mg/Tier/Woche). Der jeweilige Schadstoff wurde einmal pro Woche verabreicht.

Versuchsschema 2: BN-Ratten wurden intraperitoneal immunisiert mit 10 µg OVA ml. Eine einmalige hohe Dosis des Schadstoffes wurde 14 Tage nach der Immunisierung appliziert. Die mehrfache Applikation niedriger Mengen an Schadstoffen wurde zwischen dem 10. und 14. Tag nach der Immunisierung durchgeführt. Eine Stunde nach der letzten Schadstoffapplikation erfolgte die orale Gabe des OVA.

2.2 Blutgewinnung

Während der Versuche wurde Blut aus der Schwanzvene gewonnen. Am Versuchsende wurde Blut aus dem Plexus axillaris entnommen. Das Serum wurde abgetrennt und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.3 Zellisolierung

Intestinale Epithelialzellen wurden anhand eines etablierten Protokolls gewonnen (Brendler-Schwab et al. 1994). Lymphozyten wurden aus der Milz sowie aus den mesenterialen Lymphknoten isoliert (Lopez et al. 1997, Watzl et al. 1993) und in RPMI 1640-Medium (Life Technologies, Eggenstein-Leopoldshafen) suspendiert, das mit 10 mM HEPES (Boehringer Mannheim) gepuffert war und 5 % (v/v) fötales Kälberserum (Life Technologies), 2-Mercaptoethanol (50 µM), L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100

U/ml) sowie Streptomycin (100 µg/ml) enthielt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.4 Durchflußzytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen

Milzzellen und mesenteriale Lymphozyten (1×10^7 Zellen/ml) wurden in FACS-Puffer (PBS mit 1 % BSA und 0,1 % Natriumazid) gewaschen. Die Zellen wurden 30 min bei 4 °C mit Phycoerythrin(PE)-konjugiertem anti-Ratten CD3, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem anti-Ratten CD4, FITC-konjugiertem anti-Ratten CD8, PE-konjugiertem anti-Ratten CD25 oder PE-konjugiertem anti-Ratten CD71 (alle Reagenzien von Pharmingen, Hamburg) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit 1 % Paraformaldehyd fixiert und mit einem FACScan (Becton-Dickinson, Heidelberg) analysiert.

2.5 Lymphozytenproliferation

Mesenteriale Lymphozyten (1×10^6 Zellen/ml) wurden mit dem T-Zellmitogen Concanavalin A (ConA; 5 µg/ml) für 120 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Bromdesoxyuridin (BrdU) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Inkorporiertes BrdU wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA quantifiziert (Boehringer).

2.6 Bestimmung der Rattenmastzellprotease II (RMCP II) im Serum

Die Konzentration von RMCP II im Serum wurde mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA gemessen (Moredun Scientific Limited, Midlothian, UK).

2.7 Bestimmung anti-OVA-spezifischer IgE- und IgG-Antikörper

Mikrotiterplatten (Maxisorp, NUNC, Roskilde) wurden mit OVA (20 µg/ml in Carbonatpuffer) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Platten 3 mal mit einer Waschlösung (0,1 M PBS + 0,05 % Tween 20) gewaschen. Serumproben wurden 1:100 verdünnt für 2 h auf die Platten gegeben. Anschließend erfolgte für 1 h die Zugabe eines monoklonalen Maus-

anti-Ratten-IgE-Antikörpers (Sera-Lab, Biozol, Eching) bzw. eines polyklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-Ratten-IgG-Antikörpers (The Binding Site, Heidelberg). Für die IgE-Bestimmung erfolgte im nächsten Schritt die Zugabe eines polyklonalen, Peroxidase-konjugierten anti-Maus-IgG₁-Antikörpers (SBA, Biozol). Als Substrat wurde ABTS verwendet. Nach 20 min erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 405 nm im Mikroplatten-Photometer.

2.8 Bestimmung von Interleukin-4 und Interferon- γ im Kulturüberstand

Interleukin-4 (IL-4) und Interferon- γ (IFN) wurden mittels ELISA quantifiziert. Für IL-4 wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (NBS, Huntington, UK). IFN wurde anhand eines bereits etablierten Protokolls gemessen (Watzl et al. 1993).

2.9 Bestimmung der Zytotoxizität und Genotoxizität

Zytotoxizität wurde mittels des Trypanblau-Ausschlußtests bestimmt und die Genotoxizität durch die Mikrogel-Elektrophorese (Pool-Zobel et al. 1994, Kuchenmeister et al. 1997). Hierfür werden die Zellen auf Objektträgern fixiert, lysiert und anschließend einer Elektrophorese unterworfen. Die Längenausdehnung sowie die Fluoreszenzintensität der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA wird mittels Image-Analyzer quantifiziert.

2.10 Bestimmung der intestinalen Permeabilität sowie elektrophysiologischer Parameter

Caco-2 (ATCC) ist eine humane intestinale Tumorzelllinie. Die Zellen (Passage 31-45) wurden in Dulbecco's MEM mit 10 % fötalem Kälberserum auf Polycarbonateinsätzen (Costar, Bodenheim) 14-23 Tage (HgCl₂-Versuch) bzw. 30-45 Tage (WGA-Versuch) kultiviert und anschließend für die Permeabilitätsuntersuchungen eingesetzt. Caco-2-Zellen bilden einen epithelialen Monolayer, der sich aufgrund seiner funktionellen Ähnlichkeiten mit dem humanen intestinalen Epithelium sehr gut für Permeabilitätsstudien eignet (Cogburn et. al. 1991). Vor der Inkubation mit den Testsubstanzen wurde die Integrität jedes einzelnen Monolayers anhand der Messung

des transepithelialen elektrischen Widerstands kontrolliert. Anschließend wurden die Monolayer mit den Testsubstanzen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Als niedermolekularer Permeabilitätsmarker wurde Fluoreszein (0.02%) eingesetzt, welches photometrisch bei 492 nm (Referenzfilter 620 nm) quantifiziert wurde (Shaw et al. 1990). Als makromolekularer Permeabilitätsmarker wurde OVA verwendet, das mittels ELISA quantifiziert wurde (Furrie et al. 1994). Die Permeabilität der Marker wurde in Form eines Permeabilitätskoeffizienten (P) dargestellt:

$$P = (V \times dC/dt)/(A \times C_0)$$

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurde Darmgewebe aus dem Ileum präpariert und in Ussing-Kammern fixiert. Die luminale Seite des Darmes wurde mit verschiedenen Konzentrationen an HgCl₂ exponiert. Kurzschlußstrom (I_{SC}) und Leitfähigkeit (G_I) des Gewebes wurde über einen Zeitraum von 2 h kontinuierlich gemessen (Rechkemmer 1991). Um den Einfluß neurotoxischer Effekte von HgCl₂ zu untersuchen, wurde das Darmgewebe vor der Schadstoffexposition mit dem Neurotoxin Tetrodotoxin behandelt.

3. Ergebnisse

Die Konzentrationen für die *in vivo*-Behandlung mit AFB, HgCl₂ und WGA wurden so ausgewählt, daß sie unter der für eine systemische Wirkung auf das Immunsystem nötigen Konzentration liegen (AFB, WGA) bzw. dieser Konzentration entsprechen (HgCl₂). Für die *in vitro*-Untersuchungen mit HgCl₂ und MeHgCl wurden toxische und subtoxische Konzentrationen eingesetzt, um gezielt unsere Hypothese zu prüfen, ob Hg-Verbindungen die Integrität der Dünndarmbarriere beeinträchtigen können.

3.1 Aflatoxin B₁ (AFB)

3.1.1 Mehrmalige Applikation einer hohen AFB-Dosis (1 mg/kg KG) *in vivo*

In Vorversuchen konnten wir feststellen, daß die einmalige Gabe von AFB (5 mg/kg KG) bereits nach 24 h zu einer vermehrten Expression von Aktivierungsmarkern (CD25, CD71) auf mesenterialen Lymphozyten führt (Watzl et. al. 1994). Ausgehend von diesen Ergebnissen haben wir einen Versuch mit einer mehrfachen Applikation von AFB in einer hohen Dosis (1 mg/kg KG) durchgeführt. AFB wurde einmal wöchentlich mit einer Schlundsonde verabreicht (insgesamt 5 Wochen). Zusätzlich wurde ein Teil der Tiere zum selben Zeitpunkt mit dem Modellallergen OVA (100 mg/Tier) behandelt (insgesamt 5 Wochen), um zu sehen, ob die gleichzeitige Gabe von Schadstoff und Allergen die Immunantwort gegen OVA verstärkt. Einen Tag nach der letzten Behandlung wurden die mesenterialen Lymphozyten isoliert und die Lymphozytensubpopulationen untersucht (Tab. 1).

Tab. 1: Verhältnis von CD4/CD8-Lymphozyten sowie Expression von Aktivierungsmarkern (CD25, CD71) bei mesenterialen Lymphozyten der Ratte (4-7/Gruppe) nach mehrfacher oraler Applikation mit AFB (1 mg/kg KG/Woche) und OVA (100 mg/Woche)

Behandlung	Kontrolle	AFB	AFB + OVA	OVA
CD4/CD8	8.3 ± 0.3	9.0 ± 1.0	7.3 ± 2.1 *	10.7 ± 2.7
CD8 %	5.6 ± 0.9	5.3 ± 0.6	6.8 ± 2.4	4.7 ± 0.7
CD4 mit CD25 %	6.8 ± 0.3	8.2 ± 1.5	7.8 ± 0.7	7.5 ± 1.5
CD8 mit CD25 %	1.4 ± 0.3	1.8 ± 0.3	2.5 ± 1.2	1.2 ± 0.1
CD8 mit CD71 %	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1	2.1 ± 0.6 *	1.4 ± 0.3

* $p < 0.05$ AFB + OVA vs. OVA

Bei den mit AFB + OVA behandelten Tieren zeigte sich eine Verschiebung des CD4/CD8-Verhältnisses zu Gunsten der CD8+-Zellen im Vergleich zur OVA-Behandlung alleine. Gleichzeitig waren vermehrt aktivierte CD71+-T-Lymphozyten nachzuweisen. Die orale Behandlung mit OVA oder OVA + AFB führte bei einem Teil der Tiere zu einer Bildung von spezifischen, gegen OVA gerichteten IgE-Antikörpern. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt (Absorption_{A405nm} OVA 0.35 ± 0.13 ; AFB + OVA 0.45 ± 0.12).

3.1.2 Mehrmalige Applikation einer niedrigen AFB-Dosis (100 µg/kg KG) *in vivo*

Nachdem im ersten Versuch mit einer hohen AFB-Dosis (1 mg/kg KG/Woche) nachgewiesen wurde, daß AFB CD8+-Lymphozyten in den mesenterialen Lymphknoten aktiviert, wurde im zweiten Versuch eine niedrigere und für die Humanexposition relevantere AFB-Dosis (100 µg/kg KG/Woche) eingesetzt. Für diesen Versuchsansatz wurde der Schadstoff einmal wöchentlich (insgesamt 5 Applikationen) per Schlundsonde verabreicht. Zusätzlich wurde an 5 Tagen pro Woche das potentielle Allergen OVA verabreicht. Hierbei wurde OVA in der gleichen wöchentlichen Dosis wie bei dem Versuch mit der einmaligen OVA-Applikation (100 mg/Tier/Woche) eingesetzt, jedoch auf 5 Tage verteilt verabreicht (5 x 20 mg/Tier/Woche).

