

Entwicklung eines Verfahrens zur Identifizierung von toxischen Leitsubstanzen in
komplexen Stoffgemischen und deren genotoxische Wirkungen in
Säugerzellkultursystemen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Peggy Müller

geboren am 21. Mai 1976 in Halle/S.

Gutachter:

1. Prof. Breunig, Halle
2. Prof. Christ, Halle
3. Prof. Speif, Ulm

Halle/S., den 26.09.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009175

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009175>]

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Theoretischer Hintergrund Plasmaverfahren	8
1.2	Analytische und toxikologische Untersuchungen	10
1.2.1	Chemisch-analytische Charakterisierung	10
1.2.2	Toxikologie komplexer Stoffgemische	11
1.2.3	Toxikologie von Einzelsubstanzen des untersuchten komplexen Stoffgemisches.....	13
1.2.4	<i>In vitro</i> Zytotoxizität und Genotoxizität des komplexen Stoffgemisches in unterschiedlichen Säugerzellkultursystemen.....	14
1.3	Zellkultursysteme.....	15
1.4	Aufgabenstellung	16
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte und Materialien	18
2.1.2	Chemikalien, Fertigmedien, Reagenzien.....	20
2.1.3	Medien, Lösungen und Puffer	23
2.1.4	Primer.....	30
2.1.5	Untersuchungsmaterial	31
2.1.6	Zellkultursysteme.....	36
2.2	Methoden	38
2.2.1	Zellkultursysteme.....	38
2.2.1.1	Periphere humane Lymphozyten.....	38
2.2.1.2	Normale humane Bronchialepithelzellen.....	39
2.2.1.3	Rattenhepatozyten	40
2.2.1.4	Schweinehepatozyten	42
2.2.1.5	Konditioniertes Medium von Nichtparenchymzellen der Leber.....	44
2.2.2	Testparameter	45
2.2.3	Das externe Metabolisierungssystem S9-Mix	48
2.2.4	Comet Assay.....	50
2.2.4.1	Alkalischer Comet Assay.....	50
2.2.4.2	Neutraler Comet Assay	53
2.2.4.3	DNA-Reparaturstudien mit Hilfe des alkalischen Comet Assays	53
2.2.5	Mikrokerntest.....	55
2.2.6	Nachweis von Genmutationen	57
2.2.6.1	HPRT-Test.....	57

2.2.6.2	Maus-Lymphoma-Assay.....	60
2.2.7	Bestimmung der Zytotoxizität durch Koloniebildungsfähigkeit.....	66
2.2.8	Bestimmung der Vitalität mittels Trypanblautest.....	67
2.2.9	Statistik.....	67
2.2.10	Ethikvotum	68
2.2.11	Tierversuche.....	68
3	ERGEBNISSE	69
3.1	Untersuchungen zur Identifizierung toxikologischer Leitsubstanzen und genotoxischer Wirkungen des komplexen Stoffgemisches	69
3.1.1	Untersuchungen zum strangbruchinduzierenden Potential des komplexen Stoffgemisches mit Hilfe des alkalischen Comet Assay.....	69
3.1.1.1	Validierung des Auswertesystems mit dem komplexen Stoffgemisch.....	69
3.1.1.2	Induktion von DNA-Strangbrüchen durch fraktioniertes komplexes Stoffgemisch.....	72
3.1.1.3	Identifizierung der Komponenten der Fraktion #3 durch chemisch-analytische Untersuchungen....	77
3.1.1.4	Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Einzelsubstanzen der Fraktion #3.....	78
3.1.1.5	Induktion von DNA-Strangbrüchen durch 2-Komponenten-Modellgemische.....	80
3.1.1.6	Gaschromatographische Überprüfung der 2-Komponenten Modellgemische	81
3.1.2	Untersuchungen zum DNA-Doppelstrangbruch induzierenden Potential des komplexen Stoffgemisches mit Hilfe des neutralen Comet Assay	83
3.1.2.1	Validierung des Testsystems.....	83
3.1.2.2	Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch das komplexe Stoffgemisch in TK6-Zellen.....	84
3.1.2.3	Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch das komplexe Stoffgemisch in humanen Lymphozyten.....	85
3.1.3	Untersuchungen zur Induktion von Chromosomenmutationen mit Hilfe des Mikrokerntests.....	87
3.1.3.1	Validierung des Auswertesystems mit dem komplexen Stoffgemisch.....	87
3.1.3.2	Induktion von Mikronuklei durch Fraktionen des komplexen Stoffgemisches	88
3.1.3.3	Induktion von Chromosomenaberrationen durch Einzelsubstanzen der Fraktion #3.....	89
3.1.4	Untersuchungen zur Reparatur in humanen Lymphozyten.....	90
3.1.4.1	Reparatur nach Applikation von komplexem Stoffgemisch	90
3.1.4.2	Reparatur nach Applikation der Fraktionen.....	92
3.1.4.3	Berechnung der Reparaturkapazität.....	93
3.1.5	Induktion von Genmutationen durch das komplexe Stoffgemisch	95
3.1.5.1	Nachweis von Genmutationen im HPRT-Test	95
3.1.5.2	Genmutationsuntersuchungen mittels Maus-Lymphoma-Assay.....	96
3.1.5.3	Molekulargenetische Analyse von TFT-resistenten Zellen	99
3.1.6	Koloniebildungsfähigkeit.....	102
3.2	Verwendung kryokonservierter primärer Hepatozyten für toxikologische Untersuchungen	103
3.2.1	Optimierung des Protokolls zur Kryokonservierung	103
3.2.2	Kultivierung und Charakterisierung leberspezifischer Eigenschaften kryokonservierter Hepatozyten..	106
3.2.3	Verwendung kryokonservierter Schweinehepatozyten in genotoxikologischen Untersuchungen	115

4	DISKUSSION	116
4.1	Gentoxikologische Untersuchungen	117
4.1.1	Erfassung des DNA-einzelstrangbruchinduzierenden Potentials	117
4.1.2	Erfassung des aberrationsauslösenden Potentials	119
4.1.3	Erfassung des DNA-doppelstrangbruchinduzierenden Potentials	120
4.1.4	Erfassung der Reparaturfähigkeit	120
4.1.5	Erfassung des mutationsauslösenden Potentials	121
4.1.6	Erfassung der Koloniebildungsfähigkeit	124
4.2	Identifikation der toxikologischen Leitsubstanzen	124
4.3	Serumfreie Kryokonservierung von primären Schweinehepatozyten	130
5	ZUSAMMENFASSUNG	133
6	LITERATURVERZEICHNIS	136

Abkürzungsverzeichnis

6-TG:	6-Thioguanin = 2-Amino-6-Mercaptopurin
Abb.:	Abbildung
AFP:	Alpha-Fetoprotein
ALB:	Albumin
AP-Stelle:	Apurinische-, Apyrimidinische Stelle
aqua dest.:	Milliporewasser
ATCC:	American Type Culture Collection
B(α)P:	Benz(α)Pyren
BAT:	Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz Wert
bp:	Basenpaare
BSA:	Bovine Serum Albumin=Rinderserum Albumin
CE:	Klonierungseffizienz
Chr.:	Chromosom
CPS:	Carbamoyl-Phosphatsynthetase
CYP:	Cytochrom P450
DAPI:	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DCM:	Dichlormethan
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
DMEM:	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxy Nukleosidtriphosphate
DSB:	Doppelstrangbruch
EDTA:	Ethylendiaminetetraacetat
EGTA:	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMS:	Ethylmethansulfonat
EROD:	7-Ethoxyresorufin O-deethylase
ext.:	extern
FID:	Flammen-Ionisationsdetektor
FKS:	Fetales Kälberserum
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-MS:	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
GC-MSD:	Gaschromatographie-Massenspektrometrischer Detektor
Glc-6-P:	Glucose-6-Phosphat
GMP:	good manufacturing practise
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HGM:	Hepatocyte growth media=Hepatozyten Wachstumsmedium
HPRT:	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
int.:	intern
ITD:	Ion-Trap-Detektor
L15:	Leibovitz's
LMP:	Low melting point Agarose
LOH:	Lost of heterozygosity=Verlust der Heterozygotie
MAK:	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MEM:	Modifiziertes Eagle Medium
MF:	Mutantenfrequenz
MLA:	Maus-Lymphoma-TK [±] -Assay
MMC:	Magnesiummethoxidmethylcarbonat
M-MLV:	Moloney Murine Leukemia Virus
MMS:	Methylmethansulfonat

NADP :	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-Phosphat
NHBEZ:	Normale humane Bronchialepithelzellen
NMP:	Normal melting point Agarose
n.n.:	nicht nachweisbar
PBS:	Phosphat gepufferte Saline
PB/ β -NF:	Phenobarbital/ β -Naphtoflavon
PCE:	polychromatische Erythrozyten
PCK:	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
PE:	Plattierungseffizienz
PHA:	Phytohämagglutinin
PROD:	Pentoxyresorufin O-dealkylase
RNA:	Ribonukleinsäure
RPMI:	Kulturmedium („Rockwell park memorial institut“)
RT:	Reverse Trinskriptase
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SIM:	selected ion mode, ausgewählter Ionenmodus
SEM:	Standardfehler
SIA:	Semiconductor Industry Association
Tab.:	Tabelle
TFN:	Transferrin
TFT:	Trifluorthymidin
TK:	Thymidinkinase
Tris:	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
TRK:	Technischer Richtwert
UK:	United Kingdom
US:	United States
UW-Medium:	Universität Wisconsin Medium
vgl.:	vergleiche

Alle anderen Abkürzungen wurden SI gerecht verwendet.

Das Schönste, was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle.

Albert Einstein

1 Einleitung

Menschen sind in ihrer Umwelt, im Berufsleben, im Haushalt oder auch in der Freizeit vielfältigen, häufig auch gesundheitsschädlichen und toxischen Expositionen ausgesetzt. Dabei erfolgt die Exposition meist gegenüber komplex zusammengesetzten Stoffgemischen und nicht gegenüber Einzelsubstanzen. Targetorgane für eine Reihe von Substanzen und komplexen chemischen Gemischen sind dabei vorwiegend die Lunge, die Leber und das Immunsystem.

Zu den chemisch-komplexen Gemischen, deren genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist, zählen Beispiele wie Deponieausgasungen, Folgeprodukte pyrolytischer Prozesse, Dieselabgase und nicht zuletzt auch der Zigarettenrauch.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein komplexes Stoffgemisch, seine gaschromatographisch hergestellten Fraktionen, die Einzelsubstanzen und die daraus präparierten 2-Komponenten-Modellgemische untersucht. Dieses komplexe Stoffgemisch entsteht als Abprodukt bei Plasmaätzprozessen in der Halbleiterindustrie und setzt sich aus einer Vielzahl von halogenierten Kohlenwasserstoffen zusammen. Das ausgewählte Gemisch soll beispielhaft für ähnliche komplexe Stoffgemische stehen.

Die Arbeit baut auf den Ergebnissen aus dem Verbundprojekt „Gesundheitliche Risiken durch Plasmaätzprozesse in der Halbleiterindustrie“ (Bauer *et al.*, 1995) und meiner Diplomarbeit "Charakterisierung genotoxischer Wirkungen von komplexen Abproduktgemischen aus Plasmaätzprozessen in unterschiedlichen Säugerzellsystemen" (Müller, 2000) auf. Das Verbundprojekt umfasste 2 Teilgebiete, in denen die Abprodukte chemisch-analytisch und toxikologisch untersucht wurden, während sich die Diplomarbeit mit weiterführenden genotoxikologischen Untersuchungen auf *in vitro*-Ebene in humanen Systemen beschäftigte.

1.1 Theoretischer Hintergrund Plasmaverfahren

In den letzten zwei Jahrzehnten hat sich die Halbleiterindustrie weltweit zu einem der bedeutendsten Industriezweige entwickelt. Der Umsatz der Halbleiterindustrie in der Mikrochipherstellung betrug weltweit 1988 \$ 57 Milliarden (Bauer *et al.*, 1995), im Jahr 2003 \$ 155 Milliarden, das ist eine Steigerung auf 271,9%. Allein im Februar 2004 wurden in der Halbleiterindustrie weltweit \$ 15,78 Milliarden (SIA, 2004b) umgesetzt.

Sehr unterschiedliche Prozessschritte werden in der Halbleiterfertigung für die Herstellung von integrierten Schaltkreisen eingesetzt. Das Ätzen von Leiterbahnen auf Siliziumscheiben, Wafer genannt, ist ein wesentlicher Fertigungsschritt. Heute wird als Ätzverfahren überwiegend das Plasmaätzen eingesetzt. Das verwendete Niederdruckplasma (0,1 – 100 Pa, mit einer Anregungsfrequenz von 13,56 MHz) bewirkt durch die Wechselwirkung von energiereichen neutralen und geladenen Teilchen mit den Schichten der Waferoberfläche eine Strukturierung durch gezielten Materialabtrag. Im Prozessreaktor entstehende Reaktionsprodukte fallen im Vakuum gasförmig an und können so durch Vakuumpumpen über Rohrleitungssysteme entfernt werden.

Die größte Bedeutung haben Plasmaprozesse zurzeit in der Halbleiterfertigung, wo sie in der Photolithographie (Trockenätzprozesse), in CVD-Prozessen (Chemical Vapour Deposition) und verschiedenen Reinigungsoperationen angewandt werden. Das eingesetzte Plasma dient der Bearbeitung organischer, keramischer oder metallischer Schichten. Als Prozessgase werden neben Sauerstoff hauptsächlich die Halogene Chlor, Fluor und Brom, deren anorganische Verbindungen mit Bor, Silizium, Schwefel und Stickstoff sowie die halogenierten Kohlenwasserstoffe Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform und verschiedene Freone verwendet. Diese gewährleisten, daß die Abprodukte primär gasförmig anfallen. Unter den gegebenen energetischen Bedingungen des Plasmas erfolgt die Bildung einer Vielzahl halogener organischer Verbindungen. Diese Verbindungen, mit z. T. hoher toxischer Potenz, kondensieren zu Ablagerungen in den Reaktoren, den Vakuumanlagen und den Entlüftungssystemen bzw. werden über die Abluft emittiert. Herb *et al.*, 1983; Ohlson, 1986; Strang and Levine, 1987 beschreiben erstmals Abprodukte aus Plasmaätzenanlagen. Bauer und Mitarbeiter haben die Zusammensetzung typischer Abproduktgemische und die Reaktionswege, die zu ihrer Bildung führen, näher charakterisiert (Bauer and Wolff, 1997; Bauer *et al.*, 1996; Pelzing, 1994).

Gegenstand der Untersuchungen sind Abprodukte des plasmaunterstützten Ätzens von Aluminium, das als Material für leitende Verbindungen auf Wafern eingesetzt wird. Zu den typischen Aluminiumätzgasen zählen BCl_3 , CHCl_3 , Cl_2 , CCl_4 und N_2 -Beimischungen als inertes Trägergas. Der Einsatz chlorhaltiger Ätzgase gewährleistet die erforderliche Flüchtigkeit der Reaktionsprodukte, die überwiegend als AlCl_3 , $\text{Al}(\text{OH})_3$ und in Form des $\text{B}(\text{OH})_3$ aus BCl_3 entstehen.

Das Chlorangebot und die Kohlenstoffquellen aus den Prozessgasen sowie die organischen Lackbeschichtungen der Wafer, bilden zusammen mit der Plasmaenergie die Voraussetzungen zur Entstehung von chlorierten, organischen Reaktionsprodukten. Diese werden gemeinsam mit unverbrauchten Ätzgasen aus dem Reaktor entfernt. Die Eigenreaktivität der Verbindungen und

das Vorhandensein von katalytisch wirkenden Lewis-Säuren (z.B. BCl_3) führen in Folgereaktionen zu weiteren, thermodynamisch stabileren Produkten.

Moderne Plasmaätzenanlagen sind geschlossene Systeme, aus denen kaum Abprodukte in die Umwelt gelangen können. So teilt die SIA in ihrem Jahresreport 2004 mit, dass alles getan werde, um den größtmöglichen Schutz für die Umwelt und für die Sicherheit und Gesundheit der Mitarbeiter zu gewährleisten (SIA, 2004a).

Aber auch solche Systeme bedürfen regelmäßiger Wartungsarbeiten und sind von Havariesituationen nicht ausgeschlossen. Hier werden die potentiellen gesundheitlichen Risiken für den Menschen gesehen. Bereits Pastides *et al.*, 1988; Rudolph and Swan, 1986 berichteten über erhöhte Abortraten bei Mitarbeiterinnen der Halbleiterindustrie. In jüngster Zeit wurden vor allem von der SIA in Auftrag gegebene Studien zum Krebsrisiko der Mitarbeiter in der Halbleiterindustrie veröffentlicht (Cullen *et al.*, 2001). Cullen und Mitarbeiter kamen in der Beurteilung mehrerer Untersuchungen in Halbleiterwerken (Studien im Auftrag: Health and Safety Executive, UK bzw. IBM, US) zu dem Fazit, dass es anhand dieser Daten im Moment keine positive Beweislage für einen arbeitsplatzabhängigen messbaren Anstieg des Risikos für Krebs oder spezielle Krebsformen in der Halbleiterindustrie gibt. Umgekehrt gibt es aber auch keinen Beweis, der ein erhöhtes Risiko ausschließt. Wichtig für eine Begrenzung der Exposition ist die Erfassung der einwirkenden Stoffe und der realen Konzentration am Arbeitsplatz, besondere Beachtung sollte man komplexen Gemischen zukommen lassen (Cullen *et al.*, 2001).

1.2 Analytische und toxikologische Untersuchungen

1.2.1 Chemisch-analytische Charakterisierung

Bei allen analytisch erfassten organischen Verbindungen aus dem oben beschriebenen Plasmaverfahren handelt es sich um hoch- oder perchlorierte, teilweise stickstoffhaltige Kohlenwasserstoffe. Nachgewiesen wurden aliphatische, offenkettige und cyclische, gesättigte und ungesättigte, aromatische und heterocyclische Verbindungen, häufig mit stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen. Durch die chemischen Analysen wurden Pentachlorpropionitril und Hexachlorbenzol als analytische Leitsubstanzen identifiziert. Diese Stoffe wurden in allen untersuchten Abprodukten regelmäßig in hohen Konzentrationen nachgewiesen und aus diesem Grund als analytische Leitsubstanzen definiert. Zusätzlich fand man in höheren Konzentrationen Chloroform, Trichloracrylnitril, Dichlormethoxytriazin, Hexachlormethylpyrazin, Octachlorcyclopenten sowie 60 weitere chlorierte Verbindungen.

Eine genauere Aufschlüsselung der identifizierten organischen Inhaltsstoffe des untersuchten komplexen Stoffgemisches erfolgt im Kapitel 2.1.5.

1.2.2 Toxikologie komplexer Stoffgemische

Nur wenige der im komplexen Stoffgemisch enthaltenen Einzelverbindungen sind toxikologisch gut charakterisiert, zur Mehrzahl der Verbindungen liegen keine Angaben vor (vgl. 1.2.3). Zudem erfolgten die Testungen der bisher untersuchten halogenierten Kohlenwasserstoffe immer in Form von Einzelkomponenten. Bislang stehen kaum toxikologische Daten zu Stoffgemischen zur Verfügung.

