

6. Zusammenfassung

POTTHOFF, L.: In Liposomen integriertes 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl und lymphoide Zellen: Aufnahme und Einfluß auf die Zellproliferation

Polychlorierte Biphenyle (PCB) waren und sind weltweit in großen Mengen verbreitet. Da insbesondere höherchlorierte und teils toxische PCBs nur langsam zu unschädlichen Metaboliten abgebaut werden, ist noch lange Zeit mit Einwirkungen dieser Schadstoffe auf Mensch und Tier zu rechnen. Um die Wirkung der hochlipophilen PCB auf Zellkultursysteme in wässrigem Milieu untersuchen zu können, ist eine Darreichungsform zu wählen, die eine definierte und möglichst hohe PCB-Exposition der Zellen erlaubt, ohne daß durch dabei einzusetzende Lösungsvermittler das Zellverhalten beeinträchtigt wird.

In Liposomen integriert bleiben PCB in wässrigen Systemen in stabiler Verteilung und können von Zellen aufgenommen werden. Die Aufnahmekapazität wird von der für die Zellen verträglichen Liposomenkonzentration begrenzt. Diese wurde für die permanenten Zelllinien K 562 (myeloische Zelle), Jurkat (T-Zelle) und PDe-B-1 (B-Zelle) im Tetrazolium-Farbstofftest (MTT) und für bovine Lymphozyten im Lymphozytentransformationstest (LTT) mit den Mitogenen PWM (Pokeweed mitogen) und SEB (Staphylococcus aureus Enterotoxin B) bestimmt. Darauf aufbauend wurde die Wirkung von 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl (PCB 153) integriert in nicht inhibitorische Liposomenkonzentrationen auf die Zelllinien und Lymphozyten untersucht. In Vorversuchen wurde gezeigt, daß keine erkennbaren Verluste von PCB 153 durch Adhärenz an die Wand der verwendeten Mikrotiterplatten auftraten. Daher konnte mit dem etablierten Mikrotiterplattensystem gearbeitet werden. Auf die Zelllinien konnte mit bis zu 4,4 µg/ml PCB 153 kein Einfluß festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei kooperativen Proliferationsreaktionen von peripheren Blutlymphozyten unter Anwesenheit von PCB 153 eine geringgradige Steigerung bei niedri-

gen Mitogenkonzentrationen und eine geringgradige Hemmung bei hohen Mitogenkonzentrationen. Hier könnte ein Ansatzpunkt für Einwirkungen von PCB 153 auf das Immunsystem liegen.

Die tatsächliche Aufnahme von PCB 153 in Zellen wurde mit der Zelllinie K 562 ermittelt. Dabei wurde das PCB 153 auf verschiedene Weise angeboten:

- In geringer Konzentration in Liposomen integriert
- Vergleichend gelöst in Methanol, stellvertretend für die übliche Verwendung organischer Lösungsmittel
- In möglichst großer Menge integriert in hoher Liposomenkonzentration.

Während das PCB 153 aus dem Methanol nach einer Kinetik 1. Ordnung aufgenommen wurde (ca. 5 % der eingesetzten Menge nach etwa 24 Stunden), erreichte die Aufnahme der geringen Konzentration aus der niedrigen Liposomenkonzentration nur etwa 2 %. Demgegenüber wurde aus den hoch beladenen und in hoher Konzentration eingesetzten Liposomen jedoch mit ca. 18 % der erreichten PCB 153-Konzentration von 5,5 µg/ml Medium absolut und relativ eine vielfache PCB-Menge von den Zellen aufgenommen. Damit konnte ein Weg aufgezeigt werden, mit dem hohe Mengen an PCB gesichert in Zellen eingeschleust werden können, ohne die Zellvitalität durch den Lösungsvermittler zu beeinträchtigen.

7. Summary

POTTHOFF, L.: 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl reconstituted liposomes and lymphoid cells: uptake and effect on cell proliferation

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are wellknown environmental contaminants. The slow degradation of highly chlorinated PCBs leads to their persistence in man and animals. For studying the activity of these extremely lipophilic PCBs in cell culture systems a solubilizer or carrier has to be used which does not depress cell viability itself. Small unilamellar vesicles (liposomes) are able to distribute polychlorinated biphenyls evenly in aqueous solutions and to deliver these lipophilic substances to cells.

The extent is limited by the suitable liposome concentration which was determined for the cell lines K 562, Jurkat, and PDe-B-1 by means of the tetrazolium dye assay. The tolerance of bovine lymphocytes was investigated in the lymphocyte proliferation test. Based on these findings, liposomes containing 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) were added to the cell lines and to lymphocytes in the appropriate concentrations and the effect on viability was measured by means of the tetrazolium dye assay or the lymphocyte stimulation test, respectively. Standard microplates could be used because in preceding experiments no adsorbance of PCB to the plastic ware was found. No influence of up to 4.4 µg/ml PCB 153 on the cell lines tested could be observed. The lymphocytes exhibited small increase in thymidine-uptake when low concentrations of mitogens were added and small decrease in presence of high mitogen concentration. The medium contained up to 1.1 µg/ml PCB 153 integrated in liposomes. These results suggest functional properties of lymphocytes as the possible targets for immunotoxic effects of PCB 153.

The rate of incorporation of PCB 153 by the cell line K 562 was determined for up to 24 - 48 hours comparing three different ways of 'dissolving' PCB 153:

- low PCB 153 concentration incorporated in liposomes
- equal amounts predissolved with methanol as a conventional method
- maximum liposomal PCB 153 concentration incorporated in high amounts of liposomes (5.5 µg/ml medium final PCB 153 concentration)

culture systems.

In the experiment with PCB 153 dissolved in methanol, an equilibrium was reached. At 24 hours the cells contained about 5 % of the administered amount of PCB 153. The uptake of the low PCB 153 concentration from liposomes was significantly reduced with about 2 % at 48 hours. On the other hand, rather high transfer rates from highly loaded liposomes to cells was observed reaching an average of 18 % after 24 hours. Because of these results encapsulating PCBs in liposomes seems to be a suitable method for uptake of PCBs by cells *in vitro*.