

Stiftung zur Förderung
der Erforschung von
Ersatz- und
Ergänzungsmethoden
zur Einschränkung von
Tierversuchen

set



Projekt

Abschätzung der aktiven Anreicherung von Xenobiotika in der Milch mit MDCKII-bABCG2-Zellen: ein neuartiges in vitro-Modell der laktierenden bovinen Milchdrüse

Dr. Sandra Halwachs, Universität Leipzig

06/2014 – 11/2015



3R reduce
refine
replace

Mainzer Landstraße 55
60329 Frankfurt/Main
Telefon 069-2556-1226
www.stiftung-set.de
info@stiftung-set.de

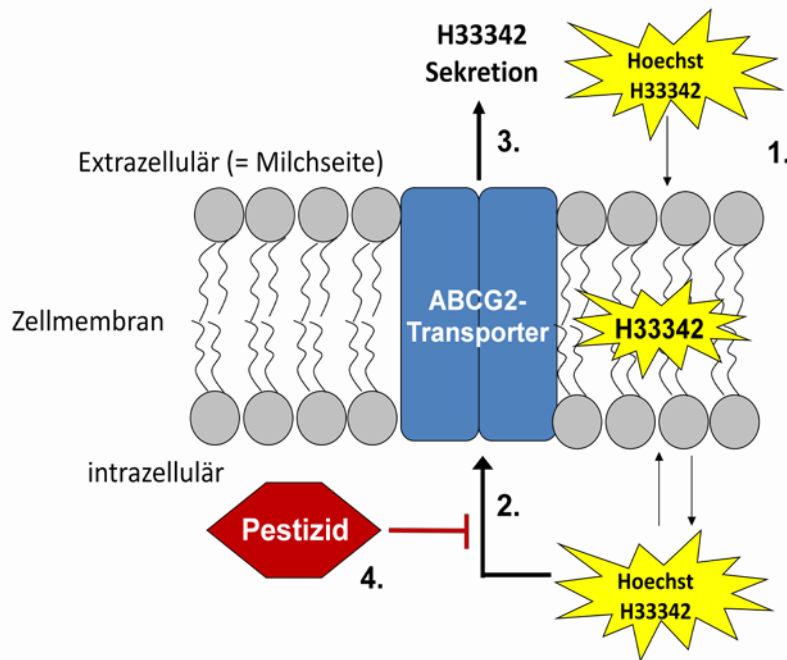
www.stiftung-set.de

Abschätzung der aktiven Anreicherung von Xenobiotika in der Milch mit MDCKII-bABCG2-Zellen: ein neuartiges in vitro-Modell der laktierenden bovinen Milchdrüse

Der breite Einsatz von Pflanzenschutzmitteln (Pestiziden) in der konventionellen Landwirtschaft kann zum Eintrag potentiell gesundheitsschädlicher Chemikalien in die Nahrungskette und zu Rückständen in Lebensmitteln wie der Milch führen. Daher müssen im Zulassungsverfahren toxikokinetische Studien in laktierenden Wiederkäuern durchgeführt und bei Sekretion des Pestizids in die Milch gesundheitlich unbedenkliche gesetzliche Rückstandshöchstmengen (maximum residue levels, MRL) festgelegt werden (Verordnung [EU] Nr. 396/2005). Der organisatorische und finanzielle Aufwand dieser Tierversuche in Form von mehrwöchigen Fütterungsversuchen ist beträchtlich und stellt eine hohe Belastung der Tiere dar.

In der Milchdrüse von Mensch, Nagern und Wiederkäuern wurde das zellmembranständige Protein ABCG2 als zentrales Transportsystem für Chemikalien in die Milch identifiziert. Bisher gibt es jedoch kein mit der In-vivo-Situation vergleichbares adäquates In-vitro-Modell für das Euter milchliefernder Wiederkäuer, mit dem man die aktive ABCG2-vermittelte Anreicherung von Chemikalien wie Pestiziden untersuchen kann. Daher soll in diesem Projekt das in unserem Institut generierte neuartige MDCKII-bABCG2-Zellmodell als effizientes Screeningtool zur Abschätzung der aktiven Konzentrierung von Chemikalienrückständen in der Milch repräsentativ mit häufig eingesetzten Pestiziden etabliert werden.

Die Untersuchungen erfolgen durch Pestizidinkubationen der Zellen in Kombination mit dem etablierten Höchst-Akkumulationstest zur Bestimmung potentieller ABCG2-Pestizidsubstrate. Ferner sollen anhand des Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Enzymassays Dioxin-artige Pestizid-Stimulatoren der ABCG2-Aktivität identifiziert werden. Der Mechanismus einer möglichen ABCG2-Regulation durch Pestizide wird durch molekularbiologische Methoden in Kooperation mit Prof. Dacasto *et al.* untersucht. Von besonderem Interesse sind Kombinationswirkungen von Mehrfachpestizidrückständen im derzeit nicht getesteten Niedrigdosisbereich der gesetzlichen Rückstandshöchstmengen (MRL), wie sie oftmals in Nahrungsmitteln vorkommen. So ist die gesteigerte Milchsekretion eines bABCG2-Pestizidsubstrats durch ein gleichzeitig vorliegendes ABCG2-stimulierendes Pestizid denkbar. Das könnte eine Pestizidanreicherung über die gesetzlichen MRL in der Milch verursachen. Ferner ist eine Interaktion zweier Pestizidsubstrate am ABCG2-Transporter möglich. Dies könnte zu einer verzögerten ABCG2-vermittelten systemischen Substratelimination in die Milch und somit zu erhöhten, potentiell toxischen Pestizidrückständen in essbaren Geweben führen. Diese neuartige In-vitro-Methode könnte insgesamt die Tierversuche in Schafen und Ziegen im Rahmen des Zulassungsverfahrens ergänzen und damit zur Reduktion der dafür bisher notwendigen Tierzahlen beitragen. Die Ergebnisse dieser Studien könnten ferner zu einer Verbesserung der Risikobewertung von Chemikalienrückständen in Lebens- und Futtermitteln beitragen.