Auch White, 2002 betont in seinen Untersuchungen zu komplexen Gemischen aus polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, dass eine Risikobewertung von komplexen Umweltproben darunter leidet, dass nur unzureichende Literaturdaten zur Toxizität der einzelnen Komponenten vorhanden sind und ein Mangel an Wissen über das Verhalten der Substanzen im komplexen Gemisch besteht. Das Informationsdefizit über die Verhaltensweisen der toxischen Substanzen im Gemisch resultiert aus der Annahme, dass sich die erwarteten Effekte der Einzelsubstanzen im Gemisch summieren, d.h. keine synergistischen oder antagonistischen Effekte auftreten (EPA, 1989). Obwohl diese Annahme durch die Untersuchungen zur allgemeinen Toxizität unterstützt wird (Malich *et al.*, 1998; McCarty and Mackay, 1993; Smyth *et al.*, 1969; Swartz *et al.*, 1995), beschreibt die Literatur das Verhalten von gentoxischen Substanzen in komplexen Gemischen karg und zeitweise widersprüchlich. In einigen Arbeiten wird postuliert, dass kombinierte Effekte von gentoxischen Substanzen in einfachen Gemischen (mit zwei oder drei Komponenten) oft eine Addition darstellen (Somani *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu, kommen andere Untersuchungen zu dem Schluss, dass kombinierte Effekte nicht die bloße Summation einzelner Substanzeffekte darstellen. Zum Beispiel haben Ogawa *et al.*, 1985 gezeigt, dass die Kombination von Quercitin mit aromatischen Aminen größere Effekte als die erwartete Summe der Effekte der einzelnen Komponenten hervorruft (Synergismus). Umgekehrt fand Salamone *et al.*, 1979, dass die Mutagenität einer Mixtur, die Benz(α)Pyren (B(α)P) und Benz(rst)pentaphen enthält, weniger als die erwartete Summe der Effekte auslöst (Antagonismus). Einige Autoren (Donnelly *et al.*, 1990; Hermann, 1981) haben auch demonstriert, dass viele nicht-mutagene Substanzen (z.B. Anthrazen, Naphthalen) die Effekte von mutagenen Substanzen (z.B. B(α)P) modulieren können (Verstärkung oder Minderung).

Auch in einer Studie für die Enquête-Kommission des Deutschen Bundestages von Bolt *et al.*, 1993 wird beschrieben, dass es bei Expositionen gegenüber Stoffgemischen häufig zum Auftreten von Kombinationswirkungen kommt.

Laut Feron *et al.*, 1995 gehört die Evaluierung chemischer Gemische zu den Hauptaufgaben der Toxikologie. Die Autoren fordern daher in ihrem Artikel „Toxicology of chemical mixtures:

challenges for today and the future” schon 1995 für die Zukunft eine schrittweise Substitution der unrealistischen Einzelkomponenten-orientierten Untersuchungen hin zu realistischen (lebensorientierten) gemischbezogenen Untersuchungen. Aus diesem Grund erscheint es besonders wichtig, Verfahren und Modelle zur Erfassung von toxikologischen / gentoxikologischen Leitsubstanzen und Kombinationswirkungen in chemisch-komplex zusammengesetzten Gemischen zu entwickeln. Dabei definiert man den Stoff als toxikologische Leitsubstanz, der in den toxikologischen Untersuchungen am häufigsten Schäden verursacht.

Aus der chemisch-analytischen Zusammensetzung des in dieser Arbeit untersuchten Gemisches sind Interaktionen mit großer Sicherheit zu erwarten. Die folgenden Möglichkeiten sind denkbar:

- Die Wirkung einer Verbindung wird in Anwesenheit einer zweiten abgeschwächt (Antagonismus).
- Die Wirkung einer Verbindung wird in Anwesenheit einer zweiten Verbindung verstärkt (Synergismus).

Es wäre theoretisch auch denkbar, dass sich

- die einzelnen Verbindungen in keiner Weise beeinflussen, d. h., sie wirken unabhängig voneinander.

Im Organismus können Kombinationswirkungen durch die Resorption und Biotransformation infolge veränderter enzymatischer und nichtenzymatisch vermittelter Reaktionen zustande kommen.

Ältere Übersichten über verfügbare Konzepte und Methoden zur Toxizitätstestung komplexer Gemische wurden vom „Committee on Methods for the In Vivo Toxicity Testing of Complex Mixtures“ des National Research Council (USA) in einer Monographie zusammengestellt (NRC, 1988) sowie von Cassee *et al.*, 1998 publiziert.

Zu den bekannten akuten und chronischen Wirkungen halogener Kohlenwasserstoffe zählen u. a. Leberschädigungen, Nervenschädigungen sowie kanzerogene und mutagene Wirkungen.

Die Resultate aus den früheren toxikologischen Analysen des in dieser Arbeit untersuchten komplexen Stoffgemisches aus halogenierten Kohlenwasserstoffen im Rahmen des Verbundprojektes „Gesundheitliche Risiken durch Plasmaätzprozesse in der Halbleiterindustrie“ (Bauer *et al.*, 1995) führten zu der Einschätzung, dass die Vielstoffgemische aus Plasmaätzprozessen über ein schwaches bis mittleres allgemeintoxisches und über ein erhebliches gentoxisches und embryotoxisches Potential verfügen.

Im zitierten Verbundprojekt zielten die toxikologischen Untersuchungen im Tierexperiment auf die Targetorgane Leber, Herz, Niere, Magen und Lunge. Im gentoxikologischen Bereich wurden *in vivo* in Eukaryonten erhöhte Werte an Schwester-Chromatid-Austauschen, Chromosomenaberrationen und erhöhte Mikrokernraten in polychromatischen Erythrozyten der Ratte erfasst. Auch der Flügelmosaiktest an *Drosophila* zeigte eine deutliche gentoxische Wirkung des untersuchten komplexen Stoffgemisches. Im Ames-Test wurden erhöhte Rückmutationsraten bei Prokaryonten beobachtet (Bauer *et al.*, 1992a; Bauer *et al.*, 1996; Bauer *et al.*, 1992b).

1.2.3 Toxikologie von Einzelsubstanzen des untersuchten komplexen Stoffgemisches

Die beobachteten Wirkungen des komplexen Stoffgemisches lassen sich nicht zwangsläufig aus den vorliegenden chemisch-analytischen Daten erklären. Die Wirkschwellen für toxische Effekte der Verbindungen mit bekannter Wirkung, wie Tetrachlorethylen und Hexachlorbutadien-1,3 (Gruppe 3B mit begründetem Verdacht auf ein kanzerogenes Potential (DFG, 2003) oder Hexachlorbenzol (nach TA Luft zu behandeln wie krebserzeugende Stoffe Klasse 4), liegt z. T. erheblich oberhalb der in unserem Gemisch analytisch nachgewiesenen Werte (vgl. Tab. 3).

Zu den bekannten Wirkmechanismen halogener Kohlenwasserstoffe gehören zum einen Membranschädigungen durch die Bildung freier Radikale, die in die Fettsäuresynthese eingreifen. Diese Radikale sind auch in der Lage, kovalente Bindungen mit den Nucleinsäuren, insbesondere mit den Nucleobasen, einzugehen und dadurch die DNA zu schädigen. Weitere DNA-Veränderungen entstehen durch die Initiation hochreaktiver Intermediate der halogenierten Kohlenwasserstoffe nach Kopplung an Glutathion und weiteren enzymatischen Schritten. Zum anderen führt die Bildung von Kohlenmonoxid zur Blockierung des Hämoglobins. Zusätzlich zählen mutagene und kanzerogene Effekte durch die Bildung von Epoxiden zu den bekannten Wirkungen halogener Kohlenwasserstoffe. Epoxide sind Moleküle, die bei ausreichender elektrophiler Reaktivität spontan mit den nukleophilen Zentren der DNA reagieren (Forth *et al.*, 2001).

Für komplexe Stoffgemische gibt es keine MAK-, BAT-, TRK – Werte oder andere Grenzwerte. Diese gelten stets für einzelne Substanzen. Von den analytisch erfassten Verbindungen des Gemisches sind einige wenige in der MAK-Liste und in den gesetzlichen Regelungen zum Immissionsschutz enthalten. Daraus lassen sich aber keine Richtwerte für komplexe Gemische ableiten. In der MAK-Liste sind folgende Stoffe enthalten (DFG, 2003):

- Hexachlorbenzol, BAT-Wert: 150 mg/l, es besteht die Gefahr der Hautresorption, kanzerogen nach 4, fruchtschädigend nach D
- Hexachlorbutadien, kein MAK-Wert, es besteht die Gefahr der Hautresorption, kanzerogen nach 3B
- Hexachlorcyclopentadien, kein MAK-Wert, es besteht die Gefahr der Hautresorption
- Hexachlorethan, MAK-Wert: 1 ml/m³
- Pentachlorethan, MAK-Wert: 5 ml/m³

Zur überwiegenden Zahl der Komponenten sind überhaupt keine toxikologischen Daten veröffentlicht oder es sind nur sehr alte Literaturdaten verfügbar. Insbesondere zu den stickstoffhaltigen Verbindungen fehlen derartige Angaben.

1.2.4 *In vitro* Zytotoxizität und Gentoxizität des komplexen Stoffgemisches in unterschiedlichen Säugerzellkultursystemen

Die im Tiermodell erfassten Effekte gaben ein allgemeines Bild über das gentoxische Potential des hier untersuchten komplexen Gemisches, erlaubten jedoch keine konkreten Aussagen zur Art der Schädigung der DNA. Außerdem waren die Ergebnisse aus den *in vivo*-Systemen nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar. Hierzu bedurfte es laut McGregor, 1990, weiterführender Untersuchungen auf *in vitro*-Ebene in humanen Systemen. Diese Untersuchungen waren Gegenstand meiner Diplomarbeit (Müller, 2000), auf der die vorliegende Arbeit aufbaut.

Ausgehend von den Ergebnissen der durchgeführten Zytotoxizitäts- und Vitalitätstests zu Beginn meiner Diplomarbeit wurden die Parameter für die Testung der Gentoxizität des komplexen Stoffgemisches (Behandlungsroutine, Testkonzentrationen, Behandlungszeitraum) festgelegt.

Während der *in vitro*-Charakterisierung durch Gentoxizitätstestung (Comet Assay und Mikrokerntest) wurden Informationen zur DNA-Schädigung in Rattenhepatozyten, humanen Lymphozyten und humanen Bronchialepithelzellen gewonnen.

Im Verlauf der Gentoxizitätstestung gelang es mit Hilfe des Comet Assays an tierischen und vor allem an humanen Primärzellkulturen, den Nachweis der konzentrationsabhängigen Auslösung von DNA-Einzelstrangbrüchen zu erbringen und damit einen wichtigen Hinweis auf die molekularen Ursachen für die tierexperimentell erhobenen Befunde zur Gentoxizität des Stoffgemisches zu erhalten.

Auch die konzentrationsabhängige Induktion von Chromosomenaberrationen in humanen Lymphozyten, die durch signifikant erhöhte Mikrokernraten belegt wurde, ist ein weiterer Beweis für das vom komplexen Stoffgemisch ausgehende genotoxische Gefährdungspotential für den Menschen.

Es konnte gezeigt werden, dass der alkalische Comet Assay an humanen Lymphozyten, NHBEZ und Rattenhepatozyten eine äußerst empfindliche Methode zum Nachweis von DNA-Schäden in Einzelzellen ist und in Kombination mit dem *in vitro*-Mikrokerntest an humanen Lymphozyten Aussagen zum genotoxischen Gefährdungspotential komplexer Stoffgemische ermöglicht.

1.3 Zellkultursysteme

Bei den ausgewählten *in vitro*-Systemen handelt es sich neben Primärzellkulturen um eine humane und eine tierische Tumorzelllinie, die aufgrund der Anforderung spezieller Genmutationstests eingesetzt werden mussten (vgl. 2.2.6). Als Primärzellkultursysteme kamen die schon zuvor erfolgreich eingesetzten humanen Lymphozyten und die normalen humanen Bronchialepithelzellen sowie zwei tierische Primärzellkultursysteme zum Einsatz: die schon verwendeten Rattenhepatozyten und kryokonservierte Schweinehepatozyten. Diese Untersuchungen an Leberzellen wurden auf Grund der besonderen metabolisierenden Fähigkeiten der Hepatozyten gewählt, über die andere primäre Zellkultursysteme nur unzureichend verfügen.

Die Auswahl der Zellkultursysteme erfolgte entsprechend der Zuordnung der Toxizität einer Reihe von Substanzen und komplexen chemischen Gemischen zu entsprechenden Targetorganen.

Die Primärzellen wurden ausgewählt, weil sie im Vergleich zu Tumorzelllinien über physiologisch relevante Spezifität und Sensibilität verfügen.

1.4 Aufgabenstellung

Das komplexe Stoffgemisch aus halogenierten Kohlenwasserstoffen, welches als Abfallprodukt während der Plasmaätzverfahren in der Halbleiterindustrie entsteht, verursacht sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gentoxische Schäden.

Die Hauptaufgabe der Arbeit bestand darin, die toxikologischen Leitsubstanzen in dem untersuchten komplexen Stoffgemisch zu ermitteln. Dazu sollten zuerst die durch GC-MS Technik hergestellten Fraktionen des komplexen Stoffgemisches auf ihr strangbruch-induzierendes Potential mit Hilfe des alkalischen Comet Assays und auf das Chromosomenaberrationen-auslösende Potential mittels Mikrokerntest untersucht werden. Im Anschluss sollten die Komponenten der Fraktion mit den meisten Hinweisen auf gentoxische Effekte in den gleichen Testsystemen geprüft werden.

Die begleitende Analytik sollte die Basis für die Herstellung von Modellgemischen bieten sowie mögliche lagerungsbedingte Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Fraktionen aufzeigen.

Um die Kombinationswirkungen der Einzelkomponenten des komplexen Stoffgemisches aufzuklären, sollten 2-Komponenten-Stoffgemische aus den Einzelsubstanzen des komplexen Stoffgemisches hergestellt werden und auf ihr strangbruch-induzierendes Potential im Comet Assay getestet werden.

Die Untersuchungen zur Reparatur der DNA-Strangbrüche in humanen Lymphozyten sollten die biologische Relevanz der im Comet Assay nachgewiesenen Effekte sowie die Sensitivität des verwendeten Protokolls aufzeigen.

Die Ergebnisse zur Gentoxizität des untersuchten komplexen Stoffgemisches sollten durch den Einsatz neuer Testsysteme verifiziert werden, um weitere Rückschlüsse auf die Art der Schädigungen der DNA der Zellen ziehen zu können. Hierzu sollte das Spektrum der durch das komplexe Stoffgemisch induzierten Mutationen im Maus-Lymphoma-TK^{+/-}-Assay molekulargenetisch analysiert werden.

Zur Erfassung strangbruchinduzierender Eigenschaften des komplexen Stoffgemisches sollte ein zusätzliches Primärzellsystem neu etabliert werden, bei welchem auf den Zusatz von S9-Mix verzichtet werden kann. Entsprechend der Targetorgane der Toxizität und Ergebnissen aus früheren Untersuchungen sollte ein Protokoll zur serum-freien Kryokonservierung von Schweinehepatozyten und zur anschließenden Kultivierung der Zellen entwickelt werden. In diesem Rahmen sollten leberspezifische Eigenschaften, wie Proliferationsfähigkeit,

Fremdstoffmetabolismus, die Harnstoffproduktion und die Expression leberspezifischer Gene validiert werden. Die kryokonservierten Hepatozyten sollten auf den Einfluss toxischer Substanzen im Rahmen des in dieser Arbeit untersuchten komplexen Stoffgemisches hin untersucht werden. Es sollte die Eignung der Zellen für den Einsatz im Comet Assay und seine Fähigkeit zur Generierung reproduzierbarer Ergebnisse mit Gemischen verschiedener chemischer Zusammensetzung überprüft werden.

Ein weiteres Ziel war die Validierung aller hier eingesetzten Testsysteme zur Erfassung genotoxischer Wirkungen bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf komplex zusammengesetzte chemische Gemische.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien

Gentoxikologische Untersuchungen

Kamera	BFI Optilas, Puchheim
CO ₂ -Brutschrank, Function Line	Heraeus, Hanau
Comet Assay Auswertesoftware, Komet 4.0 Software	Kinetik Imaging Ltd, Liverpool, UK
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel, Braunschweig
Elektrophoresekammer, Horizontal-Midi-Gel	Molecular-Bio-Products
Elektrophoresekammer, mini	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Elektrophorese Power Supply, Phero-STAB 0652	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Färbeküvetten	Roth, Karlsruhe
Fluoreszenzmikroskop Modell E 600	Nikon, Düsseldorf
Fluorimeter, Fluoroskan Ascent FL	Thermo-Labsystems, Dreieich
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Geldokumentationssystem, GeneGenius	VWR, Darmstadt
LeucoSep [®] Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Lichtmikroskop, invers Modell CK 40	Olympus, Hamburg
Objektträger fully frosted	Menzel, Braunschweig
Programmierbarer Kryoautomat	Consarctic, Stockstadt
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße PCR 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Schüttler Modell Rocky 3d	Schütt, Göttingen
Serologische Plastikpipetten 5, 10, 25, 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Spektrophotometer, Ultrospec 2100 pro	Amersham, Freiburg
Sterilbank Modell HeraSafe	Heraeus, Hanau
Thermocycler, Mastercycler personal und gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer, compact	Eppendorf, Hamburg
Zell- und Gewebekulturplatten, Plastikware	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge Modell Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Modell Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen 30 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz

Chemisch-analytische Untersuchungen

Gewinde-Schraubgläser 2 ml	Agilent Technology, Böblingen
Septumschraubkappen mit Septum (Teflon/Silikon)	Agilent Technology, Böblingen
Mikrofläschchen 4 ml	Rettberg, Göttingen
Septumkappe mit Septum (Teflon/Butyl)	Rettberg, Göttingen
µl-Dosierspritzen 1000, 500, 100, 50, 10 µl (Hamilton)	VWR, Darmstadt
Analysenwaage Explorer	Ohaus, Gießen

Analysegeräte und Bedingungen

PERKIN-ELMER GC Autosystem mit FID, Autosampler und Turbochromauswertesystem

Trennsäule:	HP-5MS, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm df
Injektor:	270 °C, splitlos 1 min
Detektor:	FID, 270 °C
Trärgas:	N ₂ , 100 kPa
Programm:	50 °C (1 min), 6 K/min - 280 °C (3 min)

GC-MS HP GC 6890 mit HP 5973 MSD und Autosampler HP 6890 der Firma AGILENT

Trennsäule:	HP-5MS, 30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 µm df
Injektor:	270 °C, splitlos 0,75 min
Detektor:	full-scan (m/e 45-800) bzw. SIM (ausgewählte Target- und Qualifiziermassen)
	Transferline 280 °C, Quelle 230 °C, Quadrupol 150 °C
Trärgas:	He
Programm:	500 C (1 min), 6 K/min - 280 °C (3 min)

Saturn 2000 GC/MS/MS der Firma VARIAN

Trennsäule:	CP-SIL 8 CB low bleed MS (Chrompack), 30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 µm d _f
Injektor:	270°C, splitlos 0,75 min
Detektor:	Ion Trap full SCAN und SIM
Trärgas:	He
Programm:	50 ⁰ C (1 min), 6 K/min - 280 ⁰ C (3 min)