Bei den mit AFB behandelten Tieren konnte sowohl in den mesenterialen Lymphknoten als auch in der Milz keine Veränderung der CD4+- und CD8+-Lymphozyten festgestellt werden (Tab. 2).

Die Antikörperbildung gegen OVA wurde durch die Behandlung der Tiere mit AFB nicht signifikant beeinflusst (Tab. 3). Die Serumkonzentration an RMCP II (Tab. 3), einer nur von mukosalen Mastzellen gebildeten Protease, sowie Körper-, Milz- und Thymusgewichte waren ebenfalls unabhängig von der Art der Behandlung der Tiere.

Tab. 2: Verhältnis von CD4/CD8-Lymphozyten bei mesenterialen Lymphozyten sowie Milzzellen der Ratte (4-6/Gruppe) nach mehrfacher oraler Applikation mit AFB (100 µg/kg KG/Woche) und OVA (5 x 20 mg/Tier/Woche)

Behandlung	Kontrolle	AFB	AFB + OVA	OVA
		Lymphknoten		
CD4/CD8	4.9	4.0	4.6	4.9
		Milz		
CD4/CD8	1.2	1.0	1.1	1.3

Tab. 3: Serumkonzentration (Absorption_{A405nm}) an anti-OVA-IgE, anti-OVA-IgG und RMCPII (µg/ml) von BN-Ratten (4-7/Gruppe) nach fünfmaliger oraler Applikation von AFB (1 x 100 µg/kg KG/Woche) und OVA (5 x 20 mg/Tier /Woche) (MW ± SD)

	Kontrolle	AFB	AFB + OVA	OVA
anti-OVA-IgE*	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.44 ± 0.20	0.54 ± 0.28
anti-OVA-IgG*	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.88 ± 0.34	0.94 ± 0.35
RMCP II	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.05	0.20 ± 0.04	0.34 ± 0.13

* Serum 1 : 100 verdünnt

Als weiterer immuntoxikologischer Parameter wurde die Fähigkeit der mesenterialen Lymphozyten überprüft, nach Mitogenstimulation zu proliferieren. Hierfür wurden die isolierten Zellen mit dem Mitogen ConA stimuliert und für 120 h inkubiert. Die Behandlung

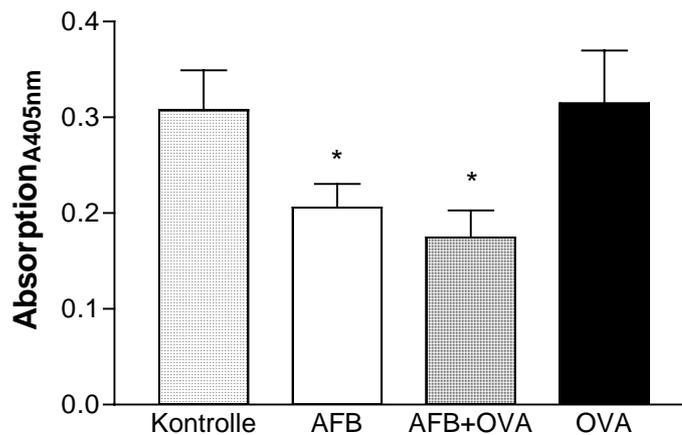


Abb. 1: Proliferation von mesenterialen Lymphozyten (Absorption_{A405nm}) nach Stimulation mit ConA (5 µg/ml) für 120 h. Die Lymphozyten wurden aus BN-Ratten (4-6/Gruppe) isoliert, die mit AFB (1 x 100 µg/kg KG/Woche), OVA (5 x 20 mg/Tier/Woche) oder einer

Kombination von AFB + OVA behandelt wurden (* $p < 0.05$ AFB vs. Kontrolle und AFB + OVA vs. OVA)

mit AFB führte zu einer Hemmung der Proliferation der mesenterialen Lymphozyten, wobei kein Unterschied zwischen der Behandlung mit und ohne OVA zu beobachten war (Abb. 1).

Das TH1-Lymphozyten-spezifische Zytokin Interferon- γ (IFN) wurde im Zellkulturüberstand von mesenterialen Lymphozyten quantifiziert, welche 48 h mit dem Mitogen ConA (5 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert wurden. Die Behandlung der Tiere mit dem Mykotoxin führte zu keiner Beeinflussung der IFN-Synthese (Tab. 4).

Tab. 4: IFN-Konzentration (U/ml) im Kulturüberstand von mesenterialen Lymphozyten nach Stimulation mit ConA (5 $\mu\text{g/ml}$) für 48 h. Die Lymphozyten wurden aus BN-Ratten (4-6/Gruppe) isoliert, die mit AFB (1 x 100 $\mu\text{g/kg KG/Woche}$), OVA (5 x 20 mg/Tier/Woche) oder einer Kombination von AFB + OVA behandelt wurden (MW \pm SD)

Kontrolle	AFB	AFB + OVA	OVA
0.33 \pm 0.19	0.49 \pm 0.05	0.40 \pm 0.21	0.52 \pm 0.24

3.1.3 Zyto- und Genotoxizität von AFB

Um Hinweise für eine direkte toxische Wirkung von AFB auf intestinale Epithelzellen zu bekommen, wurden Vitalität und Genotoxizität (Comet-Assay) von AFB an isolierten Dünndarmepithelzellen der BN-Ratte untersucht. Im Comet-Assay wird die Längenausdehnung der Zell-DNA gemessen, die eine Aussage über den Grad der DNA-Schädigung ermöglicht. Die Inkubation isolierter Dünndarmzellen mit AFB (0 - 150 μM) führte zu keiner Beeinträchtigung ihrer Vitalität (Abb. 2). Im Gegensatz dazu zeigte AFB ab einer Konzentration von 30 μM eine signifikant genotoxische Wirkung, was durch die Längenzunahme der Kometen in der Mikrogelelektrophorese nachgewiesen werden konnte (Abb. 2).

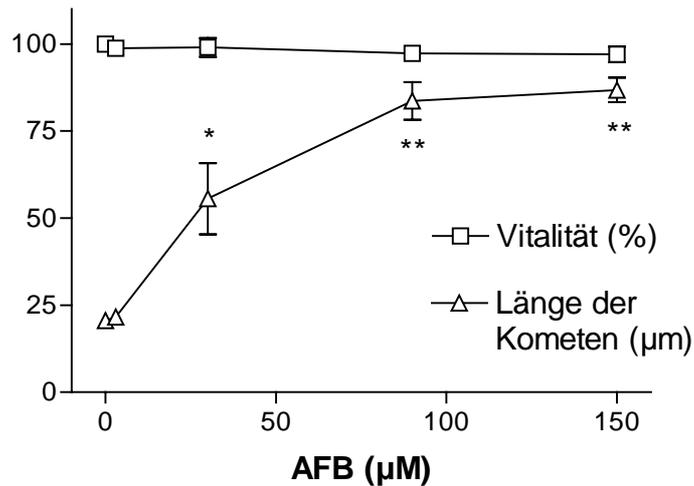


Abb. 2: Zytotoxizität (% Vitalität) und Genotoxizität (Länge der Kometen in µm) von AFB *in vitro* an Dünndarmzellen von BN-Ratten (Inkubationsdauer 30 min, n = 4, MW ± SEM) * p < 0.05, ** p < 0.01

Nachdem *in vitro* eine DNA-schädigende Wirkung durch AFB nachgewiesen wurde, sollte die Genotoxizität von AFB *in vivo*, analog zu dem Versuchsschema mit OVA untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, daß die orale Zufuhr von AFB zu keiner Beeinträchtigung der DNA in den mesenterialen Lymphozyten führt (Abb. 3).

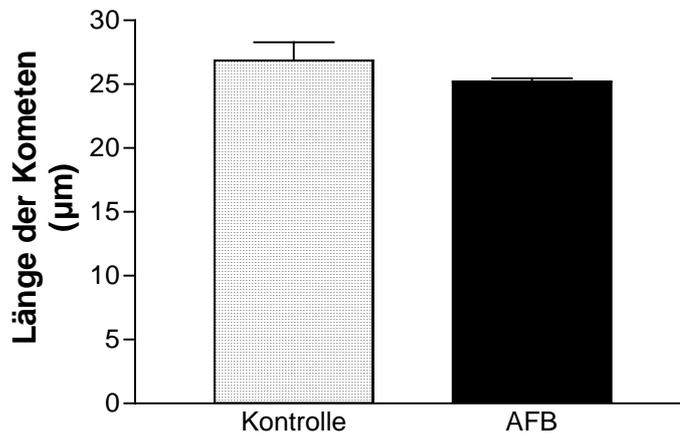


Abb. 3: DNA-Schäden (Länge der Kometen in µm) in Dünndarmzellen nach fünfmaliger oraler Behandlung von BN-Ratten mit AFB (1 x 100 µg/kg KG/Woche) (n = 6, MW ± SEM)

3.2 Quecksilber (Hg)

3.2.1 Zyto- und Genotoxizität *in vitro*

Zur toxikologischen Charakterisierung der eingesetzten Hg-Verbindungen Quecksilberchlorid (HgCl_2) und Methylquecksilberchlorid (MeHgCl) wurden Zytotoxizität (Trypanblau-Ausschlußtest) und Genotoxizität (Comet-Assay) an Dünndarmzellen von BN-Ratten bestimmt. HgCl_2 und MeHgCl erwiesen sich in einer Dosis von 36.8 bzw. 40 μM (entsprechend jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$) als zyto- und genotoxisch (Tab. 5).