Prinzip des Höchst H33342 Akkumulationstests: Die MDCKII-bABCG2-Zellen werden über 3 Tage in 96-well-Zellkulturplatten kultiviert. Um die in vivo-Situation möglichst genau widerzuspiegeln, werden die Zellen am Tag 3 mit Pestizidkonzentrationen entsprechend den ein- oder zehnfachen MRL-Werten in essbaren Wiederkäuergewebe für vier Stunden vorbehandelt. Anschließend werden die Zellen für 15 min mit H33342 (20 μ M) alleine oder in Kombination mit einem Pestizidwirkstoff inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff Höchst H33342 diffundiert grundsätzlich passiv in die MDCKII-bABCG2-Zellen (1.) und reichert sich intrazellulär an (2.). Anschließend wird H33342 aktiv durch ABCG2 aus der Zelle transportiert (3.). ABCG2-Pestizidsubstrate lassen sich im Höchst-Test durch deren Fähigkeit zur kompetitiven Hemmung der ABCG2-vermittelten H33342-Sekretion identifizieren (4.). Dies hat einen Anstieg der zellulären H33342-Gehalte zur Folge, die fluorenszenzspektrophotometrisch (360/465 nm) detektiert werden. Die zelluläre H33342-Akkumulation wird in Relative Fluorescence Units (RFU) pro mg Protein berechnet.

Ergebnisse (Jan 2016)

Im Rahmen der Chemikalienzulassung werden toxikokinetische Studien in laktierenden Wiederkäuern durchgeführt, um potentiell gesundheitsschädliche Rückstände im wichtigen Lebensmittel Milch abzuschätzen. Der ABCG2-Transporter in der Milchdrüse (bABCG2) stellt bekanntermaßen das zentrale Transportprotein für die aktive Milchsekretion von Fremdstoffen dar. Ziel des 3R-Forschungsprojekts war daher die Etablierung der MDCKIIbABCG2-Zelllinie als effizientes Screeningtool zur Abschätzung der aktiven Anreicherung von Chemikalien in der Milch.

In Screeningstudien mittels effizienter Transporter- und Enzymassays wurden repräsentativ ausgewählte Pestizidwirkstoffe in Konzentrationen entsprechend den gesetzlichen Rückstandshöchstmengen (MRL) untersucht. In diesem Projekt wurden dadurch mehrere Pestizide wie das Organophosphat-Insektizid Chlorpyrifos oder der Wachstumsinhibitor Glyphosat als mögliche Substrate oder Modulatoren des bABCG2-Transportproteins identifiziert. Darüber hinaus detektierten wir additive Effekte von Pestiziden wie den Insektiziden Chlorpyrifos-methyl (CPM) und Methiocarb am bABCG2-Transporter. Die detektierten Pestizid-bABCG2-Interaktionen könnten zu einem veränderten bABCG2-vermittelten Pestizidtransport in die Milch und somit zu erhöhten, potentiell toxischen Pestizidrückständen in essbaren Geweben oder der Milch führen. In diesem Zusammenhang ist eine Pestizidanreicherung über die gesetzlichen MRL in der Milch denkbar.

Im Rahmen der Pestizidzulassung sind Studien in laktierenden Wiederkäuern vorgesehen, die den Metabolismus im Tier und potentielle Rückstände der aktiven Substanzen in der Milch untersuchen (OECD Test No. 503: Metabolism in Livestock). Im Sinne des 3R-Konzepts könnte damit das in diesem Projekt etablierte MDCKII-bABCG2-Zellmodell als Prä-Screening-Methode die Tierversuche in Wiederkäuern ergänzen und damit zur Reduktion der dafür bisher notwendigen Tierzahlen beitragen. Die Ergebnisse dieser Studien könnten ferner zu einer Verbesserung der Risikobewertung von Chemikalienrückständen in Lebens- und Futtermitteln beitragen.



Birte Scholz Lydia Kuhnert Cathleen Lakoma Prof. Walther Honscha Dr. Sandra Halwachs

Projektleiterin

Dr. Sandra Halwachs

Jahrgang 1977. Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig 1997-2003. Promotion Dr. med. vet. 2006. Seit Mai 2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.

Leiter der Arbeitsgruppe

Prof. Dr. Walther Honscha

Jahrgang 1959. Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum 1978-84. Promotion Dr. rer. nat. 1988. Habilitation Pharmakologie und Toxikologie 1999. Professur für Veterinärtoxikologie am Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig seit 2001.

Mitarbeiter

Lydia Kuhnert, Tierärztin

Jahrgang 1990. Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig 2008-2014. Seit Mai 2014 Doktorandin im Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig. Die Doktorandenstelle wird freundlicherweise durch die H.-Wilhelm-Schaumann-Stiftung finanziert.

Cathleen Lakoma

Jahrgang 1973. Ausbildung als biologisch-technische Assistentin an der Bundesanstalt für Landwirtschaft Mariensee/Hannover 1989-1993. Universitätsklinikum der Georg-August-Universität Göttingen 1995-2001. Seit 2002 biologisch-technische Assistentin im Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.

Birte Scholz, Dipl. Biol.

Jahrgang 1981. Studium der Biologie an der Universität Rostock 2002-2008. Seit März 2012 technische Assistentin im Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.

Ausführende Institution

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.

Kooperationspartner:

Prof. Mauro Dacasto, Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione
Università degli Studi di Padova, Padua, Italien

Förderlaufzeit

06/2014 – 11/2015