2.1.2 Chemikalien, Fertigmedien, Reagenzien

Gentoxikologische Untersuchungen

Acridinorange	SIGMA, München
Agarose LMA, SeaPlaque [®]	peqLab, Erlangen
Agarose, Standard EEO	SERVA, Heidelberg
Ameisensäure	Fluka, Neu-Ulm
Amethopterin	Fluka, Neu-Ulm
Aroclor 1254	UltraScientific, Wesel
Benz(α)Pyren	Fluka, Neu-Ulm
Blood Urea Nitrogen Kit	SIGMA, München
BSA	Paesel + Lorei, Hanau
CaCl ₂ (anhydr.)	SIGMA, München
Collagenase Typ I	Worthington, Lakewood, NJ, US
Collagen R-Lösung	SERVA, Heidelberg
Cytidin	VWR, Darmstadt
Cytochalasin B	Aldrich, München
Dicumarol (3,3`-Methylen-bis-(4-hydroxycoumarin))	SIGMA, München
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	SERVA, Heidelberg
DNase I	SIGMA, München
DNA-Standard 100 bp ladder (1 μ g/ μ l)	Promega, Mannheim
EDTA	SIGMA, München
EGTA	VWR, Darmstadt
Eisessig	VWR, Darmstadt
EMS	Schenkung, Institut für Genetik, Halle
epith-o-ser [®]	CC-Pro, Neustadt
Erdnussöl	Universitätsapotheker
Ethoxyresorufin	SIGMA, München
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	SIGMA, München
FKS	CC-Pro, Neustadt
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Glucose, Monohydrat	SERVA, Heidelberg

Glucose-6-Phosphat	SERVA, Heidelberg
β -Glucuronidase/Arylsulfatase (<i>Helix pomatia</i>)	Roche, Mannheim
L-Glutamin	SIGMA, München
Glyzin	SERVA, Heidelberg
H ₂ O ₂	VWR, Darmstadt
Heparin (Liquemin)	Roche, Mannheim
HEPES	SERVA, Heidelberg
Hypoxanthin	VWR, Darmstadt
Insulin	SIGMA, München
Interleukin-2, human (hIL-2) rekombinant	Roche, Mannheim
Isopropanol	VWR, Darmstadt
KCl	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR, Darmstadt
L15-Medium	CC-Pro, Neustadt
LSM [®] Separationsmedium	MP Biomedicals, Eschwege
β -Mercaptoethanol	VWR, Darmstadt
Magnesiummethoxidmethylcarbonat	VWR, Darmstadt
MEM	SIGMA, München
Methanol	VWR, Darmstadt
MgCl ₂	VWR, Darmstadt
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Aldrich, München
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	SIGMA, München
M-MLV RT und PCR-Kit	Promega, Mannheim
MMC	VWR, Darmstadt
MMS	Fluka, Neu-Ulm
Natriumacetat	VWR, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
NADP	SERVA, Heidelberg
Na-EDTA	Aldrich, München
Na ₂ HPO ₃	VWR, Darmstadt
NaOH	VWR, Darmstadt
Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	VWR, Darmstadt
Na ₂ PO ₄ x 7 H ₂ O	VWR, Darmstadt
Natrium Acetat	VWR, Darmstadt
Na-Pyruvat	VWR, Darmstadt

PBS, Dulbecco, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
PCR 2 x Mastermix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin/Streptomycin	CC-pro, Neustadt
Percoll (1,077)	Biochrom, Berlin
Pferdeserum, hitzeinaktiviert	CC-pro, Neustadt
Phytohämagglutinin	SIGMA, München
Pentobarbital	SIGMA, München
Pentoxyresorufin	SIGMA, München
Primer	MWG, Ebersberg bei München
RNase Off	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 mit Glutamax I	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640, Pulver	Biochrom, Berlin
6-Thioguanin	SIGMA, München
Thymidin	VWR, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	SIGMA, München
TRIZOL [®]	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Urea Nitrogen Kit	SIGMA, München

Chemisch-analytische Untersuchungen

Trichlortriazin (Cyanurchlorid)	Aldrich, München
Hexachlor-1,3-butadien (Pestanal)	Riedel-de Häen, Seelze
Hexachlorcyclopentadien	Ehrendorfer, Augsburg
Pentachlorpyridin	Fluka, Neu-Ulm
Pentachlorbenzol (Pestanal)	Riedel-de Häen, Seelze
Hexachlorbenzol	Fluka, Neu-Ulm
Octachlorcyclopenten	TCI, Portland, OR, US
5,6-Dibromacenaphthen	Aldrich, München
Dichlormethan (Acros)	Fisherscientific, Schwerte
Methanol (Uvasol)	VWR, Darmstadt
Aceton (Uvasol)	VWR, Darmstadt
Essigsäureethylester (Acros)	Fisherscientific, Schwerte
Technische Gase	
Stickstoff	5.0 Linde AG, Wiesbaden

Wasserstoff (FID)	3.0	Linde AG, Wiesbaden
Pressluft (FID)	10-40	Linde AG, Wiesbaden
Helium	5.0	Linde AG, Wiesbaden

2.1.3 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Kulturmedien wurden steril filtriert und falls nicht anders angegeben vor der Filtration auf einen pH von 7,5 eingestellt. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4°C, die Verwendungsdauer betrug 4 Wochen. Angaben in Klammern bezeichnen Endkonzentrationen.

Kultur humaner peripherer Lymphozyten

Kulturmedium:	450 ml RPMI 1640, 1 g NaHCO ₃ , 50 ml FKS, hitzeinaktiviert (10 %), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
Einfriermedium:	360 ml RPMI 1640, 1 g NaHCO ₃ , 1,75 µl Mercaptoethanol, 40 ml DMSO (8 %), 100 ml FKS, hitzeinaktiviert (20 %), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
Auftaumedium:	420 ml RPMI 1640, 1 g NaHCO ₃ , 1,75 µl Mercaptoethanol, 75 ml FKS, hitzeinaktiviert (15 %), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)

Kultur NHBEZ

Kulturmedium:	500 ml epith-o-ser [®] + Supplement, 25 mg Gentamycin,
Transportmedium:	L15-Medium (Pulver) in aqua dest.

Isolierung von Hepatozyten

Rattenhepatozyten:

Präperfusionspuffer:
(pH 7,35) 120 mM NaCl,
4,8 mM KCl,
1,2 mM MgSO₄ x 7H₂O,
1,2 mM KH₂PO₄,
24,4 mM NaHCO₃,
250 µM EGTA in aqua dest.

Collagenasepuffer:
(pH 7,5) 120 mM NaCl,
4,8 mM KCl,
1,2 mM MgSO₄ x 7H₂O,
1,2 mM KH₂PO₄,
24,4 mM NaHCO₃,
15 mM HEPES,
4 mM CaCl₂ x 2H₂O,
137 U/ml Collagenase Type I in aqua dest.

Schweinehepatozyten:

Präperfusionspuffer 1:
(pH 7,6) 10 mM HEPES,
142 mM NaCl,
6,7 mM KCl,
1 mM EGTA,
1 mM Glucose in aqua dest.

Präperfusionspuffer 2: Präperfusionspuffer 1 ohne EGTA

Collagenasepuffer:
(pH 7,6) 25 mM HEPES,
123 mM NaCl,
6,7 mM KCl,
4,8 mM CaCl₂ x 2H₂O,
5 mM Glucose,
0,5 % BSA,
33350 U/l DNase I,
143000 U/l Collagenase Type I in aqua dest.

Waschpuffer zur Hepatozytenisolierung:

(pH 7,4) 20 mM HEPES,
120 mM NaCl,

4,8 mM KCl,
1,2 mM MgSO₄ x 7H₂O,
1,2 mM KH₂PO₄,
0,4 % BSA in aqua dest.

Alle Puffer wurden 30 min mit Carbogen begast und steril filtriert.

Behandlungs- und Einsaatmedium: 500 ml MEM,
350 mg NaHCO₃
5 ml Insulinlösung (Endkonzentration: 500 ng/ml),
500 µl Gentamycinlösung (Endkonzentration: 50 µg/ml)

Medium zur Kryokonservierung: Waschpuffer,
5 mM Glucose,
3 mM Glyzin
7,5 % DMSO

Auftaumedium: Waschpuffer,
5 mM Glucose,
3 mM Glyzin

Percollgradient: Verhältnis Percoll (1,077) : 10 x PBS = 9:1

Beschichtung: 6 µg Collagen R/cm² Kulturschale

Das HGM für die Kultivierung von Ratten- und Schweinehepatozyten wurde nach der Methode von Runge *et al.*, 1999 hergestellt.

Das konditionierte Medium von Nichtparenchymzellen der Leber zur Kultivierung von kryokonservierten Hepatozyten wurde nach einer Methode von Ries *et al.*, 2000 gewonnen.

MH1C1 Zellkultur und Kryokonservierung

Kulturmedium: DMEM,
10 % FKS

Einfriermedium: DMEM,
10 % FKS
10 % DMSO

TK6-Zellkultur, Klonierungsassay und HPRT-Test

Kulturmedium:	450 ml RPMI 1640, 1 g NaHCO ₃ , 1,75 µl Mercaptoethanol, 50 ml FKS, hitzeinaktiviert (10 %), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
CHAT-Medium:	Kulturmedium, FKS, hitzeinaktiviert (15 %), 10 µM Cytidin, 200 µM Hypoxanthin, 0,2 µM Aminopterin, 17,5 µM Thymidin
THC-Medium:	Kulturmedium, FKS, hitzeinaktiviert (15%), 10 µM Cytidin, 200 µM Hypoxanthin, 10 µM Thymidin
Positivkontrolle EMS:	Kulturmedium für TK6-Zellen, 200 µM EMS

HPRT-Test/T-Zell Klonierung

HPRT-Medium-Basis:	425 ml RPMI 1640, 75 ml FKS, hitzeinaktiviert (15 %), 150 mg L-Glutamin, 55 mg Na-Pyruvat, 1 g NaHCO ₃ , 1,75 µl β-Mercaptoethanol
HPRT-Medium:	HPRT-Medium-Basis, 100 U/ml rekombinantes humanes Interleukin 2 0,5 %-iges PHA
HPRT-Medium-Selekt:	HPRT-Medium, 2 µg/ml 6-Thioguanin
Stammlösung 6-Thioguanin:	1 mg/ml 6-Thioguanin in 0,01 M NaOH Stammlösung wurde frisch hergestellt.

Stammlösung PHA:	45 mg in 5 ml aqua dest.
Einfriermedium:	87 ml HPRT-Medium-Basis, 5 ml FKS, hitzeinaktiviert (5 %), 8 ml DMSO (8 %) Medium wurde frisch hergestellt.
Feederzellenmedium:	445 ml RPMI 1640, 150 mg L-Glutamin, 50 ml FKS, hitzeinaktiviert (10 %), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)

L5178Y Zellkultur und Maus-Lymphoma-TK^{+/-}-Assay

RPMI-5:	475 ml RPMI-1640 mit Glutamax-I, 25 ml Pferdeserum, hitzeinaktiviert
RPMI-10:	450 ml RPMI-1640 mit Glutamax-I, 50 ml Pferdeserum, hitzeinaktiviert
RPMI-20:	400 ml RPMI-1640 mit Glutamax-I, 100 ml Pferdeserum, hitzeinaktiviert
THMG-Medium:	50 ml RPMI-10 500 µl Thymidin (0,3 mg/ml), 5 ml Hypoxanthin (50 µg/ml), 50 µl Methothrexat (0,1 mg/ml), 500 µl Glycin (0,75 mg/ml)
THG-Medium:	50 ml RPMI-10 500 µl Thymidin (0,3 mg/ml), 5 ml Hypoxanthin (50 µg/ml), 500 µl Glycin (0,75 mg/ml)
TFT-Stammlösung:	0,3 mg/ml TFT in aqua dest.
RPMI-20 _{sel} :	RPMI-20, 3 µg/ml TFT
MMS-Stammlösung:	10 ml RPMI-5 7,7 µl Methylmethansulfat (1000 µg/ml)
Positivkontrolle MMS: (Test ohne S9-Mix)	RPMI-5, 10 µg/ml Methylmethansulfat
B(α)P-Stammlösung:	DMSO, 150 µg/ml B(α)P

Positivkontrolle B(a)P:	RPMI-5,
(Test mit S9-Mix)	1,5 µg/ml B(α)P
KCl 0,15 M:	11,2 mg/ml KCl in aqua dest.

TBE Puffer

5 x TBE (pH 8,0)	25 ml 0,5 M EDTA
	27,5 g Borsäure
	54,45 g Tris in 1,0 l aqua dest.
1 x TBE	200 ml 5 x TBE
	800 ml aqua dest.

Der Puffer wurde als Laufpuffer für Agarosegele zum Nachweis von PCR-Produkten eingesetzt.

Comet Assay

Lyselösung (pH 10):	10 mM Tris
	2,5 mM NaCl
	100 mM Na-EDTA in aqua dest.
	1 % Triton X-100
	10 % DMSO frisch hinzugegeben.
Alkalischer	1 mM Na-EDTA
Elektrophoresepuffer (pH 13):	300 mM NaOH in aqua dest.
Neutraler	100 mM Tris
Elektrophoresepuffer (pH 9):	300 mM Na-Acetat in aqua dest.
	pH Wert mit Eisessig eingestellt.
Neutralisationspuffer (pH 7,5):	0,4 mM Tris in aqua dest.
Färbung:	20 µg/ml Ethidiumbromid in aqua dest.

Mikrokern Test

Soerensen-Puffer:

Lösung 1:	1,19 g/ml Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (0,06 M) in aqua dest.
Lösung 2:	0,91 g/ml KH ₂ PO ₄ (0,06 M) in aqua dest.

Für einen pH 6,8 wurden jeweils 50 ml von Lösung 1 und 2 gemischt.

Acridinorangegefärbelösung: 1 Teil 0,24 mM Acridinorange-Lösung + 15 Teile Soerensen-Puffer (Arbeitslösung)

Fixativ: Methanol : Eisessig = 3 : 1

Extrametabolisierendes System: S9-Mix

Phosphatstammlösung: A: 4,804 g KH_2PO_4 in 100 ml aqua dest.

B: 6,286 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml aqua dest.

19,6 ml von Lösung A und 80,4 ml von Lösung B wurden gemischt, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und die Phosphatstammlösung autoklaviert.

Magnesiumchlorid: 406,51 mg $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 50 ml aqua dest.

Kaliumchlorid: 615 mg KCl in 50 ml aqua dest.

NADP: 726 mg NADP in 20 ml aqua dest.

Glucose-6-Phosphatlösung: 304 mg Glc-6-P in 20 ml aqua dest.

Die Lösungen wurden durch Mikrofiltration sterilisiert.

Nachweis der Cytochrom P450 Aktivität

Dicumarol-Stammlösung (10 mM): 33,6 mg Dicumarol in 10 ml aqua dest.

Einsatz im Medium: 1:1000 Verdünnung.

Natriumacetat-Puffer (0,1 M): 0,82 g Na-Acetat in 100 ml aqua dest.

pH=4,5

2.1.4 Primer

Primer zur Bestimmung der Expression leberspezifischer Gene

Protein	Primername	Sequenz (5'→3')	PCR-Produkt (bp)	Accession-Nr.
CYP1A1	Cyp1A1fwd	CCAATGTCATCTGTGCCAT	380	AB052254
	Cyp1A1rev	TGTGTCAAACCCAGCTCC		
PCK	PEPCKfwd	GGCCGCACCATGTATG	398	X92720
	PEPCKrev	AGGATCAGCATGTGCTC		
CPS	CPSfwd	CTGTAAAAGCCATGAAGG	399	AF437511
	CPSrev	CAATGGTGTCTGCTGCC		
Albumin	ALBfwd	GATGTCCTTCCTGGGCA	645	X12422
	ALBrev	CTTGGGCTTGTGTTTCAC		
Transferrin	TFNfwd	GTGGCCTTTGTCAAGCA	565	X12386
	TFNrev	CTCCATCCAAGCTCATG		
AFP	AFPfwd	AGAGCCAAGGCACTGCCAAG	132	AY120900
	AFPrev	TCAAGGCCATCAGCTCAGGG		
GAPDH	GAPDHfwd	GACCCCTTCATTGACCTC	797	AF017079
	GAPDHrev	GCAATGCCAGCCCCAG		

Tabelle 1. Primerpaare für die RT-PCR-Analyse leberspezifisch exprimierter Gene. Alle Primer wurden aus den Daten der NCBI-Genbank ermittelt. Für Albumin wurde der Primer auf die Sequenz für Ratte und Mensch abgestimmt.

Primer für die LOH-PCR im Maus-Lymphoma-Assay

Primernamen	Sequenz (5' → 3')
D11.Agl1.fwd	AGGGAGGTGCCTGGCTAACTGACCGCA
D11.Agl1.rev	GCGGCACACGGAGTGATACTTGTCGGC
D11.Mit67.fwd	AAAAAAAAAAAAAGTTCAAGGCTGG
D11.Mit67.rev	GGA ACTCAACTCCTAGAACTTCTG
D11.Mit21.fwd	GAGAGCTCTTTCACACTTGAAGG
D11.Mit21.rev	CAGAAAGGCTCCTACCTCAGG
D11.Mit29.fwd	TTGAGGCATGAGGGGATTAG
D11.Mit29.rev	TTTCCGTCATTGCTAAAGGG
D11.Mit63.fwd	GCCCACA ACTTTGTGTCCTT
D11.Mit63.rev	TTGACCATGCTCCTCATCAG

Tabelle 2. Primerpaare für die LOH-PCR im Maus-Lymphoma-Assay (Jackson, 1999; Speit and Merk, 2002).

2.1.5 Untersuchungsmaterial

Als komplexe Stoffgemische werden in der Toxikologie Mehrkomponentengemische bezeichnet, die in Produktionsprozessen oder in der Umwelt entstehen, wobei die Konzentrationen der einzelnen Komponenten im Allgemeinen gering sind.

Komplexes Stoffgemisch

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte komplexe Stoffgemisch (Zusammensetzung vgl. Tab. 3) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,5 % DMSO suspendiert. In Vorversuchen (Muller *et al.*, 2002) erwies sich die 0,5%-ige DMSO-Lösung als optimale Konzentration zur Suspension des Stoffgemisch. Die im Höchstfall verwendete Konzentration von 56 µM wirkte nicht toxisch bzw. genotoxisch auf die eingesetzten Zellen. Diese wurde als Kontrolle des Lösungsvermittlers, sogenannte Vehikelkontrolle, in jedem Experiment mitgeführt. Die Stammlösung des komplexen Stoffgemisches wurde vor jedem Experiment frisch angesetzt.