Tab. 5: Zytotoxizität und Genotoxizität von HgCl_2 und MeHgCl an intestinalen Zellen von BN-Ratten (Inkubationsdauer 30 min, n = 4-5), MW \pm SD)

HgCl₂ (μM)	Vitalität	Median (μm)	% Zellen		
			< 35 μm	35 - 80 μm	> 80 μm
0	88 \pm 6	20.5 \pm 0.4	86 \pm 6	5 \pm 2	9 \pm 5
9.2	78 \pm 4	22.8 \pm 1.8	71 \pm 4	9 \pm 4	17 \pm 6
18.4	61 \pm 14	50.9 \pm 25.1	46 \pm 16	12 \pm 3	41 \pm 15
36.8	29 \pm 16**	88.5 \pm 8.0**	15 \pm 7**	10 \pm 5	65 \pm 7
MeHgCl					
0	78 \pm 9	21.0 \pm 1.7	80 \pm 9	17 \pm 8	3 \pm 2
10	76 \pm 7	37.9 \pm 25.3	55 \pm 21	21 \pm 13	15 \pm 13
20	70 \pm 13	44.1 \pm 28.6	46 \pm 18	33 \pm 9	22 \pm 18
40	37 \pm 23*	65.1 \pm 14.9**	35 \pm 11**	36 \pm 8	30 \pm 17

* p < 0.05 vs. Kontrolle, ** p < 0.001 vs. Kontrolle

Da für die *in vitro*-Permeabilitätsbestimmungen die Zelllinie Caco-2 eingesetzt werden sollte, und um die Vergleichbarkeit von Primär- und Kulturzellen zu prüfen, wurden Zyto- und Genotoxizität von MeHgCl auch bei dieser Zelllinie gemessen. Caco-2-Zellen unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Kulturdauer deutlich hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens sowie ihres Differenzierungsgrades. Deshalb wurden für diese Untersuchungen Caco-2-Zellen nach einer Kulturzeit von 8, 22 und 36 Tagen eingesetzt. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß MeHgCl bei Caco-2-Zellen eine geringere Zyto- und Genotoxizität besitzt als bei Primärzellen aus dem Dünndarm (Tab. 5 und 6). Die Dauer der Zellkultur hatte keinen Einfluß auf Zyto- und Genotoxizität von MeHgCl (Tab. 6).

Tab. 6: Zytotoxizität und Genotoxizität von MeHgCl bei Caco-2 in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Inkubationsdauer 30 min, n = 4, MW ± SD)

MeHgCl (µM)	Vitalität	Median (µm)	< 35 µm	% Zellen 35 - 80 µm	> 80 µm
		Kulturdauer	8 Tage		
0	89 ± 2	26.3 ± 3.2	89 ± 9	6 ± 6	5 ± 5
10	88 ± 2	29.1 ± 6.8	78 ± 22	9 ± 10	13 ± 13
40	83 ± 3	51.8 ± 24.7	42 ± 27*	21 ± 8	36 ± 23
		Kulturdauer	22 Tage		
0	79 ± 5	24.9 ± 1.7	89 ± 5	5 ± 4	6 ± 2
10	79 ± 6	27.3 ± 1.4	76 ± 5	9 ± 3	14 ± 5
40	76 ± 8	33.0 ± 3.1*	53 ± 5**	20 ± 7	25 ± 6
		Kulturdauer	36 Tage		
0	90 ± 4	26.1 ± 1.7	92 ± 3	3 ± 2	5 ± 1
10	82 ± 4	26.6 ± 1.6	82 ± 3	8 ± 1	9 ± 3
40	81 ± 3	49.5 ± 19.2	40 ± 22**	5 ± 9	34 ± 13

* p < 0.05 vs. Kontrolle, ** p < 0.001 vs. Kontrolle

3.2.2 Zytotoxizität und Genotoxizität *in vivo*

Um zu klären, ob HgCl₂ nach oraler Applikation direkt in die mesenterialen Lymphozyten gelangen können und dort die Immunantwort auf OVA über zyto- und/oder genotoxische Wirkmechanismen moduliert, wurden bei mit HgCl₂ (5 x 0.2 mg/kg KG) *in vivo* behandelten BN-Ratten die mesenterialen Lymphknoten entfernt. Die daraus isolierten Lymphozyten wurden hinsichtlich einer zytotoxischen und genotoxischen Schädigung untersucht. Zusätzlich wurden die intestinalen Epithelzellen (Jejunum) von diesen Tieren isoliert. Die Ergebnisse zeigen, daß die orale HgCl₂-Behandlung an 5 aufeinander folgenden Tagen zu einer genotoxischen Schädigung in den mesenterialen Lymphozyten sowie in den intestinalen Epithelzellen führte (Abb. 4).

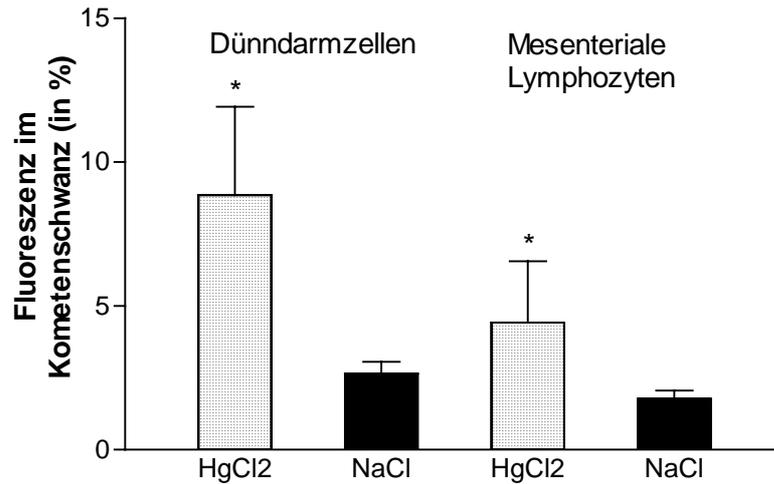


Abb. 4: DNA-Schäden (% Fluoreszenz im Kometenschwanz) in intestinalen Epithelzellen (Jejunum) und in mesenterialen Lymphozyten von BN-Ratten, die mit HgCl₂ (0.2 mg/kg KG/d) oder NaCl an 5 aufeinander folgenden Tagen behandelt wurden (n = 5, * p < 0.05 NaCl vs. HgCl₂)

3.2.3 Einfluß auf die intestinale Permeabilität

Permeabilität des Caco-2-Monolayers für Fluoreszein und OVA:

Caco-2-Zellen wurden auf permeablen Polycarbonatfiltern (Inserts) in Kulturschalen kultiviert. Nachdem sich ein konfluenten Monolayer auf den Inserts gebildet hatte (Transepithelialer elektrischer Widerstand $181 \pm 3.9 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$), wurden die Zellen mit HgCl₂ sowie mit dem niedermolekularen Permeabilitätsmarker Fluoreszein für 2 h inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, daß HgCl₂ konzentrationsabhängig die Durchlässigkeit des Monolayers für Fluoreszein erhöht (Abb. 5). Die Durchlässigkeit für das Makromolekül OVA war jedoch durch HgCl₂ nicht beeinflusst; bei allen Versuchen konnte kein OVA auf der serosalen Seite des Monolayers nachgewiesen werden.

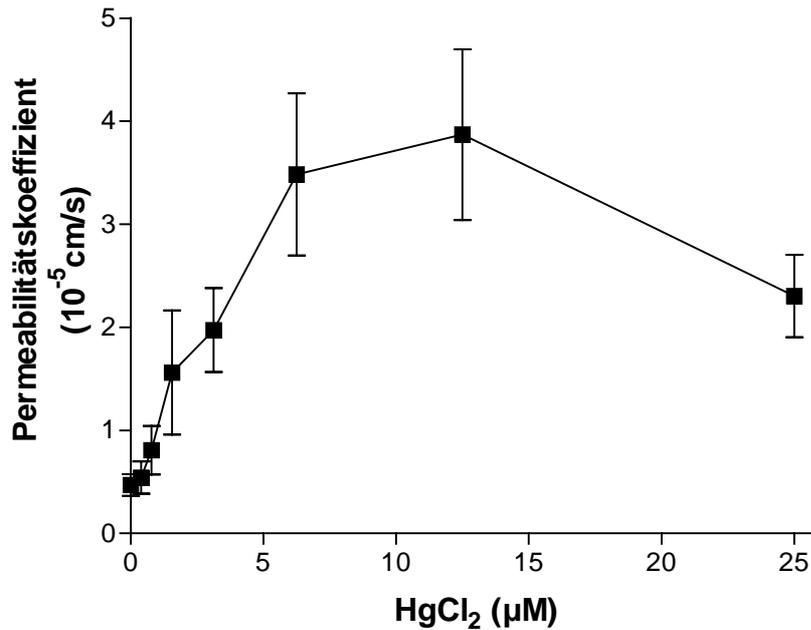


Abb. 5: Einfluß von HgCl₂ auf die Durchlässigkeit eines Caco-2-Monolayers für Fluoreszein

Modulation elektrophysiologischer Parameter des Dickdarms sowie des Caco-2-Monolayers:

Die Wirkung von HgCl₂ auf den Kurzschlußstrom von isolierten Darmsegmenten der SD-Ratte wurde in Ussing-Kammern untersucht. Der Kurzschlußstrom wird durch den Ionentransport im Darmgewebe bestimmt. Bei allergischen Reaktionen im Darm geht die Erhöhung des Makromolekülfluxes mit einem erhöhten Kurzschlußstrom einher. Die Bestimmung des Kurzschlußstroms gibt somit Hinweise auf die Permeabilität des Darmgewebes. Die Versuche zeigen, daß dieser Schadstoff nach *ex vivo* Applikation auf der luminalen Seite des Dickdarms konzentrationsabhängig Kurzschlußstrom (I_{SC}) und Leitfähigkeit (G_i) erhöht (Tab. 7). Um zu klären, ob HgCl₂ über neurotoxische Wirkungen die Permeabilität des Darmgewebes erhöht, wurde 5 min vor der Gabe des HgCl₂ das Neurotoxin TTX auf die serosale Seite des Dickdarmgewebes gegeben. Durch Blockierung der neuronalen Aktivität mit dem Nervengift TTX können neurale Effekte von HgCl₂ von direkten toxischen Effekten auf die Darmschleimhaut unterschieden werden. Die Vorinkubation mit TTX führte zu keiner signifikanten Verringerung der durch HgCl₂ induzierten Erhöhung von Kurzschlußstrom und Leitfähigkeit (Tab. 7).

Tab. 7: Einfluß von HgCl₂ sowie Tetrodotoxin (TTX) auf Kurzschlußstrom (I_{SC}) und Leitfähigkeit (G_t) des Dickdarmgewebes von Sprague-Dawley-Ratten. (Werte sind angegeben als Differenz zum Ausgangswert Δ, MW ± SEM; n = 5)

HgCl ₂ (μM)	10	20	50	50
TTX (μM)	0	0	0	0.1
ΔI _{SC} (μA·cm ⁻²)	10.0 ± 3.3	21.1 ± 8.0	44.0 ± 5.8	37.3 ± 9.8
ΔG _t (mS·cm ⁻²)	1.7 ± 1.0	8.0 ± 3.0	12.0 ± 2.8	17.0 ± 4.6

3.2.4 Immuntoxizität von HgCl₂ (5 x 1 mg/kg KG) bei naiven Tieren

Das für die mehrmalige Applikation von AFB angewandte Versuchsschema wurde auch für die Versuche mit HgCl₂ eingesetzt. Naiven Tieren wurde einmal pro Woche HgCl₂ (1 mg/kg KG/Woche) per Schlundsonde verabreicht (insgesamt 5 mal). Die Behandlung der Tiere beeinflusste nicht deren Körpergewicht sowie deren Milz- und Thymusgewicht. Die orale Applikation von HgCl₂ führte zu einem signifikanten Abfall der CD8+-Zellen und dadurch zu einem erhöhten CD4/CD8-Verhältnis (Tab. 8). Dieser Effekt war unabhängig von der Behandlung mit OVA. Eine verringerte Expression von Aktivierungsmarkern bei CD8+-Zellen wurde nur für den Marker CD71 nachgewiesen.