Name der Verbindung	Gehalt in 2,5 g Gemisch [mg]	Fraktion #1 [mg]	Fraktion #2 [mg]	Fraktion #3 [mg]
Tetrachlorethen	0,022	0,002	nn	nn
Dichloracrylnitril	0,047	0,012	nn	nn
Trichloracrylnitril	3,0	1,1	0,06	0,005
Pentachlorethan	0,015	0,007	nn	nn
Hexachlorethan	0,215	0,1	0,003	nn
Pentachlorpropionitril	14,50	4,2	2,1	nn
Trichlortriazin	1,075	0,027	0,13	0,017
Pentachlormethacrylnitril	0,115	nn	0,05	nn
Hexachlorbutadien 1,3	0,1	nn	0,05	0,006
Hexachlorpropen	0,042	nn	0,015	nn
Dichlormethoxytriazin	0,65	1,5	1,1	0,03
Pentachlorallylnitril	0,217	nn	0,036	0,028
t-Pentachlorcrotonitril	0,25	nn	0,08	0,04
Dichlorhydroxytriazin	0,045	nn	0,025	0,013
Tetrachlorpyrazin	0,825	nn	0,66	nn
Hexachlorcyclopentadien	0,01	nn	nn	0,063
Dichlortriazin-2-amin	0,207	nn	nn	0,074
Heptachlorbutyronitril	0,004	nn	nn	0,001
Pentachlorpyridin	2,225	nn	nn	1,2
Pentachlorbenzol	0,024	nn	nn	0,013
o-Tetrachlorcyanopyridin	0,002	nn	nn	0,001
m-Tetrachlorcyanopyridin	0,017	nn	nn	0,01
Octachlorpropan	0,525	nn	nn	0,17
Octachlorcyclopenten	1,075	nn	nn	0,64
o-Heptachlorpicolin	1,075	nn	nn	0,43
m-Heptachlorpicolin	2,225	nn	nn	0,61
Hexachlorbenzol	3,250	nn	nn	1,8

Tabelle 3. Detektierbare Inhaltsstoffe des komplexen Stoffgemisches und der Fraktionen #1, #2 und #3. nn – nicht nachweisbar

Fraktionen

Die Fraktionen des komplexen Stoffgemisches wurden durch gaschromatographische Trennung hergestellt (Bauer, 1997). Die Zusammensetzung der Fraktionen ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Die Fraktionen lagen in Dichlormethan (DCM) gelöst vor. Deshalb wurden die Fraktionen zur Testung auch weiter in DCM verdünnt. Die Fraktionen wurden bei einer Temperatur von -80°C gelagert und die Verdünnungen für die Testung wurden frisch vor jedem Experiment hergestellt.

Gaschromatographische Untersuchungen der Fraktion #3

Die Charakterisierung der Fraktion #3 erfolgte mit der freundlichen Unterstützung von Frau Dr. Kraus, Institut für Analytik und Umweltchemie der Martin-Luther-Universität Halle. Die Trennung der Fraktion #3 erfolgte gaschromatographisch unter massenspektrometrischer Detektion im full scan mode, d.h. alle Inhaltstoffe wurden erfasst, im ausgewählten Ionenmodus (SIM) sowie zum Test auch unter Verwendung eines FID. Die für die Quantifizierung im SIM-Modus verwendeten GC-MS-Parameter sind in Tab. 4 angegeben.

Zur Optimierung der Trennung der Fraktion #3 wurden verschiedene Methoden- bzw. Geräteparameter variiert, um eine ausreichende Abtrennung und Quantifizierung der interessierenden Komponenten bei möglichst geringer Laufzeit zu ermöglichen.

Substanz	Retentionszeit [min]	Target Ion (m/z)	Qualifier Ionen (m/z)
Trichlortriazin	8,6	183	185, 187, 122
Hexachlorbutadien	11,55	225	223, 227, 260
Hexachlorcyclopentadien	14,21	237	235, 239, 272
Pentachlorpyridin	17,85	251	249, 253, 216
Pentachlorbenzen	18,11	250	248, 252, 215
Octachlorcyclopenten	20,27	309	307, 272, 274
Dibromacenaphthen (Ist)	28,815	312	310, 314, 152

Tabelle 4. Parameter zum GC-MS- Monitoring der analysierten Chlorkohlenwasserstoffe

Die Referenzverbindungen wurden nach möglichst hohem Reinheitsgrad ausgewählt. Um die Kalibrierfunktion zu ermitteln, wurden von den verfügbaren Standards Stammlösungen und entsprechende Verdünnungen in Dichlormethan über den nach Angaben früherer Untersuchungen zu erwartenden Konzentrationsbereich hergestellt. Die Target- bzw. Qualifier Ionen wurden über ihr Masse/Ladung-Verhältnis (m/z) detektiert.

Einzelsubstanzen

Um Rückschlüsse zu den toxikologischen/gentoxikologischen Leitsubstanzen ziehen zu können, wurden die verfügbaren Einzelsubstanzen in den Konzentrationen getestet, die in den chemisch-analytischen Untersuchungen der Fraktionen ermittelt wurden (vgl. Tab. 5).

Substanz	getestete Menge [ng] Inhalt in 0,16 mg/ml Fraktion #3
Hexachlorbenzol	16,752
Hexachlorbutadien	0,056
Hexachlorcyclopentadien	0,5856
Octachlorcyclopenten	5,952
Pentachlorbenzol	0,1216
Pentachlorpyridin	11,168
Trichlortriazin	0,1584

Tabelle 5. Getestete Einzelsubstanzen. Die Mengenangabe entspricht dem Inhalt in 0,16 mg/ml Fraktion #3.

Die Konzentration 0,16 mg/ml der Fraktion #3 wurde aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen zu den Fraktionen des komplexen Stoffgemisches gewählt (vgl. 3.1.2.2).

Präparation und gaschromatographische Überprüfung der Modellgemische

Zur Identifizierung der toxikologischen Leitsubstanzen und möglicher Kombinationswirkungen der Substanzen wurden 2-Komponenten-Modellgemische aus den Einzelsubstanzen in den Konzentrationen der Fraktion #3 hergestellt. Als Lösungsvermittler wurde wiederum DCM eingesetzt. Die Präparation der Modellgemische erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Kraus, Institut für Analytik und Umweltchemie der Universität Halle.

Die Modellgemische wurden in 5 ml Maßkölbchen bzw. 4 ml-Vials mit μ l-Dosierspritzen aus Stammlösungen hergestellt. Die Stammlösungen wurden durch Einwiegen der jeweiligen Verbindungen in Maßkolben, Auffüllen mit DCM und anschließender Herstellung der benötigten Verdünnungen präpariert. Von den Gemischen wurden jeweils ca. 250 μ l in GC-Vials zur gaschromatographischen Analyse und ca. 500 μ l in verschraubbare Eppendorftubes für den Toxizitätstest überführt (Tab. 6). Als geeignete Analysenmethode für die zu detektierenden Verbindungen und die zu erwartenden niedrigen Konzentrationen erwies sich die Gas-Chromatographie/Massenspektroskopie (GC-MS). Da für den Toxizitätstest möglichst keine weiteren Verunreinigungen in den Gemischen sein durften, konnte für die Quantifizierung nur die externe Standardkalibration genutzt werden. Für die Kalibration wurde von den zu bestimmenden Verbindungen wiederum Stammlösungen sowie entsprechende Verdünnungen in Dichlormethan hergestellt, im SIM-mode vermessen und die Kalibrierfunktionen erstellt.

Mix #	Substanzen	Zielkonzentrationen der Modellgemische [µg/ml]
Mix 01	Hexachlorbutadien Trichlortriazin	0,05 0,1
Mix 02	Hexachlorbutadien Hexachlorcyclopentadien	0,05 0,5
Mix 03	Hexachlorbutadien Pentachlorpyridin	0,05 10
Mix 04	Hexachlorbutadien Hexachlorbenzol	0,05 14,9
Mix 05	Hexachlorbutadien Pentachlorbenzol	0,05 0,1
Mix 06	Hexachlorbutadien Octachlorcyclopenten	0,05 5
Mix 07	Octachlorcyclopenten Hexachlorbenzol	5 13,9
Mix 08	Octachlorcyclopenten Pentachlorbenzol	5 0,1
Mix 09	Octachlorcyclopenten Trichlortriazin	5 0,13
Mix 10	Trichlortriazin Pentachlorbenzol	0,1 0,076
Mix 11	Trichlortriazin Pentachlorpyridin	0,1 6,96
Mix 12	Hexachlorcyclopentadien Pentachlorpyridin	0,5 9,4
Mix 13	Octachlorcyclopenten Pentachlorpyridin	5 9,1
Mix 14	Octachlorcyclopenten Hexachlorcyclopentadien	5 0,48
Mix 15	Hexachlorcyclopentadien Trichlortriazin	0,5 0,13
Mix 17	Hexachlorcyclopentadien Hexachlorbenzol	0,5 14,27
Mix 18	Pentachlorpyridin Pentachlorbenzol	10 0,11
Mix 19	Pentachlorpyridin Hexachlorbenzol	10 15,18
Mix 20	Pentachlorbenzol Hexachlorbenzol	0,1 13,9
Mix 21	Trichlortriazin Hexachlorbenzol	0,1 10,57

Tabelle 6. 2-Komponenten-Modellgemische (Stammlösungen).

Die Konzentrationen der Stammlösungen wurden so berechnet, dass die Endkonzentrationen im Toxizitätstest, der Konzentration der Substanzen in 0,16 mg/ml Fraktion #3 entsprachen.

2.1.6 Zellkultursysteme

Primärzellkultursysteme

Während früherer Arbeiten wurde das komplexe Stoffgemisch an primären humanen peripheren Lymphozyten, NHBEZ und Rattenhepatozyten getestet und die Behandlungsparameter an diesen Zellen optimiert (Müller et al., 2002). Daher wurden diese auch in den hier dargestellten Studien angewendet.

Am Beispiel des komplexen Stoffgemisches wurden weiterhin kryokonservierte Schweinehepatozyten auf ihre Verwendbarkeit in toxikologischen Untersuchungen getestet.

Die peripheren Lymphozyten (vgl. 2.2.1.1) gehören zu den am besten verfügbaren menschlichen Zellen, da sie relativ einfach aus Blutproben isoliert werden können, und stellen daher ein besonders verbreitetes System in der Gentoxizitätstestung dar (Tawn and Holdsworth, 1984). Sie wurden im Hinblick auf eine Standardisierung der Tests und einen möglichen Einsatz für Untersuchungen an Probanden eingesetzt.

Humane Bronchialepithelzellen (vgl. 2.2.1.2), deren Kultur am Institut für Umwelttoxikologie in Halle erfolgreich etabliert und die von dieser Einrichtung freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, gelten als sensibles und besonders geeignetes humanes Modellsystem für Untersuchungen von vor allem inhalativ in den Organismus aufgenommene Substanzen und Gemischen (Stock, 2002).

Ratten- und kryokonservierte Schweinehepatozyten (vgl. 2.2.1.3 und 2.2.1.4) wurden wegen ihrer besonderen Metabolisierungsfähigkeiten eingesetzt. Sie sind in der Lage, eine Substanz wie im intakten Organismus ohne Zusatz von weiteren Metabolisierungssystemen zu verstoffwechseln. Die anderen hier getesteten Zellkultursysteme verfügen unzureichend über diese Metabolisierungsfähigkeiten.

Zelllinien

Zellen der lymphoblastoiden humanen RKJ-853-Linie wurden als Feederzellen für die humanen peripheren Lymphozyten im HPRT-Test/T-Zell Klonierung verwendet. Mit freundlicher Unterstützung von Dr. Gerlach wurden die Zellen im Zentrum für Radiologie Halle mit 40 Gy γ -bestrahlt und so inaktiviert.

Im HPRT-Test, im Test zur Klonierungsfähigkeit und während der Untersuchungen zum strangbruchinduzierenden Potential des komplexen Stoffgemisches kamen TK6-Zellen zum

Einsatz. Die TK6-Zellen sind humane lymphoblastoide Zellen, die in einer Suspensionskultur wachsen. Diese Zellen wurden ausgewählt, um eine Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Untersuchungen auf den Menschen zu ermöglichen. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Tates, Leiden, Niederlande, zur Verfügung gestellt.

Während der Studien mit kryokonservierten Hepatozyten kamen als Kontrollen MH1C1-Zellen (ATCC #CCL-144) zum Einsatz. Bei dieser Linie handelt es sich um Rattenhepatomzellen. Die Zellen wachsen adhärent auf der Plastikoberfläche der Kulturgefäße.

Die Induktion von Mutationen am Thymidinkinase-Lokus und die Analyse des Mutationsspektrums des komplexen Stoffgemisches wurden an der Maus-Lymphoma-Zelllinie L5178Y TK^{+/-} 3.7.2.C durchgeführt. Die Zelllinie L5178Y stammt von weiblichen DBA/2-Mäusen ab, in denen leukämische Tumore durch 3-Methylcholanthren induziert wurden (Clive *et al.*, 1983). Durch Methylmethansulfonat-Behandlung wurden aus L5178Y-Zellen TK^{-/-}-Mutanten isoliert und spontane TK^{+/-}-Revertanten gewonnen. Ein Klon dieser TK^{+/-}-Revertanten (3.7.2.C) wurde für die Entwicklung des Maus-Lymphoma-TK^{+/-}-Assays eingesetzt (Übersicht bei Clive *et al.*, 1987). Diese Zelllinie ist zytogenetisch sehr gut charakterisiert (Sawyer *et al.*, 1985). Der *tk*-Lokus liegt heterozygot vor (Clements, 2000) und ist distal auf Chromosom 11 lokalisiert, wobei die beiden Chromosomen 11 durch einen Zentromerdimorphismus unterschieden werden können. Das nichtfunktionelle TK⁻-Allel ist dabei auf dem Chromosom 11 mit dem kleineren Zentromer (11a) lokalisiert, das Chromosom 11 mit dem größeren Zentromer (11b) trägt das funktionelle TK⁺-Allel (Hozier *et al.*, 1982). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Pascal Stadelmann, Novartis, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

Alle Zelllinien waren frei von *Mycoplasma*-Kontaminationen, wie durch DAPI-Färbung überprüft wurde.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultursysteme

2.2.1.1 Periphere humane Lymphozyten

Isolierung und Kultivierung peripherer humaner Lymphozyten

Die Isolierung erfolgte aus mit Leukozyten angereicherten Humanblutfractionen, dem sogenannten „Buffy coat“. Diese wurden von der Einrichtung für Transfusionsmedizin des Klinikums zur Verfügung gestellt.

Vorbereitend wurden je 10 ml Separationsmedium (LSM[®]), in 50 ml LeucoSep[®] Röhrchen gefüllt und für 1 min bei 900 x g zentrifugiert. Je 30 ml „Buffy coat“ wurden mit einer Pipette mit 60 ml PBS gemischt. Dabei wurde darauf geachtet, keine Luftblasen zu erzeugen, da dies zu einer Konglutination der Erythrozyten führen und sich diese dann nicht abzentrifugieren lassen würden (Müller *et al.*, 2001). Je 22,5 ml des Blutgemisches wurden auf die vorbereiteten LeucoSep[®] Röhrchen verteilt und 25 min bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis 0,5 cm oberhalb des weißen Lymphozytenrings mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Die Lymphozytenringe wurden vorsichtig aufgenommen, in zwei 50 ml Röhrchen gepoolt und mit dem doppelten Volumen an PBS gewaschen. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 800 x g wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml PBS nochmals gewaschen. Die Suspension wurde anschließend 13 min bei 130 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, verworfen und das Pellet in jeweils 40 ml Kulturmedium für Lymphozyten (vgl. 2.1.3) resuspendiert. Nachdem jeweils 7 ml der Suspension in 25 cm² Gewebekulturflaschen eingesät wurden, erfolgte eine Präinkubation der Zellen über 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Dabei hefteten sich Monozyten und Granulozyten an den Flascheninnenwänden an und konnten so abgetrennt werden. Nach 24 h wurde die Suspension vorsichtig aus der Flasche in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach nochmaliger Zentrifugation mit 100 x g für 5 min und Resuspension des Pellets in Lymphozytenkulturmedium wurde die Zellzahl bestimmt und die Suspension in 3 ml Gewebekulturröhrchen mit einer Dichte von 1 x 10⁶ Zellen pro ml im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Auf diese Weise wurden auch kryokonservierte Lymphozyten nach dem Auftauen (siehe unten) kultiviert.

Für den Einsatz der Zellen im Mikrokerntest (vgl. 2.2.5) wurde der Zellkultur nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank PHA in der Endkonzentration 2 µg/ml zugesetzt, um die Zellteilung anzuregen. Dann wurden die Zellen weiterkultiviert.

Der Ausschluss der Monozyten und Granulozyten ist für den Mikrokerntest erforderlich, während im Comet Assay (vgl. 2.2.4) die gesamte Lymphozytenfraktion oder auch Vollblut eingesetzt werden kann (De Meo *et al.*, 1991; Frenzilli *et al.*, 1997; Plappert *et al.*, 1995).

Kryokonservierung und Auftauen von peripheren humanen Lymphozyten

Die Kryokonservierung der Lymphozyten erfolgte unmittelbar nach ihrer Isolierung aus dem Vollblut. Das Zellpellet wurde nach dem letzten Waschschrift in Einfriermedium (4°C) (vgl. 2.1.3) resuspendiert. Die Zelldichte betrug 1×10^7 Zellen/ml. Die Zellsuspension wurde in 1,8 ml Kryoröhrchen verteilt und 2 min bei 100 x g zentrifugiert. Die Lymphozyten befanden sich jetzt als weiches Pellet auf dem Boden des Kryoröhrchens und wurden von ca. 1,5 ml Medium bedeckt. Um die zytotoxische Wirkung des DMSO beim Auftauvorgang möglichst gering zu halten, wurde vom Medienüberstand noch ca. 1 ml abgesaugt. Die Kryoröhrchen wurden für 1 h bei -30°C und für 24 h bei -80°C tiefgefroren, ehe sie zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Das Auftauen erfolgte rasch in PBS (37°C). Es wurde auf jedes Röhrchen 1 ml PBS pipettiert. So wurde das Pellet angetaut und gleichzeitig vom Boden gelöst. Das Röhrchen wurde mit einer schnellen Bewegung in ein mit 40 ml PBS gefülltes Zentrifugenröhrchen ausgeleert. Die Lymphozyten wurden resuspendiert und bei 100 x g für 5 min abzentrifugiert. Der zweite Waschschrift erfolgte mit 40 ml PBS. Nach der fünfminütigen Zentrifugation bei 100 x g wurde das Zellpellet in Auftaumedium (vgl. 2.1.3) resuspendiert und in Kultur genommen (siehe oben).

2.2.1.2 Normale humane Bronchialepithelzellen

Das Gewebe zur Anlage einer Kultur von NHBEZ wurde aus Resektaten von Patienten gewonnen, die sich auf Grund eines Bronchialkarzinomes, pulmonaler Metastasen eines extrabronchopulmonalen Primärkarzinomes oder einer inflammatorischen Genese einer Lob- oder Pneumektomie unterziehen mussten.

Das Lungengewebe wurde im Operationssaal in Empfang genommen, dreimal kurz in sterilem PBS gewaschen und in gekühlter Form in L15-Medium zur Aufarbeitung transportiert.

Die Aufarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Das Bronchialsegment wurde vom übrigen Lungengewebe mechanisch mit Hilfe von Scheren und Pinzetten, befreit und in ca. 5 mm² Stücke zerschnitten. Auch Knorpelspannen wurden aus dem auszusäenden Material entfernt. Die

Bronchusteilchen wurden mit der epithelialen Seite nach oben auf die Platten aufgebracht, 5 min angetrocknet und mit 5 ml epith-o-ser[®] Medium überschichtet.

Um den auswachsenden Zellen eine optimale Anheftung an die Plastikoberflächen der Kulturschalen zu ermöglichen, wurden die Platten im Vorfeld der Präparation mit einem Medium beschichtet, das Medium enthielt als Anheftungsbestandteile Fibronectin und Kollagen.

Das serumfreie Medium (epith-o-ser[®]) in dem die NHBEZ kultiviert wurden, ist mit proliferationsfördernden Zusätzen, wie epidermalem Wachstumsfaktor, Rinderepiphysenextrakt und Insulin supplementiert. Nach ca. 3 Wochen stellte sich die NHBEZ-Kultur als subkonfluenter Monolayer dar und konnte in Experimenten eingesetzt werden.

2.2.1.3 Rattenhepatozyten

Die Isolierung von primären Hepatozyten erfolgte aus Lebern ca. 200 g schwerer männlicher Wistar-Ratten durch *in situ* Perfusion mit Collagenase (modifiziert nach von Berry and Friend, 1969, und Seglen, 1976). Die Ratten wurden bei einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zum Standard Haltungsfutter für Ratten (Altromin, Lage) und Wasser gehalten.

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (5 mg/100 g Körpergewicht) narkotisiert. Um eine Koagulation des Blutes zu vermeiden, wurden in Narkose intravenös 1 ml Heparinlösung pro 250 g Körpergewicht injiziert. Danach wurde der Bauchraum eröffnet. Nach zweifacher Ligatur der lebersorgenden Gefäße und Einlegen eines Katheters wurde mit der Organperfusion der Leber begonnen. Die durch die Collagenase-Perfusion vereinzelt Hepatozyten konnten durch einfaches Ausschütteln der Leber im Waschpuffer aus dem Organverband gewonnen werden. Die Hepatozyten wurden in 50 ml Röhrchen dreimal in Waschpuffer gewaschen und 5 min bei 4°C und 52 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen mit Hilfe des Trypanblautests bestimmt (vgl. 2.2.8). Sie lag bei >95 %. Die Zelldichte wurde mit serumfreiem MEM auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

Kryokonservierung von Rattenhepatozyten

Aus der Zellsuspension der frisch präparierten Rattenhepatozyten wurden 6×10^7 Zellen entnommen und bei 4°C und 52 x g 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet in 12 ml Medium zur Kryokonservierung (vgl. 2.1.3) resuspendiert und so auf Kryoröhrchen verteilt, dass sich in einem Kryoröhrchen jeweils 1 ml Kryomedium mit 5×10^6 Zellen befand. Das Medium zur Kryokonservierung (Kryomedium) enthielt als kryoprotektive Substanzen 7,5 % DMSO und 3 mM

Glyzin (Southard, 2002). Die Kryoröhrchen wurden in einen programmierbaren Kryoautomaten überführt und nach einem an die Methode von Hengstler *et al.*, 2000 angepassten Programm (siehe unten) eingefroren. Nach Ablauf des Programms wurden die Kryoröhrchen ab einer Temperatur von -150°C aus dem Kryoautomat in einen Tank mit flüssigem Stickstoff verlagert.

Schema des automatisierten Einfrierprogramms zur Kryokonservierung von Hepatozyten:

Starttemperatur: 0°C

nach RUN wird diese Temperatur 1 min gehalten

Temperaturerniedrigung $2,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -8°C

Temperaturerniedrigung $7,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -33°C

diese Temperatur wird 2 min gehalten

Temperaturerhöhung $2,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -28°C

diese Temperatur wird 2 min gehalten

Temperaturerniedrigung $2,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -86°C

Freier Fall der Temperatur

Auftauen und anschließende Kultur kryokonservierter Rattenhepatozyten

Die Kryoröhrchen wurden schnell im Wasserbad (37°C) erwärmt, wobei das Eis nicht ganz schmelzen sollte, und dann mit Schwung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen ausgeleert. Im ersten Schritt wurden über 2 min 10 ml des Auftaumediums (vgl. 2.1.3) zur Zellsuspension pipettiert und im zweiten Schritt 10 ml des Auftaumediums eine Minute lang hinzupipettiert. Die Suspension wurde bei 4°C , $52 \times g$, 5 min zentrifugiert und das Pellet ganz vorsichtig durch Schwenken in 1 ml Auftaumedium resuspendiert und mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf den Percollgradienten (vgl. 2.1.3) aufgetragen. Mit der restlichen Zellsuspension, einige μl , im Zentrifugenröhrchen wurde der erste Trypanblautest (vgl. 2.2.8) nach dem Auftauen vorgenommen. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde bei $200 g$, 4°C , 20 min zur Entfernung toter Hepatozyten durchgeführt (Chesne and Guillouzo, 1988), um die Überlebensrate in der anschließenden Kultur zu optimieren. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml MEM resuspendiert, gezählt und die Vitalität durch den Trypanblautest bestimmt (vgl. 2.2.8). Die Zellen wurden in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml ausgesät. Das Aussaatmedium bestand aus MEM, das zu gleichen Teilen mit konditioniertem Medium von Nichtparenchymzellen der Leber (nach Ries *et al.*, 2000) gemischt wurde. Nach 4 h wurden die Zellen für 24 h in Medium aus

50 % HGM (Runge *et al.*, 1999) und 50 % konditioniertem Medium von Nichtparenchymzellen der Leber weiterkultiviert.

2.2.1.4 Schweinehepatozyten

Schweinehepatozyten wurden aus Lebern von 30-35 kg schweren und 12-16 Wochen alten Schweinen präpariert. Um eine Koagulation des Blutes zu vermeiden, wurden dem anästhesierten Tier 2,5 ml Heparinlösung intravenös injiziert. Nach der Resektion der Leber wurde diese sofort mit eiskaltem L15-Medium blutfrei gespült. Während dieser Perfusion wurden die Verletzungen am Leberstück zugenäht. Danach wurde das Leberstück zum Transport auf Eis gelagert und zur weiteren Aufarbeitung ins Labor gebracht. Die Hepatozyten wurden dann in einer Zweischrittperfusion bei 37°C isoliert. Die Perfusion startete mit dem Präperfusionspuffer 1 für 15 min bei einer Durchflussrate von 50 ml/min, gefolgt von Präperfusionspuffer 2 für 15 min bei gleicher Durchflussrate. Zur Desintegration des Lebergewebes wurde die Perfusion mit einem collagenasehaltigen Puffer für 15 min bei gleicher Durchflussrate fortgeführt. Die nachfolgenden Schritte wurden entsprechend der Methode zur Isolierung von Rattenhepatozyten (vgl. 2.2.1.3) unter einer Sterilbank ausgeführt.

Kryokonservierung von Schweinehepatozyten

6×10^7 Zellen wurden aus der fertigen Zellsuspension nach der Isolierung entnommen und mit der doppelten Menge MEM aufgefüllt, in eine 25 cm² Kulturflasche umgefüllt und 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Alle 10 min wurde die Schale geschwenkt. Diese Vorinkubation der Zellen erhöht die Anheftungsrate nach dem Auftauen (Alexandre *et al.*, 2002; Houle *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 1999). Nach der Vorinkubation wurden die Schweinehepatozyten 5 min bei 52 x g und 4°C abzentrifugiert und der Einfrierprozess wie bei Rattenhepatozyten (vgl. 2.2.1.3) beschrieben fortgesetzt.

Auftauen und anschließende serumfreie Kultur kryokonservierter Schweinehepatozyten

Der Prozess des Auftauens entspricht dem der Rattenhepatozyten (siehe oben).

Die anschließende Kultivierung erfolgte 4 h mit einem Gemisch aus 50 % MEM und 50 % konditioniertem Medium von Nichtparenchymzellen der Schweineleber, danach für 24 h mit 50 % HGM und 50 % konditioniertem Medium von Nichtparenchymzellen der

Schweineleber. Die weitere Kultivierung erfolgte bis zur Konfluenz der Zellen mit 100 % HGM, wobei alle 24 h ein Medienwechsel vorgenommen wurde.

Nachweis der Proliferation kultivierter kryokonservierter Schweinehepatozyten

Die Proliferation der Hepatozyten wurde vom zweiten bis zum fünften Kulturtag (konfluenter Monolayer) durch Bestimmung der Zellzahl ermittelt. Dazu wurden die Hepatozyten mit einem Gemisch aus Trypsin und Collagenase vom Boden der Kulturschale abgelöst und die Anzahl der Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt.

Harnstoffbestimmung

Ausdifferenzierte Hepatozyten synthetisieren Harnstoff als Endprodukt des Stickstoff-Stoffwechsels. Das Medium wurde alle 24 h gewechselt und der Harnstoff in 50 µl des Kulturüberstands nachgewiesen. Die Harnstoffkonzentration wurde mit dem Blood Urea Nitrogen Kit nach Anleitung der Herstellerfirma bestimmt. Die Methode beruht auf dem colorimetrischen Nachweis des Stickstoffatoms im Harnstoff nach Crocker, 1967.

Prinzip des Tests: Diacetyl Monoxime + Harnstoff → roter Farbstoff + Hydroxylamin

Die Harnstoffkonzentration ist direkt proportional zur Intensität des gebildeten Farbstoffkomplexes. Die Intensität des Farbstoffes wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Die Quantifizierung des Harnstoffs erfolgte durch Vergleich der Absorptionen mit einer Standardkurve. Die Standards wurden im Konzentrationsbereich von 6,25 bis 100 nmol mit HGM hergestellt.

Die Harnstoffsyntheserate wurde als $\text{nmol} \times 10^4 \text{ Zellen}^{-1} \times 24 \text{ h}^{-1}$ berechnet.

Cytochrom P450 Aktivität

Die 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität (EROD), katalysiert von CYP1A1, und die der Pentoxyresorufin-O-dealkylase (PROD), katalysiert von CYP2B1, wurden direkt in intakten kultivierten kryokonservierten Schweinehepatozyten nach der Methode von Lubet *et al.*, 1985 bestimmt. Die Messung erfolgte nach der Inkubation mit 8 µM Ethoxyresorufin bzw. Pentoxyresorufin für 2 h. Zum Medium wurde während der Inkubation jeweils 1 mM Dicumarol zugefügt, um die weitere Verstoffwechslung des entstandenen Resorufins zu verhindern. 75 µl der Probe aus dem Überstand der Zellen wurden mit 0,15 µl β-Glucuronidase + Arylsulfatase und 25 µl Natriumacetat-Puffer versetzt und bei 39°C unter Schütteln inkubiert. Nach

2 h wurden 200 µl 96 %-igem Ethanol zugesetzt und die Reaktionsgefäße 10 min bei 1000 x g zentrifugiert, um denaturiertes Protein aus der Lösung zu entfernen. 150 µl der Probe wurden in schwarze 96-well Platten pipettiert und die Fluoreszenz bei 530 nm Anregungswellenlänge und 590 nm Emission im Fluoroskan Ascent FL Fluorimeter detektiert. Die Resorufinmenge wurde anhand einer Standardkurve mit Resorufin im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 10 pmol in HGM quantifiziert. Die CYP-Aktivität wurde als $\text{pmol} \times 10^4 \text{Zellen}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ berechnet.

RT-PCR leberspezifischer mRNAs

Zum Nachweis leberspezifischer mRNA in 48 h kultivierten zuvor kryokonservierten Schweinehepatozyten wurde die RNA nach der vom Hersteller für den Gebrauch von TRIZOL[®] beschriebenen Methode isoliert. Die reverse Transkription erfolgte nach der Anleitung der Firma Promega: 1 µg RNA wurde für 3 min auf 70°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. 5 µl des M-MLV RT 5x Reaktionspuffers, 2 µl der dNTP (jedes 10 mM), 1 µl Random Hexanucleotidprimer, 0,5 µl RNasin, 0,3 µl M-MLV RT (60 U Endkonzentration) und DEPC-H₂O ad 15 µl wurden zur denaturierten RNA hinzu pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde vorsichtig geschwenkt, für 45 min bei 42°C inkubiert und anschließend für 3 min auf 95°C erhitzt. Die cDNA wurde bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die cDNA der leberspezifischen mRNA Albumin (ALB), Cytochrom P450 Subtyp 1A1 (CYP1A1), Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK), Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS) und Transferrin (TFN) wurden durch 30 PCR-Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 52°C amplifiziert. GAPDH wurde als interner Standard in 28 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 56°C amplifiziert. Die Expression von Albumin (ALB) und Alpha-Fetoprotein (AFP) wurde zusätzlich nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h der Kultur bestimmt. Die Amplifikation des AFP erfolgte durch 20 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 61°C. Die eingesetzten Primerpaare sind in Tab. 1 zusammengefasst.

2.2.1.5 Konditioniertes Medium von Nichtparenchymzellen der Leber

Das konditionierte Medium von Nichtparenchymzellen der Leber der jeweiligen Versuchstierart wurde nach einer Methode von Ries *et al.*, 2000 gewonnen. Die Nichtparenchymzellen wurden mit 50% konditioniertem Medium und 50% HGM ohne Wachstumsfaktoren serumfrei kultiviert, der Medienwechsel erfolgte aller 48 h. Nach 6, 8 und 10 Kulturtagen wurde der 48 h-Medienüberstand abgenommen und nach Sterilfiltration als konditioniertes Medium verwendet.

2.2.2 Testparameter

Zellkultursysteme

Die Suspensionskulturen von humanen Lymphozyten, TK6-Zellen und L5178Y-Zellen wurden abzentrifugiert, gezählt und in dem die Testsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen enthaltenden frischen Kulturmedium resuspendiert.

Die adhärennten Zellkulturen von NHBEZ und Rattenhepatozyten wurden vor der einstündigen Behandlung 5 min zur Ablösung von der Plastikoberfläche trypsiniert, abzentrifugiert, gezählt und in einem Reaktionsgefäß mit dem die Testsubstanzen in den Testkonzentrationen enthaltenden Kulturmedium versetzt.

Bei den kryokonservierten Schweinehepatozyten erfolgte die Behandlung gleich nach dem Auftauen in dem mit den Testsubstanzen versetzten Kulturmedium.

Negativ- und Vehikelkontrollen

Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellsuspensionen im Kulturmedium verwendet. Die Zellen wurden in den Testansätzen genauso behandelt wie alle anderen Proben.

Die Zellsuspensionen der Vehikelkontrollen wurden immer mit der höchsten eingesetzten Konzentration des jeweiligen Lösungsvermittlers behandelt.

Positivkontrollen

Im alkalischen und neutralen Comet Assay kam das DNA-strangbruchinduzierende H_2O_2 in den Konzentrationen 300 mM bzw. 40 μ M als Positivkontrolle zum Einsatz.

Die Substanz MMC (0,5 M), die in der Lage ist, Chromosomenaberrationen auszulösen, wurde als Referenzmutagen im Mikrokerntest verwendet.

Im HPRT-Test und Koloniebildungstest wurde das Mutagen EMS (200 μ M) als Positivkontrolle angewandt.

Mit den mutagenen Substanzen MMS und B(α)P wurden im MLA die Positivkontrollen ohne S9-Mix bzw. mit S9-Mix durchgeführt. Dabei kam B(α)P bei der Zugabe von S9-Mix zur Anwendung, da diese Substanz ein indirekt wirkendes Mutagen ist und erst nach Metabolisierung mutagen wirkt.

Behandlung

Während der Behandlung der Zellen mit dem komplexen Stoffgemisch, den Fraktionen, Einzelsubstanzen oder Modellgemischen wurden die Zellkulturflaschen oder Reaktionsgefäße im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Aufgrund von Daten aus früheren Untersuchungen (Müller, 2000) wurden unterschiedliche Behandlungszeiten gewählt, diese sind daher bei der Beschreibung der jeweiligen Methode bzw. in den Ergebnissen angegeben.

Konzentrationen der Testsubstanzen

Die Konzentrationen der Testsubstanzen wurden gemäß international akzeptierter Prüfrichtlinien (EPA, 1986; EWG, 1986; Miltenburger, 1993; OECD, 1983) gewählt, in denen gefordert wird, dass bei *in vitro* Studien zur Genotoxizität zur Erfassung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen mindestens drei verschiedene ansteigende Substanzkonzentrationen einzusetzen sind. Zusätzlich wird gefordert, die höchste Testkonzentration so zu wählen, dass sich die Mitoseaktivität in den behandelten Zellen auf 50 % reduziert.

Die in früheren Untersuchungen (Müller, 2000) erhobenen Daten zur Zytotoxizität und die daraus resultierenden Testkonzentrationen des komplexen Stoffgemisches stellten die Basis für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Studien dar. Die Konzentrationsbereiche wurden dabei entsprechend der Sensitivität der verwendeten Zellkultursysteme angepasst.

Comet Assay

Der **alkalische Comet Assay** wurde an humanen Lymphozyten, NHBEZ, Rattenhepatozyten und kryokonservierten Schweinehepatozyten durchgeführt.

Im **neutralen Comet Assay** wurden ebenfalls humane Lymphozyten und zusätzlich TK6-Zellen verwendet. Die Zahl der behandelten Zellen lag zwischen 10.000 und 50.000 Zellen/Probe. In beiden Test-Protokollen wurden nur Zellsuspensionen eingesetzt, die nach der Behandlung eine Vitalität von $\geq 85\%$ aufwiesen.

Das komplexe Stoffgemisch wurde in allen vier Primärzellkultursystemen im alkalischen Assay und in humanen Lymphozyten und TK6-Zellen im neutralen Comet Assay charakterisiert. Der Konzentrationsbereich betrug 0,005 mg/ml bis 0,32 mg/ml.

Die Fraktionen des komplexen Stoffgemisches wurden nur im alkalischen Comet Assay in humanen Lymphozyten, NHBEZ und Rattenhepatozyten geprüft. Der auf den Ergebnissen mit dem komplexen Gemisch basierende Konzentrationsbereich war 0,08 mg/ml und 0,16 mg/ml.

Die Einzelsubstanzen und Zwei-Komponenten-Modellgemische wurden aufgrund der Datenlage ebenfalls nur im alkalischen Comet Assay getestet, wobei als Zellsystem nur noch humane Lymphozyten eingesetzt wurden.

Bei der Ermittlung der Testkonzentration wurde der Gehalt der jeweiligen Komponente(n) in 0,16 mg/ml der Fraktion #3 zu Grunde gelegt, da sich diese Konzentrationsstufe in allen Testsystemen als gentoxisch wirksam und nicht zytotoxisch erwiesen hatte.

Mikrokerntest

Der *in vitro*-Mikrokerntest ist direkt an die Verwendung von Lymphozyten als Testsystem angepasst, daher wurden die Untersuchungen ausschließlich an diesen Zellen durchgeführt. Die getesteten Konzentrationen betragen für das komplexe Stoffgemisch 0,01 mg/ml – 0,32 mg/ml und für die Fraktionen des komplexen Stoffgemisches 0,16 mg/ml (Begründung siehe oben). Die Einzelsubstanzen wurden in den Konzentrationen getestet, in der sie in 0,16 mg/ml der Fraktion #3 enthalten waren.

Die folgenden drei Tests wurden nur mit dem komplexen Stoffgemisch vorgenommen.