Tab. 8: Verteilung der Subpopulationen (in %) sowie Expression von Aktivierungsmarkern (CD25, CD71) bei mesenterialen Lymphozyten von BN-Ratten (4-6/Gruppe) nach fünfmaliger oraler Applikation von HgCl₂ (1 x 1 mg/kg KG/Woche) und OVA (5 x 20 mg/Tier/Woche)

	Kontrolle	OVA	HgCl ₂	HgCl ₂ + OVA
CD4	47.7 ± 3.6	50.0 ± 0.9	47.6 ± 2.2	49.2 ± 2.7
CD8	11.2 ± 1.1	11.3 ± 0.6	9.5 ± 1.0*	9.5 ± 0.5**
CD4/CD8	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.2	5.1 ± 0.5*	5.2 ± 0.4**
CD4/CD25	8.1 ± 0.8	8.5 ± 0.5	8.2 ± 0.7	8.1 ± 0.8
CD4/CD71	3.3 ± 0.3	3.9 ± 0.2	3.1 ± 0.5	3.0 ± 0.3
CD8/CD25	3.5 ± 0.7	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.2 ± 0.2
CD8/CD71	5.3 ± 0.3	5.2 ± 0.4	3.1 ± 0.8*	3.1 ± 0.5**

* p < 0.05 vs. Kontrolle , ** p < 0.05 vs. OVA

Die Serumkonzentration der mukosalen Mastzellenprotease sowie die Antikörperbildung gegen OVA wurde durch die HgCl₂-Behandlung nicht beeinflusst. Die Antikörperbildung gegen OVA wurde durch die orale OVA-Gabe induziert und führte nach 28 Tagen zu einer signifikanten Erhöhung der OVA-spezifischen Antikörperkonzentrationen im Serum (Tab. 9).

Zwei Wochen nach Versuchsbeginn war noch keine Induktion der anti-OVA-Antikörper festzustellen (Tab. 9).

Tab. 9: Serumkonzentration an RMCPII ($\mu\text{g/ml}$), anti-OVA-IgE und anti-OVA-IgG (Absorption_{A405nm}) von BN-Ratten (4-6/Gruppe) nach fünfmaliger oraler Applikation von HgCl₂ (1 x 1 mg/kg KG/Woche) und OVA (5 x 20 mg/Tier/Woche; A: 14 Tage nach Versuchsbeginn, B: 28 Tage nach Versuchsbeginn; MW \pm SD)

	Kontrolle	OVA	HgCl₂	HgCl₂ + OVA
RMCPII				
A	0.63 \pm 0.05	0.54 \pm 0.07	0.48 \pm 0.02	0.58 \pm 0.18
B	0.55 \pm 0.08	0.48 \pm 0.10	0.49 \pm 0.11	0.56 \pm 0.14
anti-OVA-IgE*				
A	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.11 \pm 0.04
B	0.10 \pm 0.01	0.65 \pm 0.26	0.09 \pm 0.03	0.71 \pm 0.31
anti-OVA-IgG*				
A	0.09 \pm 0.01	0.16 \pm 0.08	0.09 \pm 0.01	0.33 \pm 0.23
B	0.18 \pm 0.03	1.98 \pm 0.49	0.24 \pm 0.13	2.13 \pm 0.55

* Serum 1:100 verdünnt

Als ein Hinweis für die Aktivierung von T-Helfer-Subpopulationen (TH1) wurde die Sekretion von IFN durch Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten untersucht. Hierfür wurden die Lymphozyten 24 h in Anwesenheit von 100 μg OVA kultiviert und anschließend wurde im Kulturüberstand die Konzentration an IFN bestimmt. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren.

3.2.5 Immuntoxizität einer hohen HgCl₂-Konzentration (1 x 1 mg/kg KG) bei immunisierten Tieren

Da im Modell mit den naiven Tieren kein Einfluß der HgCl₂-Behandlung auf die Immunantwort gegen das Modellallergen festzustellen war, wurde das Allergiemodell weiterentwickelt. Bei diesem Modell wurden die Versuchstiere zunächst mit dem Modellallergen immunisiert. Zwei Wochen später erfolgte die orale Provokation mit dem Allergen. Der Schadstoff wurde 1 h vor der Allergengabe appliziert.

Die einmalige Gabe von HgCl₂ (1 mg/kg KG) eine Stunde vor der oralen Provokation mit OVA resultierte 5 Tage später in einer signifikant erhöhten anti-OVA-IgE-Konzentration im Serum der mit HgCl₂ behandelten Tiere ($p < 0.02$; Abb. 6). Parallel dazu erhöhte sich auch

die anti-OVA-IgG-Serumkonzentration (Absorption $A_{405\text{nm}}$, Tag 19: OVA 0.30 ± 0.09 ; OVA + HgCl_2 0.62 ± 0.09 , $p = 0.024$). Die orale Provokation mit OVA führte nach 4 h bei beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der RMCPII im Serum. Nach weiteren 5 Tagen lag die RMCPII-Konzentration der OVA-Tiere wieder im Bereich der Werte, die vor der oralen Provokation gemessen wurden. Im Gegensatz dazu waren die RMCPII-Konzentrationen bei mit HgCl_2 behandelten Tieren zu diesem Zeitpunkt signifikant erhöht ($p < 0.02$; Abb. 7). Die HgCl_2 -Behandlung beeinflusste aber weder die Proliferation der mesenterialen Lymphozyten noch deren Kapazität, das Zytokin IFN zu sekretieren. Die Quantifizierung der Expression von Oberflächenmolekülen auf Lymphozyten der Milz ergab bei den immunisierten Tieren eine erhöhte Zahl aktivierter CD4^+ -Zellen, wobei kein Unterschied zwischen OVA + HgCl_2 und OVA alleine zu beobachten war (Tab. 10). Bei den mesenterialen Lymphozyten traten signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit OVA + HgCl_2 und den beiden anderen Gruppen auf (Tab. 10).

Tab. 10: Verhältnis von $\text{CD4}/\text{CD8}$ sowie Expression von Oberflächenmolekülen (CD25 , CD71) bei Lymphozyten von immunisierten BN-Ratten (4-8/Gruppe) nach einmaliger HgCl_2 -Applikation (1 mg/kg KG) und anschließender oraler Provokation mit OVA (100 μg / Tier) (Angaben in % der Gesamtleukozyten; Versuchsende 5 Tage nach oraler Provokation)

	Kontrolle	OVA	OVA + HgCl_2
Milz			
CD4/CD8	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.7	0.7 ± 0.1
CD4/CD25	1.8 ± 0.5	$2.9 \pm 0.5^*$	$3.2 \pm 0.7^*$
CD4/CD71	2.9 ± 0.6	3.1 ± 0.9	2.3 ± 0.6
CD8/CD25	2.4 ± 1.9	2.0 ± 0.5	1.9 ± 0.3
CD8/CD71	4.3 ± 1.5	6.4 ± 1.4	4.9 ± 1.3
Mesenteriale Lymphknoten			
CD4/CD8	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.4
CD4/CD25	5.6 ± 0.1	5.8 ± 0.5	$6.7 \pm 1.1^{**}$
CD4/CD71	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.2
CD8/CD25	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.2
CD8/CD71	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.7	1.3 ± 0.7

* $p < 0.05$ vs. Kontrolle, ** $p < 0.05$ vs. Kontrolle und OVA

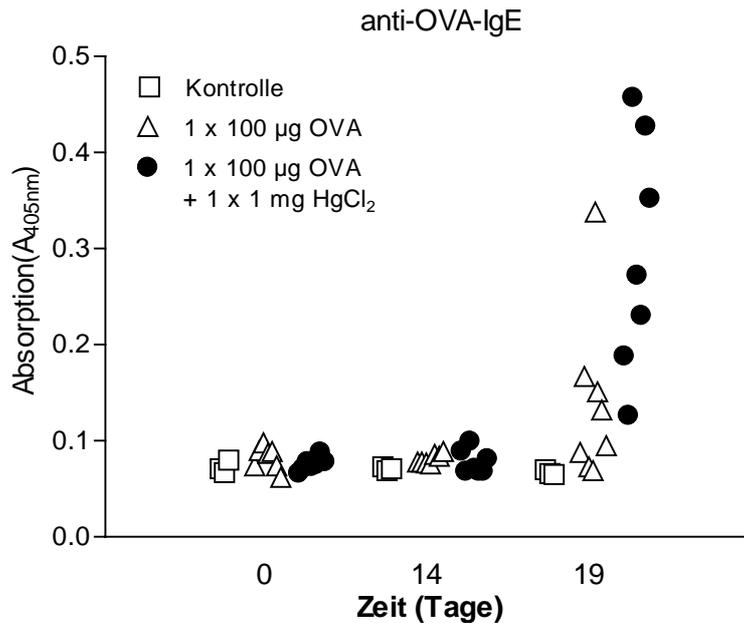


Abb. 6: Anti-OVA-IgE-Serumkonzentration bei immunisierten BN-Ratten. Serum wurde vor der Immunisierung (Tag 0) sowie 4 h (Tag 14) und 5 Tage (Tag 19) nach der oralen OVA-Applikation und der Behandlung mit HgCl₂ (1 x 1 mg/kg KG) an Tag 14 gewonnen.

Die Behandlung mit HgCl₂ beeinflusste weder die Proliferation der mesenterialen Lymphozyten noch deren Kapazität, die Zytokine IFN und IL-4 zu produzieren (Daten nicht aufgeführt).

3.2.6 Immuntoxizität einer niedrigen HgCl₂-Konzentration (5 x 0.2 mg/kg KG) bei immunisierten Tieren

Die mehrmalige Applikation von HgCl₂ in einer niedrigen Dosis (5 x 0.2 mg/kg KG) führte bei 4 von 8 mit HgCl₂ behandelten Tieren 5 Tage nach der oralen Provokation zu einer erhöhten anti-OVA-IgE-Serumkonzentration. Bei den Kontrolltieren zeigte nur eins von 8 Tieren eine Reaktion (Abb. 8). Die Mittelwerte der beiden Gruppen am 19. Tag unterschieden sich jedoch nicht signifikant (Abb.8). Ein im Vergleich zur hohen HgCl₂-Dosis geringerer Effekt der niedrigeren HgCl₂-Applikation zeigte sich auch bei der anti-OVA-IgG-Serumkonzentration (Absorption_{A405nm}, Tag 19: OVA 0.28 ± 0.10; OVA + HgCl₂ 0.48 ± 0.15, p = 0.28). Die Serum-RMCPII-Konzentration am 19. Tag war jedoch signifikant verschieden zwischen den beiden Gruppen (Abb. 9). Die Expression von Oberflächenmolekülen auf mesenterialen Lymphozyten sowie deren Kapazität IFN zu

sekretieren, waren durch die HgCl_2 -Behandlung nicht verändert (IFN-Konzentration: OVA 24.0 ± 0.55 U/ml; OVA + HgCl_2 23.1 ± 0.32 U/ml).