Genmutationstests

Der **HPRT-Test** wurde mit humanen Lymphozyten und TK6-Zellen durchgeführt. Die Verwendung der Zellen basierte auf den Literaturdaten von Albertini *et al.*, 1982 bzw. Furth *et al.*, 1981. Der eingesetzte Konzentrationsbereich betrug 0,01 mg/ml bis 0,32 mg/ml.

Der **Maus-Lymphoma-Assay** wurde mit L5178Y TK^{+/−} 3.7.2.C-Zellen, einer speziell dafür entwickelten Zelllinie, ausgeführt (vgl. 2.1.6). Der untersuchte Konzentrationsbereich lag wie im HPRT-Test für das komplexe Stoffgemisch 0,01 mg/ml – 0,32 mg/ml.

Koloniebildungsfähigkeit

Im Test zur Koloniebildungsfähigkeit wurden TK6-Zellen verwendet. Der getestete Konzentrationsbereich betrug für das komplexe Stoffgemisch 0,01 mg/ml – 0,16 mg/ml.

2.2.3 Das externe Metabolisierungssystem S9-Mix

Nicht alle gentoxischen Substanzen wirken direkt gentoxisch, viele Stoffe werden erst durch ihre Metabolisierung gentoxisch; sie wirken indirekt. Da die meisten *in vitro*-Kulturen nicht über die erforderliche Enzymausstattung zur Metabolisierung verfügen, wie sie im intakten Säugerorganismus zu finden ist, muss bei der *in vitro*-Testung ein externes Metabolisierungssystem eingesetzt werden, wodurch eine dem Säugerorganismus annähernd vergleichbare Stoffwechselsituation geschaffen wird.

Gatehouse *et al.*, 1990 gibt die Leber als das geeignetste Organ für die Gewinnung eines externen Metabolisierungssystems an. In der Leber, dem Hauptstoffwechselorgan für exogene und endogene Substrate, werden CYP Enzyme besonders stark exprimiert. Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Giftung bzw. Entgiftung von Fremdstoffen im Körper. Sie metabolisieren lipophile Fremdstoffe durch Oxidation zu hydrophilen Produkten, die vom Körper ausgeschieden werden können (Dekant and Vamvakas, 1994).

Eine vermehrte Expression von verschiedenen Cytochromen kann durch die Gabe von Induktoren, z. B. Aroclor, einem Gemisch polychlorierter Biphenyle, ausgelöst werden. Dies findet Anwendung bei der Herstellung der so genannten S9-Fraktion aus Rattenleber zur Präparation des S9-Mixes. Der S9-Mix zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Enzymen des CYP Systems aus. Dieser S9-Mix wurde schon bei früheren Untersuchungen zum Ames-Test mit *Salmonella t.* angewandt (Bauer *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die enzymatische Leberaktivierung durch das Gemisch aus polychlorierten Biphenylen, welches in der Literatur als Aroclor 1254 bezeichnet wird (Czygan *et al.*, 1973). Aroclor ist der gebräuchlichste Induktor, mit dessen Hilfe die Identifizierung eines breiten Spektrums von Mutagenen und Promutagenen ermöglicht wird (Ames *et al.*, 1975; Czygan *et al.*, 1973).

Die Wahl des S9-Mix und dessen Aktivierung sollte in Abhängigkeit der zu untersuchenden Substanzen erfolgen, da unterschiedliche Stoffgruppen unterschiedliche Enzymsysteme induzieren. So aktiviert S9-Mix aus Hamstern eine Anzahl von N-Nitrosaminen effektiver als S9-Mix aus Rattenlebern. Aroclor-S9-Mix kann durch einen S9-Mix aus PB/ β -NF induzierten Lebern (CYP2B1, CYP2B2 und CYP1A1) ersetzt werden (Lewis, 1996). Es können auch andere Organe, z. B. die Lunge, zur Herstellung des S9-Mix verwendet werden.

Das hier untersuchte komplexe Stoffgemisch und seine Fraktionen enthielten zahlreiche halogenierte Kohlenwasserstoffe ohne bekannte gentoxische Wirkung, für die es keine Hinweise

auf ein bevorzugtes Aktivierungssystem gibt. Aroclor wurde gewählt, weil hierzu bereits umfangreiche Daten aus Genmutationstests zur Verfügung standen (Bauer *et al.*, 1995).

Leberaktivierung und Herstellung der S9-Fraktion

Vor der Applikation wurde Aroclor in Erdnussöl (Czygan *et al.*, 1973) in einer Konzentration von 200 mg/ml gelöst. Einer männlichen Wistar-Ratte mit einem Mindestgewicht von 250 g wurden fünf Tage vor Versuchsbeginn 500 mg/kg Aroclor 1254 *i.p.* injiziert. Fünf Tage nach der Behandlung wurde die Ratte getötet und die Bauchdecke im Abdominalbereich sofort unter sterilen Bedingungen eröffnet. Nach dem Ausbluten wurde die Leber entnommen und bei 4°C in 0,15 M steriler KCl-Lösung aufbewahrt. Die Leber wurde anschließend gewogen, zerschnitten und pro g mit 3 ml 0,15 M steriler KCl-Lösung versetzt. Dieses Gemisch wurde homogenisiert und in sterilen Plastikzentrifugenröhrchen 10 min bei 4°C mit 6000 x g zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand (S9-Fraktion) wurde in sterile Kryoröhrchen verteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Herstellung und Einsatz des S9-Mix

Vor Testbeginn wurde aus der S9-Fraktion der S9-Mix hergestellt:

Anteile am S9-Mix in der Reihenfolge der Zugabe (vgl. 2.1.3):

1. Phosphatstammlösung	30 %
2. KCl	20 %
3. MgCl ₂	20 %
4. S9-Fraktion	10 %
5. NADP	10 %
6. Glc-6-P	10 %

Die Reihenfolge musste eingehalten werden, um Auskristallisierungsprozesse einzelner Komponenten zu verhindern. NADP, Glc-6-P und die S9-Fraktion wurden auf Eis aufgetaut.

Die Versuchsabläufe des Comet Assays und des MLA wurden durch den Einsatz des S9-Mix nicht wesentlich beeinflusst (vgl. 2.2.4 und 2.2.7).

Den Zellsuspensionen wurde S9-Mix während der Inkubation mit den Testsubstanzen in einer Konzentration von 10 % zugesetzt. Die Behandlungsdauer betrug im Höchstfall 3 h, da S9-Mix allein zytotoxisch und gentoxisch wirken kann. Bei längeren Behandlungszeiten mit dem

Testgemisch erfolgte die Zugabe für 3 h am Ende der Inkubationsphase (Madle and Obe, 1980; Tafazoli and Kirsch-Volders, 1996).

Validierung des S9-Mix

Die Validierung des S9-Mix erfolgte im MLA unter Einsatz von B(α)P. Die Substanz B(α)P wirkt nur nach Metabolisierung genotoxisch.

2.2.4 Comet Assay

Seit Ostling and Johanson, 1984 zum ersten Mal die Methode der Einzelzell-Gelelektrophorese publizierten, verbreitete sie sich innerhalb kürzester Zeit in vielen Laboren, die sich mit Schäden an DNA, deren Reparatur und Genotoxizitätstestung befassen (Ross *et al.*, 1995). Der Test findet auf Grund seiner Sensitivität, seiner Einfachheit in der Durchführung, der Unabhängigkeit von Zellzyklen (Olive *et al.*, 1990) und der Eignung für alle kultivierbaren Zellkultursysteme (Pool-Zobel and Leucht, 1997) häufige Anwendung. Der Hauptvorteil besteht in der Möglichkeit Effekte an Einzelzellen beobachten zu können und so die Menge des einzusetzenden Zellmaterials zu minimieren.

Yendle *et al.*, 1997 beschrieb Faktoren, die Einfluss auf die Länge der Kometenschweife nehmen und die die Ergebnisse bei falsch gewählten Methodenansätzen beeinflussen bzw. verfälschen können. Besonders zur Relaxationszeit der DNA besteht große Variabilität. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit für alle Zellkultursysteme die gleichen Versuchsbedingungen im neutralen bzw. alkalischen Comet Assay angewendet. Diese können jedoch variiert werden können, falls im Test schwer reproduzierbare oder gar keine Ergebnisse erfasst werden können.

2.2.4.1 Alkalischer Comet Assay

Der alkalische Comet Assay dient zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen, zu einem geringen Prozentsatz auch von DNA-Doppelstrangbrüchen und AP-Stellen. Der Test stellt einen Indikatorrest für die Erfassung genotoxischer Wirkungen dar. Er beruht auf der Fähigkeit der DNA, im elektrischen Feld zu wandern. Werden die Zellen einer alkalischen Lyse unterzogen und anschließend für eine definierte Zeit einem alkalischen Puffer ausgesetzt, kommt es einerseits zur Trennung der DNA-Doppelstränge, andererseits werden alkalisensitive DNA-Veränderungen, wie z.B. AP-Stellen, in Strangbrüche umgewandelt. Da DNA in eukaryontischen

Zellen hochspiralisiert im Zellkern vorliegt lösen Strangbrüche in der DNA das Supercoiling und bewirken eine Entspannung der DNA. Die negativ geladenen DNA-Fragmente können sich nun im elektrischen Feld zur Anode bewegen. Je mehr DNA-Schäden in Form von Strangbrüchen oder alkalisensitiven Stellen auftreten, desto weiter wandert die DNA im elektrischen Feld. Die DNA wird nach Zellyse, Relaxationszeit und Elektrophorese durch Anfärbung mittels eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes, z. B. Ethidiumbromid, im Fluoreszenzmikroskop in Form eines Kometen sichtbar. Während bei ungeschädigter DNA nur der runde Zellkern sichtbar wird, ist die Länge des „Kometenschweifs“ ein Maß für die DNA-Schädigung.

Durchführung

Speziell aufgeraute Objektträger wurden mit 1 ml 1 % NMP-Agarose überzogen. Diese Schicht wurde nach kurzem Antrocknen wieder abgekratzt und mit einer Grundschicht von 300 µl 0,6 % NMP-Agarose überschichtet, mit einem Deckglas überdeckt und die Agarose ohne direkten Kontakt über Eis, zum Erstarren gebracht.

Nach der Entfernung des Deckglases folgte die Überschichtung mit der Zellschicht. Dazu wurden 10000 - 50000 behandelte Zellen (vgl.2.2.2) in 85 µl 37°C warmer 0,5 % LMP-Agarose resuspendiert und auf den vorbeschichteten Objektträger aufgebracht, mit Deckglas abgedeckt und 10 min über Eis gelagert. Mit einer Deckschicht aus 85 µl 0,5 % LMP-Agarose wurden die Zellen überschichtet. Die Objektträger wurden wiederum 10 min über Eis gelagert und nach der Entfernung des Deckglases für 1 h in der Lyselösung bei 4°C inkubiert. Die Lyse dient zur Freilegung der DNA aus dem Kern. Die Objektträger wurden danach in die Elektrophoresekammer eingebracht, welche im Eisbad stand, und 1 h im stark basischen Elektrophoresepuffer vorinkubiert, der bewirkte die Relaxation der DNA. Die Elektrophorese erfolgte 30 min bei 300 mA (0,7 V/ cm). Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde die Elektrophorese unter strenger Temperaturkontrolle durchgeführt, da eine Temperaturerhöhung auch die DNA-Migration steigert (Speit *et al.*, 1999). Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Objektträger mit Neutralisationspuffer bei Raumtemperatur abgespült und über Nacht im Kühlschrank in Neutralisationspuffer gelagert. Die Färbung erfolgte mit Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in DNA interkaliert (McKelvey-Martin *et al.*, 1993).

Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit H₂O₂ in der Endkonzentration von 300 µM behandelt (Singh *et al.*, 1988).

Die Durchführung des Comet Assay musste weitestgehend im Dunkeln oder bei Rotlicht erfolgen, um zusätzliche Schädigungen oder Photoreparatur der DNA durch Lichtenergie auszuschließen (Singh *et al.*, 1988).

Auswertung

Die Auswertung erfolgte sofort nach der Färbung mit einem NIKON Auflichtfluoreszenzmikroskop Modell E 600, Filtersatz G2A (Anregungswellenlängen 510 – 560 nm/Sperrfilter 595 nm), 100 W UV-Lampe. Die Kometenlänge wurde mit Hilfe einer Kamera und eines speziell dafür entwickelten Softwaresystems gemessen.

Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden nur Zellen ausgewertet, die deutlich über eine Kometenkopf- und -schwanz -Region verfügten (siehe Abb. 1). Es wurden pro Objektträger 50 Kometenschweife ausgemessen (Hanelt *et al.*, 1997). Dabei wurden Randbereiche des Objektträgers ausgespart, da sich dort Kometen befinden, die eine unspezifische DNA-Migration aufweisen. Es wurden mindestens 2 Objektträger pro Konzentration der Testsubstanz aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten ausgewertet.

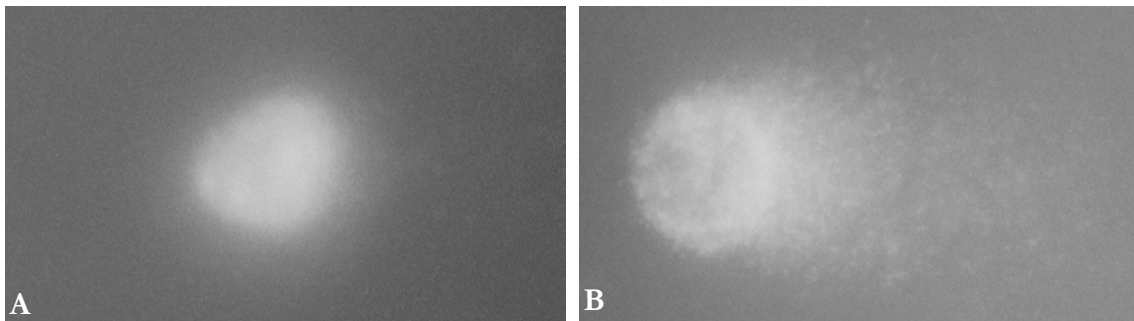


Abbildung 1. Mikroskopische Aufnahmen (400-fache Vergrößerung) von A) intakter DNA aus unbehandelten NHBEZ und B) fragmentierte DNA aus mit 300 μM behandelten NHBEZ im Comet Assay.

Der Grad der Schädigung der DNA kann in verschiedenen Parametern angegeben werden. Tice *et al.*, 2000 machen in den „Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing“ die Anmerkung, dass es sehr viele verschiedene Auswerteparameter für die DNA Schädigung gibt. Die metrische Auswertung erfasst die Länge der DNA-Migration in μm (Tice *et al.*, 2000). Ihr liegt die Auffassung zugrunde, dass die Länge der Migration direkt proportional zur Fragmentgröße ist und sich proportional zum Grad der Schädigung durch Strangbrüche und AP-Stellen und indirekt proportional zum Ausmaß von DNA-Crosslinks verhält. In früheren Untersuchungen (Müller, 2000) wurde die Kometenschweiflänge in μm (DNA-Migration) als Maß für die DNA-Schädigung gewählt. Da die vorliegende Arbeit auf diesen Studien aufbaut,

wurde diese Auswertung auch hier gewählt, um die Vergleichbarkeit der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der getesteten Substanzen zu gewährleisten.

Das Tail Moment, von Olive *et al.*, 1990 beschrieben, ist eine weitere Möglichkeit, die DNA-Schädigung metrisch auszudrücken. Es ist das Produkt aus der mittleren DNA-Migration und der relativen Fluoreszenzdichte im Kometenschweif. Diese Darstellung wird in der Literatur sehr häufig, besonders im Zusammenhang mit der rechnergestützten Auswertung, benutzt (Tice *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wird es für die Berechnung der Reparaturkapazität verwendet (vgl. 2.2.4.3).

2.2.4.2 Neutraler Comet Assay

Singh and Stephens, 1997, erreichten mit dem „neutralen“ Comet Assay Protokoll eine sehr gut reproduzierbare Sensitivität beim Nachweis von Doppelstrangbrüchen. Anders als im alkalischen Comet Assay, der hauptsächlich Einzelstrangbrüche nachweist, zeigte der neutrale Comet Assay dass durch das komplexe Stoffgemisch auch ein nicht unerheblicher Teil Doppelstrangbrüche ausgelöst wurde. Die Validierung des Tests erfolgte durch die Behandlung der humanen Lymphozyten mit 40 μM H_2O_2 . Wasserstoffperoxid verursacht an der DNA nur Einzelstrangbrüche (Wojewodzka *et al.*, 2002), somit dürfen im Neutralen Test keine Kometenschweife nachzuweisen sein.

Im neutralen Comet Assay wurde als Laufpuffer Tris-Acetat, pH 9 verwendet. Die Lyse erfolgte mit 1 % Triton X. Die Objektträger wurden nach der Lyse für 20 min in diesem Puffer (4°C) äquilibriert und anschließend die Elektrophorese im gleichen Puffer für 60 min bei 12 V (0,41 V/cm) und 50 mA durchgeführt. Auch hier erfolgte die Elektrophorese im Eiswasserbad. Aufgrund der Tatsache, dass unter den gewählten Bedingungen überwiegend Doppelstrangbrüche nachweisbar waren, zeigte sich nach der Behandlung der Zellen im Vergleich zum alkalischen Comet Assay eine kompaktere Form der Kometen.

2.2.4.3 DNA-Reparaturstudien mit Hilfe des alkalischen Comet Assays

Die Messung der Kometenschweiflängen nach unterschiedlichen Reparaturzeiten erfolgte nach einer modifizierten Methode von Harreus *et al.*, 2001; Visvardis *et al.*, 1997. Ziel dieser Untersuchungen war es, die DNA-Reparatur in humanen Lymphozyten nach der Behandlung mit dem komplexen Stoffgemisch bzw. den Fraktionen quantitativ zu beschreiben und Unterschiede

im Reparaturverhalten der Zellen nach verschiedenen Behandlungszeiten bzw. zwischen den Fraktionen aufzuzeigen. Abbildung 2 erläutert schematisch das Prinzip des Tests.

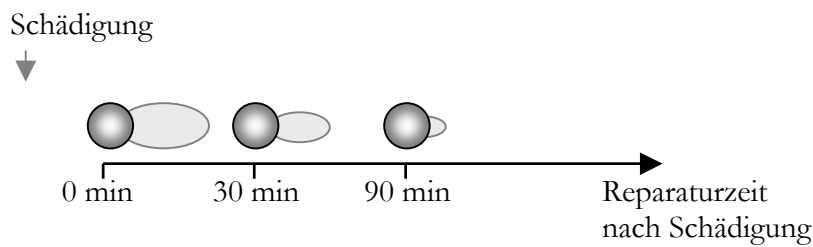


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Kometenschweiflänge nach Schädigung der DNA durch komplexes Stoffgemisch und nachfolgenden unterschiedlichen Reparaturintervallen. Die Fragmentierung der DNA, die in der Ausdehnung und Intensität des Kometenschweifes sichtbar wird, verringert sich mit zunehmender Reparaturzeit. (nach Harreus *et al.*, 2001)

Zu jedem Reparaturzeitpunkt wurden neben der behandelten Probe, auch unbehandelte Zellen als Negativkontrolle und mit dem jeweiligen Lösungsvermittler behandelte Zellen als Vehikelkontrollen mitgeführt.

Durchführung

Die DNA-Reparaturstudien wurden mit 10.000 humanen Lymphozyten nach einstündiger bzw. 24-stündiger Behandlung in je einem ml Kulturmedium mit 0,04 mg/ml des komplexen Stoffgemisches und mit 0,04 mg/ml der Faktionen #1, #2 und #3 durchgeführt. 5 min vor Ende der Behandlung wurden die Zellen 5 min bei 100 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Reaktionsgefäße wurden für 0 min; 5 min; 10 min; 20 min; 30 min; 60 min; 90 min und 120 min nach Beendigung der Behandlung im Wasserbad bei 37°C inkubiert. 5 µl der Zellsuspension wurden zum jeweiligen Zeitpunkt entnommen und für den Vitalitätstest mit Trypanblau verwendet. Nur Zellsuspensionen mit mindestens 85% vitalen Zellen wurden in den Comet Assay einbezogen. Der Rest der Zellsuspension wurde kurz abzentrifugiert, in LMP-Agarose aufgenommen und auf dem Objektträger ausplattiert. Die Objektträger mit den Zellen wurden bis zum Start der Lyse ohne direkten Kontakt auf einer Eisoberfläche im Kühlschrank gelagert, um eine weitere Reparatur der DNA zu verhindern. Die weitere Behandlung und die Auswertung der Objektträger erfolgten wie unter 2.2.4.1 beschrieben.

Auswertung

Das Ausmaß der DNA-Schädigung wurde mit der Kometenschweiflänge beschrieben [μm].

Zur Berechnung der Reparaturkapazität der Zellen wurde das Tail Moment herangezogen. Behandelte Zellen mit einem Tail Moment >2 (Olive and Banath, 1993) galten als unbeschädigt. Die Reparaturkapazität wurde berechnet aus dem Quotienten ungeschädigter Zellen nach 20 min Reparatur und ungeschädigter Zellen in der Negativkontrolle (modifiziert nach Harreus *et al.*, 2001).

$$\text{Reparaturkapazität}_{20 \text{ min}} = \frac{\text{Ungeschädigte Zellen in \% nach 20 min}}{\text{Reparatur}} \cdot \text{Ungeschädigte Zellen in \% der Negativkontrolle}$$

2.2.5 Mikrokerntest

Bei dem Mikrokerntest handelt es sich um einen Gentoxizitätstest zum Nachweis von Chromosomenaberrationen (Chromosomenmutationstest). Mikrokerne bestehen aus falsch verteilten Chromosomenbruchstücken oder ganzen Chromosomen, die bei der Zellteilung nicht in die Tochterzellen integriert werden. Das betrifft vor allem kinetochorlose Fragmente, kann aber auch Ergebnis der Brückenbildung dizentrischer Elemente sein (Madle *et al.*, 1993). Sie kondensieren in der darauf folgenden Interphase zu einem oder mehreren Mikrokerneln. Wie Zellkerne besitzen Mikrokerne eine Kernmembran. Mikrokerne können nur während der Mitose sichtbar werden. Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde der sogenannte *in vitro* Cytokineseblock-Mikrokerntest eingesetzt, der sich durch den Einsatz von Cytochalasin B etwas von dem früher durchgeführten *in vivo* Mikrokerntest unterscheidet (Bauer *et al.*, 1995). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Test erlaubte keine Unterscheidung zwischen strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen, da durch den Cytokineseblock-Mikrokerntest auch die zu Genommutationen führenden Klastogene und Spindelgifte, erfasst werden (Lang and Madle, 1993; Miller *et al.*, 1997).

Die wichtigste Voraussetzung für den Einsatz von Zellen im *in vitro* Mikrokerntest ist deren Proliferationsfähigkeit. Dabei wird die Zellteilung in der Anaphase der Mitose mit Hilfe von Cytochalasin B verhindert, welches in den Aufbau der Mikrofilamente des Spindelapparates der Zelle eingreift und somit die zytoplasmatische Trennung nach der Kerntrennung blockiert (Fenech and Morley, 1986; Romagna, 1993). Die DNA der Kerne kann mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden. Somit lassen sich sowohl doppelkernige Zellen als auch Mikrokerne unter dem Fluoreszenzlicht sichtbar machen.

Miller *et al.*, 1997 erwähnt die gute Einsatzfähigkeit von Lymphozyten für den Mikrokerntest, da sie durch Phytohämagglutinin zur Proliferation angeregt werden können (Preston, 1985). Der Mikrokerntest kann im Zuge von Zulassungsverfahren von Chemikalien etc. den geforderten Chromosomenaberrationstest zur Charakterisierung der genotoxikologischen Eigenschaften ersetzen (Miller *et al.*, 1997; Surralles and Natarajan, 1997).

Durchführung

Der Mikrokerntest wurde zum Nachweis von durch das komplexe Stoffgemisch hervorgerufenen Chromosomenaberrationen verwendet. Es wurden die Fraktionen und Einzelsubstanzen untersucht, um mögliche toxikologische Leitsubstanzen zu identifizieren. Nach der Isolierung wurden die Lymphozyten zunächst nach dem beschriebenen Verfahren (2.2.1.1) kryokonserviert und später nach Bedarf aufgetaut, wobei gleiche Chargen für unterschiedliche Versuchsansätze zu nutzen waren. Das war wichtig, da einige Autoren eine Abhängigkeit des Auftretens von Mikrokernen vom Zellalter beschrieben haben (Fenech and Morley, 1986; Surralles and Natarajan, 1997).

Die Lymphozyten wurden 20 h in phytohämagglutininhaltigem Medium kultiviert, danach wurde, wie bei Sgura *et al.*, 1997 beschrieben, das Stoffgemisch in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Zellkultur weitere 24 h im Brutschrank gehalten. Nach 44 h schloss sich die 24-stündige Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B-Lösung in der Endkonzentration 3 µg/ml an (Fenech and Morley, 1985). Danach wurden die Zellen bei 425 x g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert und die Lymphozyten nochmals bei 425 x g für 10 min zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 1 ml Fixativ resuspendiert und 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in wenigen Tropfen Fixativ aufgenommen. Mit Hilfe einer Transferpipette wurde die Zellsuspension auf einen sauberen Objektträger übertragen und an der Luft getrocknet. Die Positivkontrolle wurde mit 0,5 M MMC durchgeführt (Surralles and Natarajan, 1997).

Auswertung

Zur Auswertung wurden die Objektträger wie folgt gefärbt: Die angetrocknete Zellsuspension wurde mit der Arbeitslösung überschichtet und 3 min bei Raumtemperatur angefärbt (Hayashi *et al.*, 1983). Danach wurden die Präparate dreimal im Soerensen-Puffer 2 min lang gewaschen. Über die Zellen wurde ein Tropfen Puffer gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Die Auswertung

erfolgte sofort mit dem NIKON Auflichtfluoreszenzmikroskop Modell E 600, Filtersatz G2A (Anregungswellenlängen 510 - 560 nm/Sperrfilter 595 nm). Pro Objektträger wurden 1.000 doppelkernige Zellen ausgewertet. Die Häufigkeit des Auftretens von Zellen mit Mikronuklei wurde als Mikrokernrate bestimmt, sie gibt das Maß der Chromosomenschädigung wieder. Jedes Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Grundlage der Auswertung war die unterschiedliche Fluoreszenz von DNA und RNA im angeregten Zustand: DNA fluoresziert grün, RNA rot. Die Mikrokernkerne waren demnach im Präparat als kleine grün-fluoreszierende Punkte neben bzw. zwischen Doppelkernen sichtbar. Die Auswertekriterien wurden aus der Arbeit von Fenech, 2000 übernommen.

2.2.6 Nachweis von Genmutationen

In Genmutationstests werden vererbare Funktionsänderungen erfasst. Vererbbarkeit und Funktionsänderung sind dabei Aspekte von unmittelbarer toxikologischer Relevanz (Glatt, 1993). Für die Beurteilung, ob Stoffe möglicherweise kanzerogene Eigenschaften besitzen, ist es unabdingbar, dass Befunde aus Mutagenitätstests vorliegen (Lang and Madle, 1993).

2.2.6.1 HPRT-Test

Ein Test, der zur Gruppe der Genmutationstests gehört, ist der HPRT-Test. HPRT steht für Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase. Dieses Enzym spielt im Purinstoffwechsel der Zelle eine Rolle. Sie aktiviert Guanin-Analoga zu toxischen Metaboliten, die auch in Nukleinsäuren eingebaut werden und so als Zellgift wirken. Eine zelluläre Resistenz gegen Guanin-Analoga ist immer auf den Funktionsverlust oder eine eingeschränkte Funktion der HPRT zurückzuführen. Ursache hierfür ist eine Mutation im X-chromosomalen Strukturgen *hprt* oder in dessen Regulatorregion. Die Zelle ist trotzdem lebensfähig, da sie in der Lage ist, Purin *de novo* zu synthetisieren. Auf dieser Eigenschaft beruht das Prinzip des HPRT-Tests.

Als Substrat wird den Zellen Thioguanin angeboten, das in Zellen mit intakter HPRT metabolisiert wird und als Zellgift wirkt. Zellen die keine intakte HPRT besitzen, metabolisieren Thioguanin nicht und haben einen Überlebensvorteil, so dass sie in Kultur proliferieren.

Das System ist sehr gut charakterisiert, das heute bekannte Mutationsspektrum umfasst u.a. hunderte verschiedener Punktmutationen, aber auch vollständige Deletionen, die auch außerhalb des HPRT-Gen liegen können (Glatt, 1994). Sehr große Deletionen, die weit über den Genbereich des HPRT-Gens hinausgehen, werden aufgrund ihrer möglichen zytotoxischen

Wirkung nicht erfasst (Wu *et al.*, 1998). Beim Menschen haben Störungen der HPRT pathophysiologisch beim Lesch-Nyhan-Syndrom und bei der Gicht im höheren Alter Bedeutung.

2.2.6.1.1 HPRT-Test an humanen Lymphozyten/T-Zell Klonierung

Durchführung

Die humanen peripheren Lymphozyten wurden, wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, isoliert. Danach erfolgte ein Priming der Lymphozyten mit 1 µg/ml PHA im Kulturmedium, um die Zellteilung anzuregen. Die Lymphozyten wurden danach 1 h mit dem komplexen Stoffgemisch behandelt (vgl. 2.2.2). Nach der Behandlung wurden die Lymphozyten in PBS gewaschen und in zwei Untersuchungsgruppen aufgeteilt. Eine Gruppe diente zur Ermittlung der Klonierungseffizienz unter nichtselektiven Bedingungen, d.h. ohne Zusatz von Thioguanin. Mit Hilfe der anderen Gruppe sollte eine Mutantenselektion unter Thioguaninzusatz erfolgen, um die Mutantenfrequenz zu bestimmen. Die Tests wurden nach der Methode von Hüttner und Mitarbeitern konzipiert und durchgeführt (Huttner and Holzapfel, 1996; Huttner *et al.*, 1995). Als Positivkontrolle wurde EMS in einer Konzentration von 200 µM eingesetzt (Steen *et al.*, 1997b).

Ermittlung der Klonierungseffizienz unter nichtselektiven Bedingungen (CE)

Um die Zytotoxizität des komplexen Stoffgemisches nach der Behandlung zu ermitteln und die Überlebensrate der Zellen nach 14 Tagen Kultur zu erfassen, wird die Klonierungseffizienz der Zellen bestimmt.

Die Lymphozyten wurden in HPRT-Medium-Basis auf eine Dichte von 5.000 Zellen/ml eingestellt. Die Feederzellen RKJ 853 wurden aufgetaut und zweimal mit PBS gewaschen und bei 200 x g 10 min abzentrifugiert. Für eine Mikrotiterplatte im 96-well-Format wurden pro well 10⁴ Feederzellen in 200 µl HPRT-Medium (vgl. 2.1.3) eingesetzt. Für die CE Bestimmung wurden zwei Platten eingesetzt, eine mit 5 Lymphozyten/well plus 10⁴ Feederzellen/well und die zweite mit 2 Lymphozyten/well plus 10⁴ Feederzellen/well. Die Lymphozyten und die Feederzellen wurden in HPRT-Medium sorgfältig vermischt und mit einer Mehrkanalpipette ausplattiert. Die Platten wurden anschließend mit Frischhaltefolie umwickelt und für 14 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit 100 U/ml rekombinantem humanem Interleukin-2 (Branda and Albertini, 1995).

Ermittlung der Mutantenfrequenz unter selektiven Bedingungen (MF)

Für die Thioguaninselektion wurden fünf Mikrotiterplatten je im Test eingesetzter Konzentration des komplexen Stoffgemisches verwendet. Jede Platte enthielt 2×10^4 Lymphozyten, jedoch keine Feederzellen. Die Selektion erfolgte in HPRT-Medium-Selekt (vgl. 2.1.3).

Auswertung

Dazu wurden die Platten 14 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und dann unter dem Mikroskop ausgewertet. Erfasst wurden die bewachsenen Wells der Platte, also die positiven Klone.

HPRT-Test an TK6-Zellen

Der Test wurde nach einer Methode von Furth *et al.*, 1981 durchgeführt.

Vorbereitung

Die TK6-Zellen wurden nach dem Auftauen 6 Tage in Medium kultiviert und vor Beginn des Experiments 2 Tage in CHAT-Medium, um das Auftreten spontaner *hprt*-Mutanten zu reduzieren. Danach wurden die Zellen 24 h vor Behandlungsbeginn in THC-Medium kultiviert. Die Zelldichte wurde jeden Tag auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Durchführung

Bei der gleichen Zelldichte erfolgte die einstündige Behandlung der Zellen in Kulturmedium, das mit im Test eingesetzten Konzentrationen von 0,01 mg/ml bis 0,32 mg/ml an komplexem Stoffgemisch versetzt war. Als Positivkontrolle diente 200 µM EMS. Nach der Behandlung wurden die Zellen abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Ein Teil der Zellen wurde gleich für die Zytotoxizitätsbestimmung in Mikrotiterplatten kultiviert und der andere Teil wurde in normales Kulturmedium eingesät und 10 Tage weiterkultiviert, da sich der Phänotyp der Mutanten im *hprt* erst nach 6-10 Tagen ausprägt. Die Zelldichte wurde täglich auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Die Klonierungseffizienz wurde in zwei 96-well-Mikrotiterplatten, die jeweils 2-3 Zellen/well enthielten, bestimmt. Die Mutantenfrequenz wurde in mit 2 µg/ml Thioguanin versetztem Kulturmedium bestimmt. Es wurden vier Mikrotiterplatten mit je 4×10^4 Zellen/well je Konzentration der Testsubstanzen angesetzt.

Auswertung

Die Platten wurden 14 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und danach wurden die bewachsenen wells unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.2.6.2 Maus-Lymphoma-Assay

Der Maus-Lymphoma-TK^{+/-}-Assay gehört auch in die Gruppe der Genmutationstests. Er findet aufgrund der Möglichkeit, damit neben Genmutationen auch Chromosomenmutationen nachzuweisen, eine immer weitere Verbreitung zum Screening von Chemikalien (Cole *et al.*, 1999). Dieser Test findet deshalb auch Anwendung zum Nachweis mutagener Wirkungen von neuen oder unbekanntem Substanzen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie (Mitchell *et al.*, 1997). In diesem Test werden Mutationen nachgewiesen, die zum Funktionsausfall des autosomalen TK-Gens in führen. Der Test beruht auf der Fähigkeit der Zellen, nach einem Funktionsausfall der TK mit TFT zu proliferieren. TFT ist ein Thymidinanalogon, das in Zellen mit intakter TK als Zellgift wirkt.

Der Test verfügt über eine hohe Sensitivität, wobei Kontrollen für pH-Wert und Osmolalität berücksichtigt werden müssen und eine getrennte Erfassung großer und kleiner Kolonien erfolgen muss (Li *et al.*, 1991). Der Nachweis kleiner Kolonien gibt Hinweise auf Deletionen im Gen (Blazak *et al.*, 1986).

Vorbereitung

Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese 7 Tage in RPMI-10 kultiviert, bis die Generationszeit etwa 12 h betrug. Bei der Kultivierung von L5178Y-Zellen wurde darauf geachtet, dass die Zelldichte unter 1,5 x 10⁶ Zellen/ml blieb. Zu diesem Zeitpunkt musste die spontane Mutationsrate überprüft werden. Hierbei wurde in zwei 96-well-Mikrotiterplatten die Klonierungseffizienz und in vier Platten die Mutantenfrequenz (siehe unten) bestimmt. Die Mutantenfrequenz sollte zwischen 60 x 10⁻⁶ und 300 x 10⁻⁶ liegen und die Klonierungseffizienz ≥ 50 % sein. Lag die Mutantenfrequenz durch Akkumulation von Mutanten höher, wurde eine Abtrennung der tk^{-/-}- und tk^{0/-}-Mutanten durch Selektion durchgeführt. Die Zellen wurden dazu 24 h in THGM Medium kultiviert und danach noch zwei Tage in THG Medium (Honma *et al.*, 1999).

Durchführung

Die Zellen wurden 1 h mit dem komplexen Stoffgemisch in den Konzentrationen 0,01; 0,02 und 0,04 mg/ml behandelt. Später wurden die Konzentrationen deutlich reduziert (0,00075; 0,001; 0,005; 0,01 mg/ml), da sich die hohen Konzentrationen in Vorversuchen als zytotoxisch erwiesen. Die Tests wurden mit und ohne Zusatz von S9-Mix durchgeführt. Bei der Positivkontrolle ohne S9-Mix wurden die Zellen mit 100 µg/ml MMS behandelt und unter Zusatz von S9-Mix wurde die Positivkontrolle mit 1,5 µg/ml B(α)P durchgeführt. Die Behandlung der Zellen ($5,3 \times 10^5$ Zellen/ml) erfolgte in 9,5 ml RPMI-5, welches mit den jeweiligen Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches versetzt wurde. Bei der Testung ohne S9-Mix wurden dem Ansatz noch 500 µl 0,15 M KCl-Lösung, bei der Testung mit extrametabolisierendem System 500 µl S9-Mix zugefügt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C auf einem Taumler, der die Kulturröhrchen leicht bewegte. Am Ende der Behandlungszeit wurden die Zellen 5 min bei 200 x g abzentrifugiert und danach in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml in RPMI-10 resuspendiert. Ein Teil wurde zur Bestimmung der Klonierungseffizienz nach der Behandlung verwendet. Da sich der Phänotyp der *tk*-Mutanten erst nach 48 h ausprägt, wurde der andere Teil der Zellsuspension 2 Tage weiterkultiviert.

Bestimmung der Zytotoxizität nach der Behandlung/Klonierungseffizienz

Von jeder Behandlungsgruppe wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit RPMI-20 auf 8 Zellen/ml verdünnt. Je 200 µl der verdünnten Zellsuspension wurden in jedes well von zwei 96-well-Mikrotiterplatten mit Rundböden pipettiert, das ergibt statistisch 1,6 Zellen/well. Die Platten wurden anschließend für 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Zur Auswertung der absoluten Klonierungseffizienz nach der Behandlung wurde die Anzahl der wells mit lebenden Klonen bestimmt (abs. CE).