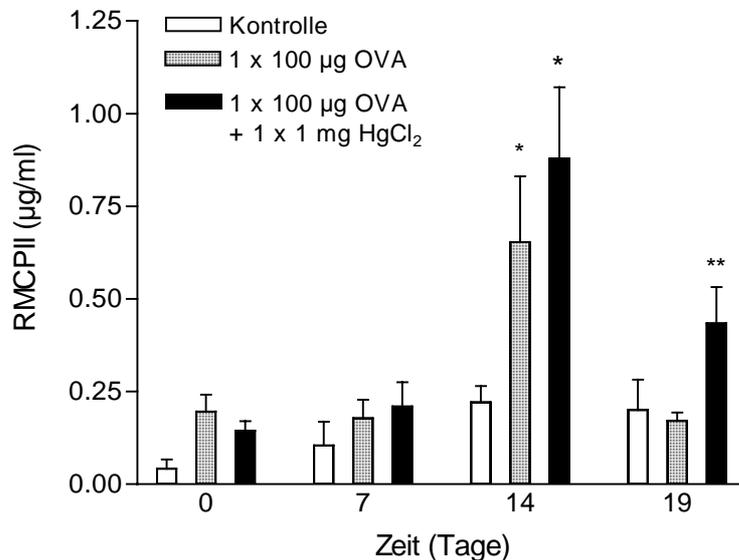


Abb. 7: RMCPII-Serumkonzentration von immunisierten BN-Ratten. Serum wurde vor der Immunisierung (Tag 0) sowie 4 h (Tag 14) und 5 Tage (Tag 19) nach der oralen OVA-Applikation und der Behandlung mit HgCl_2 (1 x 1 mg/kg KG) an Tag 14 gewonnen. (* $p < 0.05$ HgCl_2 und OVA vs. Kontrolle, ** $p < 0.05$ HgCl_2 vs. OVA)

3.3 Weizenkeimagglutinin

3.3.1 Einfluß auf die intestinale Permeabilität

Caco-2-Zellen wurden für 5 Wochen (35 ± 3.5 Tage) kultiviert. Nachdem sich ein konfluenten Monolayer auf den Inserts gebildet hatte (Transepithelialer elektrischer Widerstand $293 \pm 11.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$), wurden die Zellen mit dem Permeabilitätsmarker Fluoreszein sowie mit WGA (0.1, 1.0 und 10.0 mg/ml) für 2 h inkubiert. Die Behandlung mit WGA führte zu keiner Erhöhung der Permeabilität für Fluoreszein (Daten nicht aufgeführt).

3.3.2 Immuntoxizität von Weizenkeimagglutinin bei immunisierten Tieren

Um zu sehen, ob WGA nach mehrfacher oraler Zufuhr die Immunantwort gegen OVA beeinflusst, wurden die Tiere analog zu dem Versuch mit der niedrigen HgCl_2 -Dosis mehrfach mit WGA ($5 \times 10 \text{ mg/Tier}$ entsprechend $5 \times 27 \text{ mg/kg KG}$) behandelt. Nach der oralen OVA-

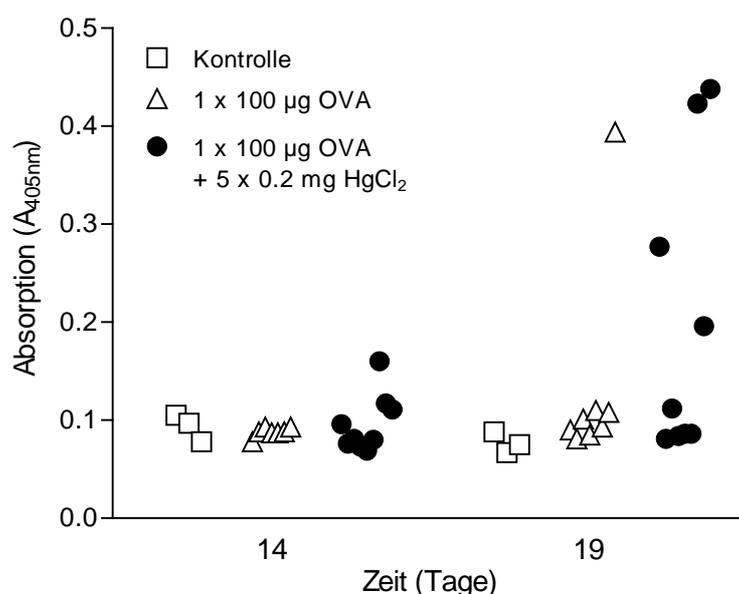


Abb. 8: Anti-OVA-IgE-Serumkonzentration bei immunisierten BN-Ratten. Serum wurde 4 h (Tag 14) und 5 Tage (Tag 19) nach der oralen OVA-Applikation und der Behandlung mit HgCl_2 ($5 \times 0.2 \text{ mg/kg KG}$) an Tag 14 gewonnen.

Applikation (4 h und 5 Tage) wurden die anti-OVA-Serumantikörper bestimmt. Während sich bei den ausschließlich mit OVA behandelten Tieren die anti-OVA-IgE-Konzentration 5 Tage nach der OVA-Applikation signifikant erhöhte gegenüber dem Wert bei Tag 14 ($p < 0.05$), war bei den zusätzlich mit WGA behandelten Tieren zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Anstieg zu beobachten ($p = 0.12$) (Abb. 10). Die anti-OVA-IgG-Konzentration war durch die WGA-Behandlung ebenfalls unterdrückt (Absorption_{A405nm} an Tag 14 und 19: OVA 0.22 ± 0.07 und 0.50 ± 0.09 , $p = 0.02$; OVA + WGA 0.18 ± 0.03 und 0.28 ± 0.09 , $p = 0.34$). Die Serum-RMCPII-Konzentration war am 14. Tag bei den Tieren mit der WGA-Behandlung signifikant erhöht im Vergleich zum Ausgangswert (Abb. 11). Bei den mit OVA behandelten Tieren wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten festgestellt (Abb. 11).

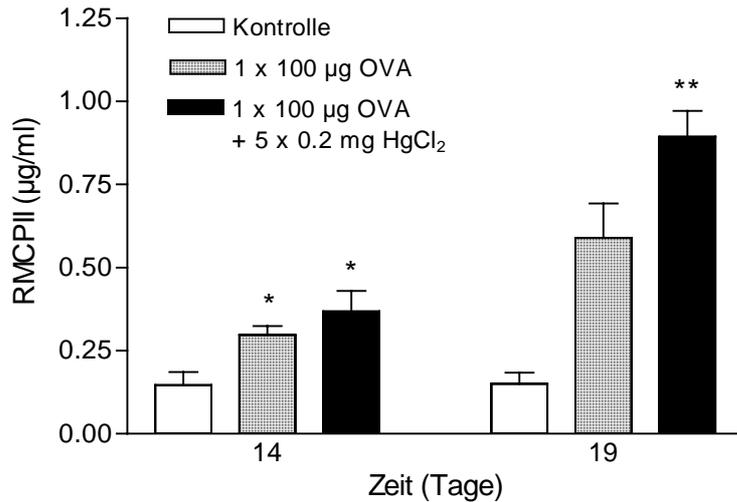


Abb. 9: RMCPII-Serumkonzentration von immunisierten BN-Ratten. Serum wurde 4 h (Tag 14) und 5 Tage (Tag 19) nach der oralen OVA-Applikation und der Behandlung mit HgCl₂ (5 x 0.2 mg/kg KG) an Tag 14 gewonnen. (* p < 0.05 HgCl₂ und OVA vs. Kontrolle, ** p < 0.05 HgCl₂ vs. OVA)

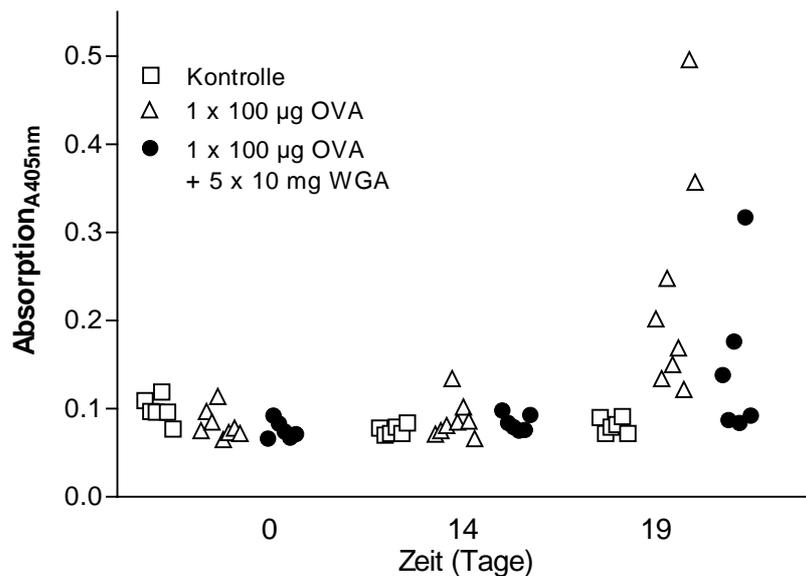


Abb. 10: Anti-OVA-IgE-Serumkonzentration bei immunisierten BN-Ratten. Serum wurde 4 h (Tag 14) und 5 Tage (Tag 19) nach der oralen OVA-Applikation und der Behandlung mit WGA (5 x 10 mg/Tier) an Tag 14 gewonnen.

Die Fütterung der Tiere mit WGA beeinflusste nicht die Proliferationsrate der mesenterialen Lymphozyten. Die Immunisierung alleine bewirkte jedoch bei allen Tieren bereits eine signifikant erhöhte Proliferationsrate (Abb. 12). Im Gegensatz dazu war bei den immunisierten Tieren ein Trend zu einer verringerten IFN-Produktion zu erkennen (OVA vs.

Kontrolle $p = 0.08$; OVA + WGA vs. Kontrolle $p = 0.22$) (Abb. 13). Die Expression von Oberflächenmarkern auf mesenterialen Lymphozyten war durch die WGA-Behandlung nicht moduliert, jedoch war bei den Lymphozyten der Milz bei den mit WGA gefütterten Tieren eine Verringerung der CD8+-Zellen festzustellen. Dadurch war das CD4/CD8-Verhältnis bei diesen Tieren signifikant erhöht (Tab. 11).

Tab. 11: Verhältnis von CD4/CD8 bei Lymphozyten von immunisierten BN-Ratten (5-8/ Gruppe) nach mehrfacher Applikation von WGA (5×10 mg/Tier) und anschließender oraler Provokation mit OVA ($100 \mu\text{g}/\text{Tier}$)

	Kontrolle	OVA	WGA
Lymphknoten			
CD4 %	40.2 ± 2.3	41.4 ± 2.2	40.3 ± 4.2
CD8 %	7.0 ± 1.7	6.3 ± 1.0	7.7 ± 2.5
CD4/CD8	6.1 ± 1.3	6.6 ± 0.9	5.5 ± 2.4
Milz			
CD4 %	41.1 ± 3.9	39.4 ± 4.9	40.7 ± 7.3
CD8 %	42.8 ± 3.5	40.1 ± 6.9	31.0 ± 2.8
CD4/CD8	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2	$1.4 \pm 0.1^*$

* $p < 0.05$ WGA vs. Kontrolle und vs. OVA

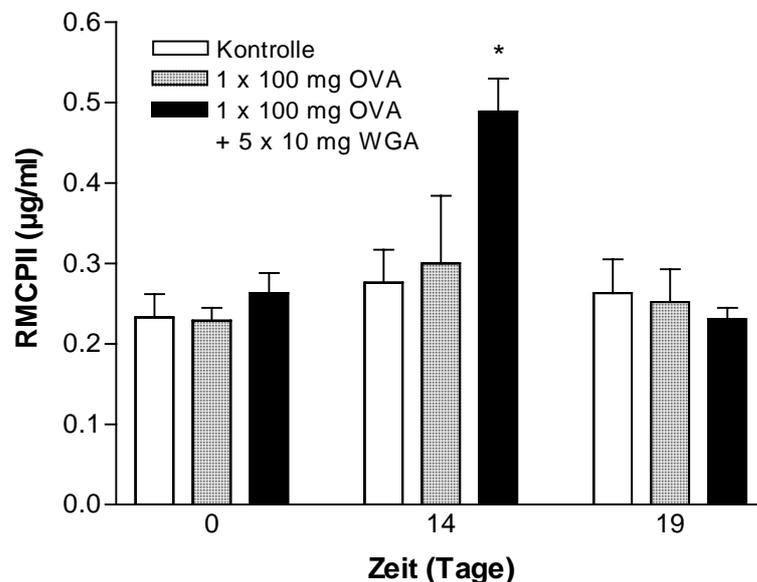


Abb. 11: RMCPII-Serumkonzentration bei immunisierten BN-Ratten. Serum wurde vor der Immunisierung (Tag 0) sowie 4 h (Tag 14) und 5 Tage (Tag 19) nach der oralen OVA-Applikation ($100 \mu\text{g}/\text{Tier}$) und der Behandlung mit WGA (5×10 mg/Tier) an Tag 14 gewonnen (* $p < 0.05$ WGA vs. WGA an Tag 0)

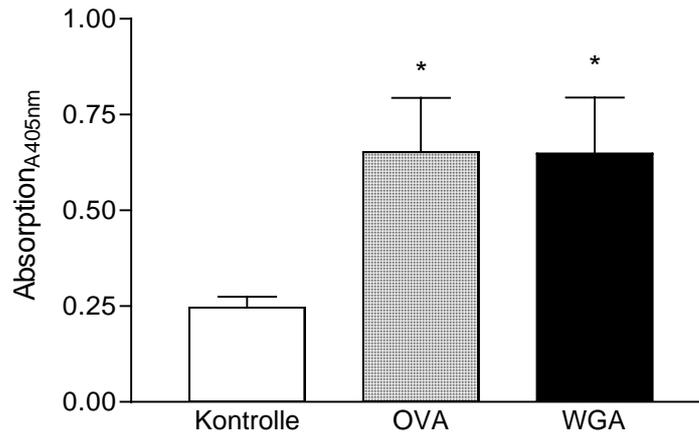


Abb. 12: Einfluß der Immunisierung mit OVA und von der WGA-Behandlung (5×10 mg/Tier) auf die Proliferation mesenterialer Lymphozyten nach oraler Applikation von OVA ($100 \mu\text{g}/\text{Tier}$) ($n = 5-8$, $\text{MW} \pm \text{SEM}$)

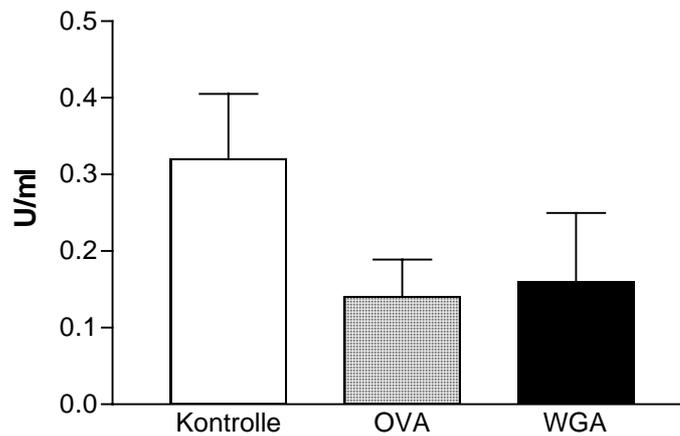


Abb. 13: Einfluß der Immunisierung mit OVA und von der WGA-Behandlung (5×10 mg/Tier) auf die IFN-Produktion mesenterialer Lymphozyten nach oraler Applikation von OVA ($100 \mu\text{g}/\text{Tier}$) ($n = 5-8$, $\text{MW} \pm \text{SEM}$)

Diskussion

Schadstoffe in Lebensmitteln werden als ein möglicher Faktor bei der Auslösung von Lebensmittel-Allergien diskutiert. Über eine Beeinträchtigung der intestinalen Permeabilität sowie über die Modulation immunologischer Prozesse im Darm-assoziierten Immunsystem könnten Schadstoffe die Auslösung von Lebensmittel-Allergien fördern. Bisher fehlen jedoch experimentelle Daten, die solche Schadstoffwirkungen auf den Gastrointestinaltrakt sowie das Darm-assoziierte Immunsystem belegen.

Unter Einsatz von *in vivo*-Allergiemodellen wurde der Einfluß verschiedener, oral applizierter Schadstoffe auf die Auslösung einer Lebensmittel-Allergie untersucht. Als Indikatoren für eine intestinale Anaphylaxie wurden die Aktivierung mukosaler Mastzellen (RMCPII) sowie die Konzentration Allergen-spezifische Antikörper (IgE, IgG) bestimmt. Um Informationen über die Wirkmechanismen der untersuchten Schadstoffe zu gewinnen, wurden funktionelle Immunparameter sowie genotoxische und elektrophysiologische Parameter bestimmt.

In unseren Versuchen mit Mykotoxinen sollte keine chronische Mykotoxinexposition mit einer niedrigen Dosis simuliert werden, sondern die beim Menschen ebenfalls auftretende und für die Toxizität von Mykotoxinen auch sehr bedeutende Kurzzeit-Exposition mit einer hohen Konzentration. AFB wurde als Modellmykotoxin aufgrund der in unseren Vorversuchen beobachteten Aktivierung CD8+-Lymphozyten gewählt, die bereits nach einmaliger Applikation von AFB beobachtet wurde (Watzl et al. 1994). Als "minimal effective oral dose" an AFB mit immunsuppressiver Wirkung gelten 25 µg/kg KG/d (Pier 1991). In unseren Versuchen wurde AFB einmal wöchentlich (1 mg/kg KG oder 100 µg/kg KG) verabreicht, was einer täglichen Dosis von 140 bzw. 14 µg/kg KG entspricht. Die tägliche Aufnahme bei Kindern liegt in Canada, einem Land mit einer sehr niedrigen AFB-Exposition, bei 1-2 ng/kg KG (Kuiper-Goodman 1995). Für die Bundesrepublik dürfte die AFB-Exposition in einem ähnlich niedrigen Dosisbereich liegen. AFB wird hauptsächlich im Dünndarm resorbiert (Kumagai 1989) und gelangt über die mesenterialen Blutgefäße auch in das Darm-assoziierte Immunsystem. Untersuchungsergebnisse über die Wirkungen von AFB auf dieses lokale Immunsystem liegen bisher nicht vor.

Die hohe AFB-Dosis führte zu einem Anstieg der CD8+-Zellen und dadurch zu einer verringerten CD4/CD8-Ratio. In dieser Zellpopulation waren besonders CD8/CD71+-Zellen aktiviert. Daraus kann auf einen CD8-spezifischen Effekt von AFB bei Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten geschlossen werden. Die Tiere unterscheiden sich jedoch nicht hinsichtlich der Bildung von anti-OVA-Antikörpern, was sich mit den Ergebnissen früherer Arbeiten zur systemischen Wirkung von AFB deckt (Pestka und Bondy 1994). Allerdings war die Mitogen-stimulierte Proliferationsrate der mesenterialen Lymphozyten nach AFB-Behandlung signifikant gehemmt. Eine Behandlung mit AFB führte auch zur Hemmung der Proliferation von peripheren Lymphozyten (Raisuddin et al. 1994). Demgegenüber wurde kein Einfluß des AFB auf die IFN-Synthese beobachtet, was dadurch erklärt werden kann, daß dieses Zytokin überwiegend von CD8+-Zellen synthetisiert wird (van der Meide et al. 1993), und AFB diese Zellpopulation nicht beeinträchtigte. IFN ist als Gegenspieler von IL-4 maßgeblich an der Regulation der IgE-Bildung durch B-Lymphozyten beteiligt (Kapsenberg et al. 1996). Durch die Metabolisierung von AFB in der Leber kommt es zur Bildung von AFB-Metaboliten (Neal 1995), die vermutlich für die beobachteten immunmodulierenden Effekte verantwortlich sind. Darauf deuten Ergebnisse von Ko-Kultur-Versuchen hin, bei denen nur bei der gemeinsamen Kultur von Milzzellen mit Hepatozyten eine immunsuppressive Wirkung von AFB festgestellt wurde (Yang et al. 1986).

Die toxikologischen Untersuchungen ergaben, daß AFB *in vitro* in einem Dosisbereich von $\geq 30 \mu\text{M}$ genotoxisch wirkt. Die *in vivo* eingesetzte Dosis von $100 \mu\text{g/kgKG}$ ($0.3 \mu\text{mol/kg}$) führte zu keiner DNA-Schädigung. Eine direkte Schädigung des intestinalen Epithels durch AFB und dadurch Beeinflussung der intestinalen Barriere ist somit wenig wahrscheinlich.

HgCl_2 trägt als Bestandteil von Amalgam-Zahnfüllungen zusammen mit dem alimentären Hg zur Exposition mit diesem Schadstoff bei. Hg-Verbindungen können das systemische Immunsystem und die Durchlässigkeit der Dickdarmwand beeinträchtigen. Inwieweit Hg-Verbindungen das Darm-assoziierte Immunsystem stören und somit die Auslösung von Lebensmittel-Allergien fördern, ist bisher nicht bekannt. Unsere Ergebnisse zeigen, daß HgCl_2 und MeHgCl bei isolierten Dünndarmzellen von BN-Ratten in einem Konzentrationsbereich von 36.8 bzw. $40 \mu\text{M}$ zyto- und genotoxisch wirken. Im Vergleich hierzu ist die Toxizität von MeHgCl bei der intestinalen humanen Zelllinie Caco-2 deutlich geringer, wobei die Kulturdauer der Zellen ohne signifikanten Einfluß auf die Toxizität von

MeHgCl ist. Die geringere toxische Empfindlichkeit der Kulturzellen gegenüber Hg-Verbindungen muß beim Vergleich der Ergebnisse aus unterschiedlichen experimentellen Systemen berücksichtigt werden.

Die parazelluläre Permeabilität des Caco-2-Monolayers für Fluoreszein wird durch HgCl₂ konzentrationsabhängig erhöht. Da HgCl₂ in diesen Konzentrationen nur eine geringe bzw. keine Toxizität besitzt, könnte die Erhöhung der Permeabilität möglicherweise nicht auf eine direkte Schädigung der Zellen, sondern auf eine Beeinträchtigung der tight junctions zurückzuführen sein, wie dies kürzlich für HgCl₂ an Dickdarmgewebe nachgewiesen wurde (Böhme et al. 1992). Die Durchlässigkeit des Monolayers für das Allergen war jedoch durch HgCl₂ nicht beeinflusst. Die Erhöhung des Kurzschlußstroms des Dünndarmgewebes durch HgCl₂ kann teleologisch als eine Abwehrreaktion verstanden werden. Durch die Stimulation der Cl⁻-Ionen-Sekretion wird das Eindringen von HgCl₂ in subepitheliales Gewebe erschwert. Da die Wirkung des HgCl₂ nicht durch TTX gehemmt wurde, kann ein neurotoxischer Wirkmechanismus ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse des Verbundvorhabens zeigen, daß der Schadstoff HgCl₂ (1 x 1 mg/kgKG) die Immunantwort gegen OVA (IgE, IgG) bei immunisierten Tieren stimuliert. Eine Aktivierung mukosaler Mastzellen 4 h nach der oralen Provokation mit OVA konnte sowohl bei unbehandelten als auch bei mit HgCl₂ behandelten Tieren nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß das eingesetzte *in vivo*-Allergiemodell geeignet ist für die Überprüfung derartiger Fragestellungen. Hervorzuheben ist, daß bei den mit HgCl₂ behandelten Tieren die Aktivierung mukosaler Mastzellen auch noch 5 Tage nach der oralen Provokation nachzuweisen war (Watzl et al. 1997). Da die Freisetzung der RMCPII mit einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität einhergeht (Scudamore et al. 1995), könnte die persistierende Aktivierung intestinaler Mastzellen eine erhöhte Aufnahme luminaler Antigene zur Folge haben.

Die mehrfache Applikation einer niedrigen HgCl₂-Dosis, deren Gesamtdosis der einmaligen Applikation entsprach, zeigte deutlich geringere immuntoxische Effekte. 5 Tage nach der oralen OVA-Exposition war der Trend eines Unterschiedes (nicht signifikant) hinsichtlich der OVA-spezifischen Antikörperkonzentration zwischen behandelten und unbehandelten Tieren vorhanden. Die Freisetzung der RMCPII war bei den mit HgCl₂ behandelten Tieren signifikant erhöht.

Die *in vitro*-Inkubation von humanen sowie murinen Lymphozyten mit HgCl₂ erhöht die Proliferationsrate dieser Zellen (Jiang und Möller 1995, Stejskal et al. 1996). In

Untersuchungen an Lymphozyten von *in vivo* mit HgCl₂ (1 mg/kg KG) exponierten Tieren konnten wir keine Stimulation der Zellproliferation beobachten. Ebenfalls unverändert war die IFN-Sekretion. Im Gegensatz zur Verringerung der CD8-positiven Zellen der mesenterialen Lymphozyten nach mehrmaliger Applikation einer hohen HgCl₂-Dosis (5 x 1 mg/kg KG) bei naiven Tieren zeigte hier die einmalige Applikation dieser Dosis keinen Einfluß auf CD8- positive Zellen der Milz sowie der mesenterialen Lymphknoten. Die Expression von Aktivierungsmolekülen auf CD4-positiven Milzzellen war hingegen erhöht. Eine Aktivierung muriner CD4- und CD8-positiver T-Zellen durch HgCl₂ (10 µM, Kulturdauer 5 Tage) konnte kürzlich in *in vitro*-Untersuchungen nachgewiesen werden (Jiang und Möller 1995). Diese Daten weisen darauf hin, daß sich Behandlungsdosis sowie Inkubationszeit auf die Expression der Oberflächenmoleküle auswirken und dies die variablen Ergebnisse teilweise begründen kann.

Zwei mögliche Mechanismen der immuntoxischen Wirkungen von HgCl₂ sind denkbar. (1) HgCl₂ erreicht die intestinalen Lymphknoten und übt direkte, lokale Effekte aus. (2) HgCl₂ erhöht die intestinale Permeabilität für OVA. Wir haben beide Hypothesen überprüft und konnten für den ersten Mechanismus einen Hinweis finden, daß HgCl₂ *in vivo* nach p.o.-Applikation die Lymphozyten direkt erreicht und dort auch zu DNA-Schädigungen führt. Dies unterstützt die *in vitro*-Genotoxizitätsbefunde. Hinweise haben wir ebenfalls für den zweiten vorgeschlagenen Mechanismus erhalten (Watzl et al. 1996). Unsere Untersuchungen zeigen deutlich, daß HgCl₂ die Permeabilität von konfluenten Zellschichten (ab 0,75 µM) bzw. intakten Darmepithelien (10-50 µM) verändern kann. Die von uns untersuchte geringste effektive Dosis war 5 x 0,75 µM/kg KG, wodurch bei aller Vorsicht eines *in vitro*-/*in vivo*-Konzentrationsvergleiches durchaus ähnliche Bereiche vorliegen. Zusammen mit den oben diskutierten Befunden der erhöhten RMCPII-Freisetzung könnte die durch HgCl₂ modulierte Immunantwort auf eine Veränderung der intestinalen Permeabilität zurückzuführen sein.

Die Konsequenz dieser Veränderungen und die Bedeutung der modulierten Parameter sind z.T. noch unklar. So wird z.B. die Bestimmung der Oberflächenmoleküle auf Lymphozyten angewandt, weil deren Modulation sich als sensitiver Marker für immuntoxische Wirkungen erwiesen hat (Luster et al. 1992). Zudem wurde kürzlich diskutiert, eine erhöhte Expression von CD4⁺CD45RO⁺-T-Lymphozyten als prädiktiven Marker einer allergisch induzierten Sofortreaktion einzusetzen (Niggemann et al. 1996). Unsere Untersuchungen konnten bei den immunisierten, einmalig mit HgCl₂ (1 mg/kg KG) behandelten Tieren ebenfalls eine

Aktivierung CD4+-Zellen nachweisen. Die Erhöhung der anti-OVA-Immunantwort zeigt eindeutig, daß Schadstoffe Allergie-induzierte Effekte potenzieren können.

Im Vergleich mit den geschätzten humanen Expositionswerten liegen die hier untersuchten HgCl₂-Mengen deutlich höher. Für die Bewertung der Wirkungen beim Menschen spielen Konzentration und Applikationsschema von HgCl₂ eine wichtige Rolle. Die geschätzte mittlere inhalative Belastung durch Amalgamexposition und durch Lebensmittel liegt bei 8-12 bzw. 12-17 µg/d/Person (Halbach 1995), was im Bereich einer zumutbaren Belastung von 11-17 µg/d liegt (Eneström und Hultman 1995). Aufgrund unserer Ergebnisse entsprechen 200 µg/d/kg KG dem LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level), was unter Zugrundelegung der geeigneten Sicherheitsfaktoren (Faktor 10 für Interspeziesvariabilität, Faktor 10 für Übertragung von LOAEL auf NOAEL) (Warfinge et al. 1995) einer Dosis von 0,2 µg/d/kg KG entspricht. Dadurch ist für den Menschen eine analoge Immunantwort im Bereich der abgeschätzten Humanexposition nicht auszuschließen.

Die Versuche mit WGA sollten klären, inwieweit ein biogener Schadstoff das Darm-assoziierte Immunsystem beeinträchtigt. Im Unterschied zur Dosierung der anthropogenen Schadstoffe wurde WGA in einer Dosierung eingesetzt, die 10-fach über der Menge an Gesamtlektinen lag, die von Menschen bei überwiegend vegetarischer Ernährungsweise aufgenommen wird. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Immunantwort gegen OVA (IgE und IgG) durch die Behandlung mit WGA (5 x 27 mg/kg KG) gehemmt wird. Diese Ergebnisse belegen erstmals, daß Lektine nach oraler Aufnahme die Immunantwort bei immunisierten Tieren beeinflussen können. Bei parenteraler Applikation von Phythämagglutinin wurden in Abhängigkeit vom Applikationsschema sowohl stimulierende als auch suppressive Wirkungen auf die Immunantwort gegen OVA festgestellt (Astorquiza und Sayago 1984). Als weiteren Hinweis für eine Aktivierung des Darm-assoziierten Immunsystems durch orales WGA kann die erhöhte RMCPII-Serumkonzentration interpretiert werden. Sie deutet auf eine Stimulation der mukosalen Mastzellen 4 h nach der oralen OVA-Provokation hin. Nach 5 weiteren Tagen war jedoch keine Aktivierung dieser Mastzellpopulation mehr festzustellen. In vitro stimulierte WGA die Histaminsekretion von peritonealen Mastzellen (Lansman und Cochrane 1980), Lektine wie z.B. ConA waren in diesem Modell jedoch unwirksam. Die Aktivierung der Mastzellen durch Lektine soll über eine Bindung der Lektine an Zucker von IgE-Rezeptoren sowie durch eine direkte Bindung an IgE auf Mastzellen erfolgen (Ferreira et al. 1996).

Die hier vorgelegten Ergebnisse zu den induzierten genotoxischen und immuntoxischen Wirkungen von anthropogenen und biogenen Schadstoffen lassen die Vermutung zu, daß in der Nahrung vorhandene Kontaminanten unter bestimmten Umständen und bei entsprechender individueller Voraussetzung die Immunantwort gegen Allergene modulieren können. Ein bedeutender Faktor hierbei ist die genetische Disposition, da die beobachteten Immuneffekte bei einer Tierspezies ermittelt wurde, die eine besonders hohe Reaktivität gegen Antigene aufweist. Des weiteren zeigen unsere Versuche mit HgCl_2 , daß nur bei immunisierten Tieren eine derartige Modulation der Immunantwort durch HgCl_2 ausgelöst werden konnte. Nicht beantwortet werden konnte durch unsere Versuche, inwieweit eine kombinierte Gabe von Schadstoffen sowie eine chronische Applikation von Schadstoffen, beides sind Faktoren der realen Schadstoffexposition, die beobachteten immuntoxischen Effekte verstärken können.

Literatur

ASTORQUIZA, M.I., SAYAGO, S. Modulation of IgE response by phytohemagglutinin. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 73 (1984) 367-369

BEHRENDT, H.. Grundlagen der Allergie und mögliche Angriffspunkte für Umweltchemikalien. *Allergologie* 12 (1989) 95-99

BIENENSTOCK, J. Neuroimmune interactions in the regulation of mucosal immunity. In: *Immunophysiology of the gut* (eds. Walker W.A., Harmatz, P.R., Wershil, B.K.), Academic Press, New York, S. 171-182

BÖHME, M., DIENER, M., MESTRES, P., RUMMEL, W. Direct and indirect actions of HgCl₂ and methyl mercury chloride on permeability and chloride secretion across the rat colonic mucosa. *Toxic. Appl. Pharmacol.* 114 (1992) 285-292

BRENDLER-SCHWAAB, S.Y., SCHMEZER, P., LIEGIBEL, U., WEBER, S., MICHALEK, K., TOMPA, A., POOL-ZOBEL, B.L. Cells of different tissues for in vitro and in vivo studies in toxicology: compilation of isolation methods. *Toxic. in vitro* 8 (1994) 1285-1302

COGBURN, J.N., DONAVAN, M.G., SCHASTEEN, C.S. A model of human small intestine absorptive cells: 1. Transport barrier. *Pharmaceut. Res.* 8 (1991) 210-2216

ENESTRÖM, S., HULTMAN, P. Does amalgam affect the immune system? A controversial issue. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 106 (1995) 180-203

FERREIRA, R.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVIEIRA, J.T.A., GOMES, J.C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. *Inflamm. Res.* 45 (1996) 442-447

FIOCCHI, A., RIVA, E., MIRRI, P., SIGNORONI, P., GIOVANNINI, M. Exercise-induced anaphylaxis following mold ingestion. *Allergologie* 18 (1995) 409

FURRIE, E., TURNER, M.W., STROBEL, S. A functioning gut associated lymphoid system is necessary for the induction of oral tolerance: SCID mice fail to generate an oral tolerogen after enteral administration of ovalbumin. *Immunology* 83 (1994) 562-570

HALBACH, S. Combined estimation of mercury species released from amalgam. *J. Dent. Res.* 74 (1995) 1103-1109

JIANG, Y., MÖLLER, G. In vitro effects of HgCl₂ on murine lymphocytes. I. Preferable activation of CD4⁺ T cells in a responder strain. *J. Immunol.* 154 (1995) 3138-3146

KAPSENBERG, M.L., HILKENS, C.M.U., JANSEN, H.M., BOS, J.D., SNIJDERS, A., WIERENGA, W.A. Production and modulation of T-cell cytokines in atopic allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110 (1996) 107-113

- KUCHENMEISTER, F., POOL-ZOBEL, B.L., SCHMEZER, P. Genotoxicity of metal compounds in freshly isolated cells from respiratory and gastrointestinal tract from rat and humans. 1997 (Manuskript in Vorbereitung)
- KUIPER-GOODMAN, T. Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicol. Lett.* 82/83 (1995) 853-859
- KUMAGAI, S. Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxic. Appl. Pharmacol.* 97 (1989) 88-97
- LANSMAN, J.B., COCHRANE, D.E. Wheat germ agglutinin stimulates exocytotic histamine secretion from rat mast cells in the absence of extracellular calcium. *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980) 455-458
- LOPEZ, M.C., WATZL, B., COLOMBO, L.L., WATSON, R.R. Alterations in mouse Peyer's patch lymphocyte phenotype after ethanol consumption. *Alcohol* 14 (1997) 107-110
- LORENZSONN, V., OLSEN, W.A. In vivo responses of rat intestinal epithelium to intraluminal dietary lectins. *Gastroenterology* 82 (1982) 838-848
- LUSTER, M.I., PORTIER, C., PAIT, D.G., WHITE, K.L., GENNINGS, C., MUNSON, A.E., ROSENTHAL, G.J. Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18 (1992) 200-210
- MACINTOSH, D.L., SPENGLER, J.D., ÖZKAYNAK, H., TSAI, L., RYAN, P.B. Dietary exposures to selected metals and pesticides. *Environ. Health Perspect.* 104 (1996) 202-209
- McKAY, D.M., CROWE, S.E., BENJAMIN, M., MASSON, S., KOSECKA-JANISZEWSKA, U., WILLIAMS, K., PERDUE, M.H. Neuroimmune amplification and inhibition of mucosal function. In: *Immunophysiology of the gut* (eds. Walker W.A., Harnatz, P.R., Wershil, B.K.), Academic Press, New York, S. 229-240
- VAN DER MEIDE, P.H., DE LABIE, M.D.C.D., BOTMAN, C.A.D., VAN BENNEKOM, W.P., OLSSON, T., ATEN, J., WEENING, J.J. Mercuric chloride down-regulates T cell interferon-gamma production in Brown Norway but not in Lewis rats; role of glutathione. *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 675-681
- NEAL, G.E. Genetic implications in the metabolism and toxicity of mycotoxins. *Toxicol. Lett.* 82/83 (1995) 861-867
- NIGGEMANN, B., BEYER, K., NASERT, S., SCHMITT, M., RENZ, H., WAHN, U. In vivo und in vitro Studien zur Optimierung diagnostischer Verfahren für Nahrungsmittelallergien bei Säuglingen und Kleinkindern mit atopischer Dermatitis. S. 217-224. In: Horsch, F., Friebel, P., Seidel, A., Wiebel, A. (Hrsg.), 5. Statuskolloquium des Projektes Umwelt und Gesundheit, Karlsruhe, FZKA-PUG 22 (1996)
- PELLETIER, L., CASTEDO, M., BELLON, B., DRUET, P. Mercury and autoimmunity. S. 539-552. In: Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E., Kimber, I. (Hrsg.): *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, Raven Press, New York, 1994

- PESTKA, J.J., BONDY, G.S. Mycotoxin-induced immune modulation. S. 163-182. In: Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E., Kimber, I. (Hrsg.): Immunotoxicology and Immunopharmacology, Raven Press, New York, 1994
- PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in food. Trends Food Sci. Technol. 7 (1996) 132-138
- PIER, A.C. The influence of mycotoxins on the immune system. S. 489-497. In: Smith, J.E., Henderson, R.S. (Hrsg.) Mycotoxins and Animal Foods, CRC Press, Boca Raton, 1991
- POOL-ZOBEL, B.L., LOTZMANN, N., KNOLL, M., KUCHENMEISTER, F., LAMBERTZ, R., LEUCHT, U., SCHRÖDER, H.G., SCHMEZER, P. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. Environ. Mol. Mutagen. 24 (1994) 23-45
- PUBLIC HEALTH COMMITTEE. On maximum and guideline levels and on source-directed measures aimed reducing the contamination of food by lead, cadmium and mercury. P-SP-Dec. (1996) 25
- PUSZTAI, A. Plant lectins, Cambridge University Press, Cambridge 1991
- PUSZTAI, A., EWEN, S.W.B., GRANT, G., BROWN, D.S., STEWART, J.C., PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M., BARDOCZ, S. Antinutritive effects of wheat germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. Brit. J. Nutr. 70 (1993) 313-321
- RAISUDDIN, S., SINGH, K.P., ALI ZAIDI, S.I., RAY, P.K. Immunostimulating effects of protein A in immunosuppressed aflatoxin-intoxicated rats. Int. J. Immunopharmac. 16 (1994) 977-984
- RATCLIFFE, H.E., SWANSON, G.M., FISCHER, L.J. Human exposure to mercury: a critical assessment of the evidence of adverse health effects. J. Toxic. Environ. Health 49 (1996) 221-270
- RECHKEMMER, G. Regulation of electrolyte absorption and secretion in the large intestine. Adv. Animal Physiol. Animal Nutr. 22 (1991) 100-110
- SCUDAMORE, C.L., THORNTON, E.M., MCMILLAN, L., NEWLANDS, G.F.J., MILLER, H.R.P. Release of the mucosal mast cell granule chymase, rat mast cell protease-II, during anaphylaxis is associated with the rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum. J. Exp. Med. 182 (1995) 1871-1881
- SHARMA, R.P. Immunotoxicity of mycotoxins. J. Dairy Sci. 76 (1993) 892-897
- SHAW, A.J., CLOTHIER, R.H., BALLS, M. Loss of trans-epithelial impermeability of a confluent monolayer of Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells as a determinant of ocular irritancy potential. ATLA 18 (1990) 145-151

- SJÖLANDER, A., MAGNUSSON, K.E., LATKOVIC, S. The effect of concanavalin A and wheat germ agglutinin on the ultrastructure and permeability of rat intestine. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 75 (1984) 230-236
- SMITH, J.E., LEWIS, C.W., ANDERSON, J.G., SOLOMONS, G.L. *Mycotoxins in Human Nutrition and Health*, European Commission, Agro-Industrial Research Division, Brussels, 1994
- STEJSKAL, V.D.M., CEDERBRANT, K., LINDVALL, A., FORSBECK, M. MELISA - An in vitro tool for the study of metal allergy. *Toxicol. in vitro* 8 (1994) 991-1000
- STEJSKAL, V.D.M., FORSBECK, M., CEDERNBRANT, K.E., ASTEMAN, O. Mercury-specific lymphocytes: Indication of mercury allergy in man. *J. Clin. Immunol.* 16 (1996) 31-40
- TCHERNYCHEV, B., WILCHEK, M. Natural human antibodies to dietary lectins. *FEBS Letters* 397 (1996) 139-142
- WARFVINGE, K., HANSSON, H., HULTMAN, P. Systemic autoimmunity due to mercury vapor exposure in genetically susceptible mice: dose-response studies. *Toxic. Appl. Pharmacol.* 132 (1995) 299-309
- WATZL, B., LOPEZ, M.C., SHABAZIAN, L.M., CHEN, G., COLOMBO, L.L., HUANG, D., WAY, D., WATSON, R.R. Diet and ethanol modulate immune responses in young C57BL/6 mice. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 17 (1993) 623-630
- WATZL, B., POOL-ZOBEL, B.L., HÄNSCH, G.M., KRAMER, M., VETTEL, U., SCHMEZER, P. Lebensmittelinhaltsstoffe: Beziehungen zwischen zytotoxischen, genotoxischen und immuntoxischen Wirkmechanismen. S. 89-100. In: Horsch, F., Friebel, P., Seidel, A., Wiebel, A. (Hrsg.), 3. Statuskolloquium des Projektes Umwelt und Gesundheit, Karlsruhe, FZKA-PUG 17, 1994
- WATZL, B., HÄNSCH, G.M., NEUDECKER, C., POOL-ZOBEL, B.L., RECHKEMMER, G. Einfluß von Quecksilber auf die Integrität der Darmbarriere sowie auf das Darm-assoziierte Immunsystem von BN-Ratten. *Allergo J.* 5 (1996) 41
- WATZL, B., HÄNSCH, G.M., NEUDECKER, C., POOL-ZOBEL, B.L., RECHKEMMER, G. Mercuric chloride stimulates the antibody response in immunized BN rats. *Proceedings of the 16th Int. Congress of Nutrition, Montreal (1997)*, 243
- YANG, K.H., KIM, B.S., MUNSON, A.E., HOLSAPPLE, M.P. Immunosuppression induced by chemicals requiring metabolic activation in mixed cultures of rat hepatocytes and murine splenocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83 (1986) 420-429