Bestimmung der Mutantenfrequenz unter selektiven Bedingungen

Die Kulturen wurden zwei Tage nach der Behandlung mit 99 ml RPMI-20 auf 10^4 Zellen/ml verdünnt. Nun wurde 1 ml einer 300 µg/ml TFT-Lösung zugegeben. Mit der Mehrkanalpipette wurden 200 µl Portionen dieser Zellsuspension in jedes well von vier Mikrotiterplatten mit flachen Böden verteilt (2000 Zellen/well). Diese Platten wurden 14 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert (MF).

Bestimmung der Klonierungseffizienz nach 2 Tagen Expressionszeit

Zur Berechnung der relativen Klonierungseffizienz war es notwendig, die Klonierungseffizienz der Zellen zwei Tage nach der Behandlung unter nichtselektiven Bedingungen zu erfassen. Von jeder Behandlungsgruppe wurde eine Zellsuspension von 8 Zellen/ml in 200 µl Portionen auf zwei Mikrotiterplatten mit Rundböden verteilt (1,6 Zellen/well). Diese Platten wurden 14 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bei der Auswertung wurden die bewachsenen wells der Mikrotiterplatten ausgezählt (CE2).

Auswertung

Nach der Inkubation der Platten im Brutschrank wurden folgende Parameter bestimmt:

- Anzahl der wells ohne Kolonien zur Bestimmung der Gesamt-Mutantenfrequenz,
- Anzahl der wells ohne große Kolonien ($\geq 1/3$ des well-Durchmessers) zur Bestimmung der Mutantenfrequenz für große Kolonien,
- Anzahl der wells ohne kleine Kolonien ($< 1/3$ des well-Durchmessers) zur Bestimmung der Mutantenfrequenz für kleine Kolonien.

Bilder mit Beispielen von wells mit großen bzw. kleinen Kolonien sind in Abb. 3 gezeigt.



Abbildung 3. Mikroskopische Bilder von wells mit A) einer großen Kolonie, B) einer großen und einer kleinen Kolonie und C) mit nur einer kleinen Kolonie bei der Auswertung des MLA. (50-fache Vergrößerung)

Zur Berechnung der Klonierungseffizienzen wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{abs. CE} = \frac{-\ln \left(\frac{\text{EW}}{\text{TW}} \right)}{1,6}$$

EW = Anzahl der leeren wells pro 96-well-Platte

TW = Anzahl der wells pro Platte (=96)

1,6 = theoretisch ausgesäte Anzahl der Zellen pro well

$$\text{rel. CE} = \frac{\text{abs. CE}_{\text{Behandlung}}}{\text{abs. CE}_{\text{Kontrolle}}}$$

Die Mutantenfrequenz (MF) gibt die Anzahl der Zellen mit einem TFT-resistenten Phänotyp pro 10^6 überlebende Zellen wieder:

$$\text{MF} = \frac{-\ln \left(\frac{\text{EW}}{\text{TW}} \right) \times 10^6}{\text{abs. CE}_2}$$

EW = Anzahl der wells ohne Kolonien pro 96-well-Platte

TW = Anzahl der wells pro Platte (=96)

abs. CE 2 = absolute Klonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Selektion

2000 = theoretisch ausgesäte Anzahl der Zellen pro well

Zur Berechnung der Mutantenfrequenz für kleine bzw. große Kolonien wurde die Anzahl der wells ohne kleine bzw. große Kolonien als EW in die Formel eingesetzt.

Molekulare Analyse TFT-resistenter Kolonien zum Nachweis des Verlusts der Heterozygotie auf Chromosom 11

Um die Mechanismen, die zum Ausfall der Enzymaktivität der Thymidinkinase geführt haben, näher zu charakterisieren, wurde das Ausmaß des LOH an fünf polymorphen Markern: *D11Agl1*, *D11Mit67*, *D11Mit29*, *D11Mit21*, *D11Mit63* analysiert.

Vorbereitung

Für die molekulare Analyse von spontan entstandenen TFT-resistenten Zellen wurden L5178Y-Kulturen aufgetaut und 6 Tage in RPMI-10 kultiviert. Anschließend wurden 8 Mikrotiterplatten mit je 2000 Zellen pro well in 200 μl RPMI-20_{Sel} angesetzt und für 14 Tage im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden auf positive Klone überprüft und pro Platte wurden je sieben kleine und sieben große Kolonien isoliert. Dazu wurden wells ausgewählt, die jeweils nur eine kleine oder große Kolonie enthielten. Zur Isolierung wurden das Medium und die Zellen im well mit einer Pipette durchmischt, in eine 6-well-Platte mit 5 ml RPMI-20_{Sel} überführt und im CO₂- Brutschrank für 2-3 Tage inkubiert. Die isolierten Zellkolonien wurden anschließend in 25 cm²-Flaschen in selektivem Medium weiter kultiviert. Bei geeigneter Zellzahl ($\leq 1 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden die Zellen geerntet und in TRIZOL aufgenommen.

Für die Gewinnung von induzierten TFT-resistenten Zellen wurden Kolonien aus den Platten für die Mutantenselektion ausgewählt. Die Isolierung der Kolonien und die Expansion der Zellen erfolgte wie bei den spontan entstandenen TFT-resistenten Zellen.

Durchführung

DNA Isolierung

Die Isolierung der DNA wurde aus TRIZOL geernteten Zellen nach Vorschrift der Firma Invitrogen vorgenommen. Die DNA wurde in 100 µl 8mM NaOH Puffer bei pH = 8 gelöst und bei 4°C gelagert.

PCR zur Analyse der polymorphen Marker auf Chromosom 11

Eine sogenannte „touchdown“-PCR wurde zur Analyse der polymorphen Marker auf den Chromosomen 11 durchgeführt. Die Annealing-Temperatur zur spezifischen Anlagerung der PCR-Primer wurde so gewählt, dass in der PCR nur die gewünschten, polymorphen DNA-Bereiche amplifiziert wurden (Liechty *et al.*, 1998; Speit and Merk, 2002).

Marker	Position auf Chr. 11 [cM]	PCR-Produktgröße von Chr. 11a	PCR-Produktgröße von Chr. 11b
<i>D11Agl1</i>	78,0	440 bp	523 bp
<i>D11Mit67</i>	57,0	134 bp	150 bp
<i>D11Mit29</i>	40,0	140 bp	160 bp
<i>D11Mit21</i>	20,0	157 bp	174 bp
<i>D11Mit63</i>	2,0	151 bp	163 bp

Tabelle 7. Zuordnung der PCR-Produkte zu den untersuchten polymorphen Marker auf den Chromosomen 11a und 11b.

Schema der PCR-Reaktionsansätze zur Analyse aller Marker:

12,5 µl 2 x PCR Master Mix (#K0171, Fermentas)

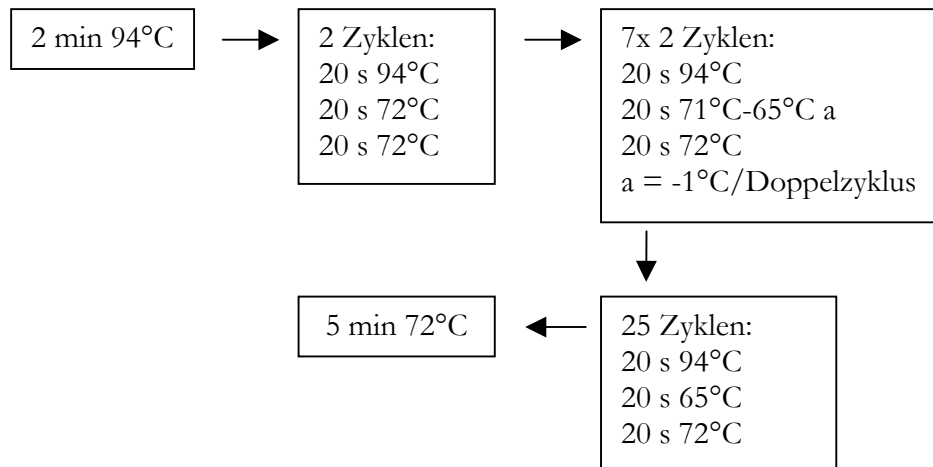
0,5 µl Primer Marker.fwd (10 pmol/µl)

0,5 µl Primer Marker.rev (10 pmol/µl)

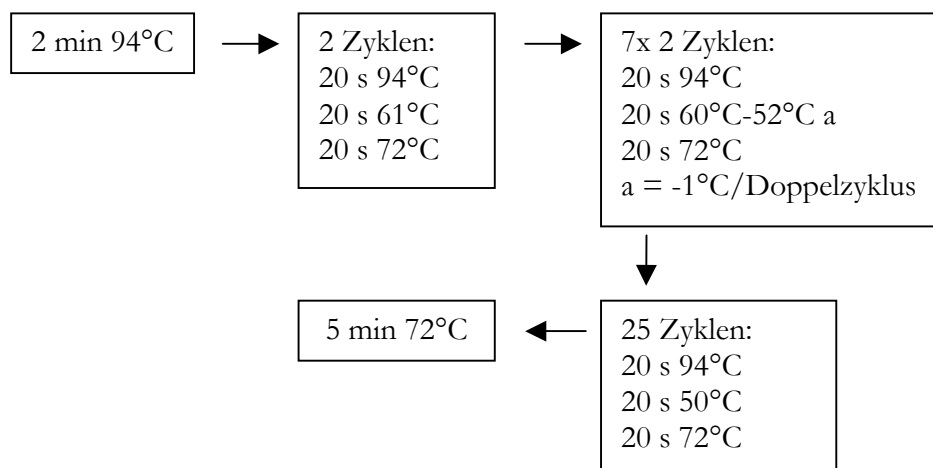
10,0 µl template-DNA

nukleasefreies Wasser ad 25 µl.

Zur Amplifikation des LOH-Markerbereiches *D11Agl1* wurde das folgende PCR Programm verwendet:



Zur Amplifikation der LOH-Markerbereiche *D11Mit67*, *D11Mit29*, *D11Mit21* und *D11Mit63* wurde das folgende PCR-Programm verwendet:



Auswertung

Zur Analyse der Amplifikationsprodukte des Markers *D11Agl1* wurden nach der PCR 4 µl Ladepuffer und 12 µl PCR-Produkt gemischt, auf ein 1,5 %-iges Agarosegel (NEEO) aufgetragen und eine 45-minütige Elektrophorese bei 80 V durchgeführt. 12 µl der Amplifikationsprodukte der Marker *D11Mit67*, *D11Mit29*, *D11Mit21* und *D11Mit63* wurden nach der PCR ebenfalls mit 4 µl Ladepuffer versetzt, auf ein 2 %-iges Agarosegel (NEEO) aufgetragen und durch eine 90-minütige Elektrophorese bei 200 V getrennt. Ein Verlust der Heterozygotie wurde dann festgestellt, wenn im Bandenspektrum der PCR nur ein PCR-Produkt zu erkennen war.

2.2.7 Bestimmung der Zytotoxizität durch Koloniebildungsfähigkeit

Ein weiterer Test zur Überprüfung der Zytotoxizität einer Substanz besteht in der Fähigkeit von Zellen, Kolonien als Maß für die Proliferation und Vitalität der Zellen zu bilden. Dabei wird nach der Behandlung mit der Testsubstanz eine definierte Zellzahl ausgesät und nach 10 Tagen die Anzahl der Kolonien als Maß für das Überleben der Zellen gezählt. Dieser Test wurde mit TK6-Zellen als Suspensionskultur in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Durchführung

Die TK6-Zellen wurden nach dem Auftauen 6 Tage in Medium kultiviert, wobei die Zelldichte jeden Tag auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt wurde. Die 24-stündige Behandlung der Zellen erfolgte bei der gleichen Zelldichte in Kulturmedium, das mit den im Test verwendeten Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches (0,01 mg/ml bis 0,16 mg/ml) versetzt war. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 200 μ M EMS behandelt.

Nach der Behandlung wurden die Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in einer Zelldichte von 13 Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in 200 μ l Portionen mit der Mehrkanalpipette auf zwei 96-well-Mikrotiterplatten verteilt, das ergibt statistisch 2,6 Zellen/well.

Auswertung

Die Platten wurden 14 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop ausgewertet. Gezählt wurden die mit einer Kolonie bewachsenen wells.

Die Berechnung der PE erfolgte nach der Formel:

$$PE = \frac{-\ln \left(\frac{EW}{TW} \right)}{2,6}$$

EW = Anzahl der leeren wells pro 96-well Platte

TW = Anzahl der wells pro Platte (=96)

2,6 = theoretisch ausgesäte Anzahl der Zellen pro well

Das relative Zellüberleben der behandelten Zellen ergab sich aus dem Verhältnis der PEs der behandelten und der unbehandelten Zellen, und wurde wie folgt berechnet:

$$\text{rel. PE} = \frac{\text{abs. PE}_{\text{Behandlung}}}{\text{abs. PE}_{\text{Kontrolle}}}$$

2.2.8 Bestimmung der Vitalität mittels Trypanblautest

Durch den in dieser Arbeit eingesetzten Vitalitätstest, die Trypanblaufärbung, lassen sich Membranschädigungen nachweisen (Lindl and Bauer, 1994) und somit tote Zellen anfärben.

Der saure Farbstoff Trypanblau dringt dabei durch die geschädigte Membran in tote Zellen ein und bindet als Anion leicht an Proteine. Die höchste Aufnahmefähigkeit besteht bei einem pH von 7,5.

Durchführung

Die Färbung der Zellen erfolgte mit 0,25 %-iger steriler angewärmter Trypanblaulösung, die im gleichen Mengenverhältnis eingesetzt wurde wie die Zellsuspension. Das Gemisch wurde ca. 3 min bei 37°C inkubiert.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte sofort in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mit einem inversen Lichtmikroskop. Gezählt wurden alle ungefärbten Zellen und alle Zellen, welche über eine leichte bis tiefblaue Färbung verfügten. Es wurde der prozentuale Anteil gefärbter Zellen mit Membranschädigungen an der Gesamtzahl der Zellen ermittelt.

2.2.9 Statistik

Um signifikante Unterschiede zwischen den Werten im Comet Assay zu erkennen, wurde der Student's t-Test angewendet.

Die statistische Überprüfung des Mikrokerntest erfolgte mit dem χ^2 -Test. Unterschieden wurde zwischen doppelkernigen Zellen ohne Mikrokern und doppelkernigen Zellen mit Mikrokern.

Für alle anderen Experimente wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt.

2.2.10 Ethikvotum

Das positive Votum der Ethikkommission zum Forschungsvorhaben „Gentoxizitätstestung komplexer Stoffgemische“ ist datiert auf den 07.07.1999 (Vorsitz: Prof. Dr. Sziegoleit).

2.2.11 Tierversuche

Die Tierversuche zur Herstellung von S9-Fraktion aus Rattenlebern und zur Gewinnung von Hepatozyten der Ratte und des Schweins zum Anlegen einer Primärzellkultur wurden nach Antragstellung genehmigt.

Genehmigungsnummern: I5G16; K6M5; K6IG1

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Identifizierung toxikologischer Leitsubstanzen und genotoxischer Wirkungen des komplexen Stoffgemisches

3.1.1 Untersuchungen zum strangbruchinduzierenden Potential des komplexen Stoffgemisches mit Hilfe des alkalischen Comet Assay

Der alkalische Comet Assay ist ein sensitiver Test zum Nachweis von Strangbrüchen und alkalilabilen Stellen in genomischer DNA anhand derer das genotoxische Potential einer Substanz bestimmt werden kann.

Für das komplexe Stoffgemisch, dessen Fraktionen und einzelne Substanzen sowie Modellgemische wurden Konzentrations-Wirkungsbeziehungen mit unterschiedlichen primären Zellkultursystemen erstellt.

3.1.1.1 Validierung des Auswertesystems mit dem komplexen Stoffgemisch

In früheren Arbeiten wurde der Einfluss des komplexen Stoffgemisches auf DNA-Schädigungen in humanen Lymphozyten, NHBEZ und Rattenhepatozyten bestimmt (Müller, 2000). Da in der hier durchgeführten Studie die Auswertemethodik (Software und Mikroskop) geändert wurde, war es notwendig, die Untersuchungen zur Überprüfung der Vergleichbarkeit zu wiederholen. Die Untersuchungen wurden mit und ohne S9-Mix als externes Metabolisierungssystem durchgeführt und die DNA-Schädigung in Form von DNA-Strangbrüchen in Abhängigkeit von der Konzentration des komplexen Stoffgemisches bestimmt (Abbildung 4 bis 6).

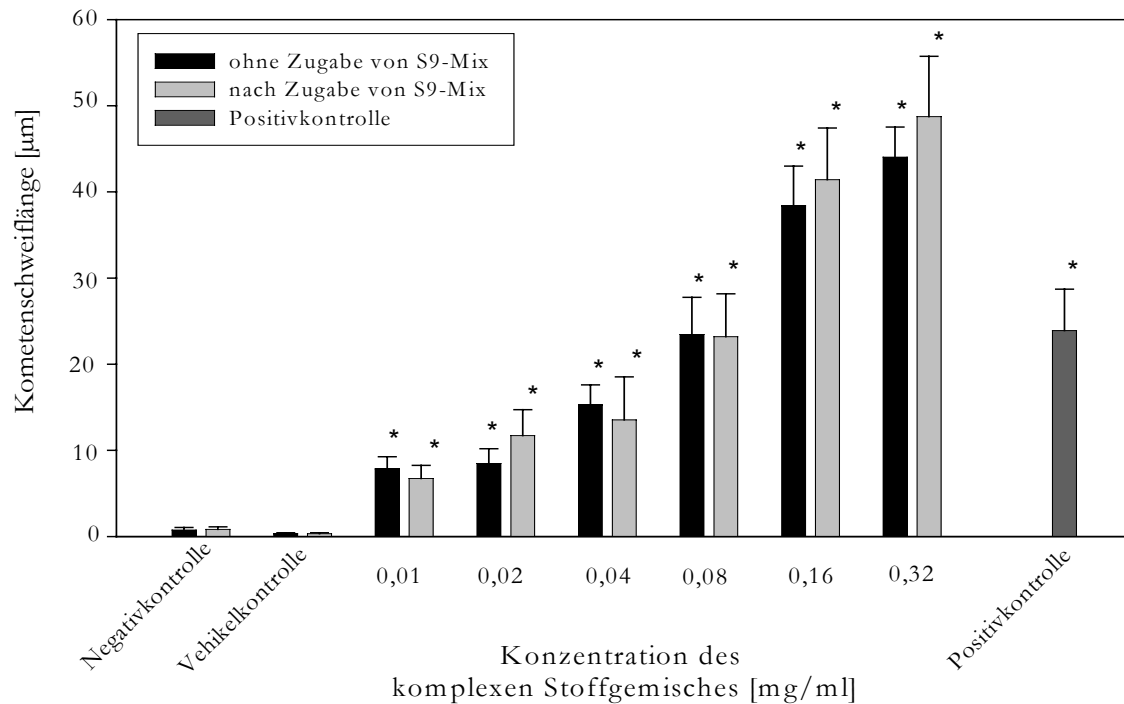


Abbildung 4. Abhängigkeit der DNA-Migration im Comet Assay von der Behandlung humaner Lymphozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches (1h). Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DMSO (56 µM) behandelt; Positivkontrolle: Zellsuspension mit H₂O₂ (300 µM) behandelt. Mittelwerte ± Standardabweichungen; * p ≤ 0,001 im Vergleich zur Negativkontrolle.

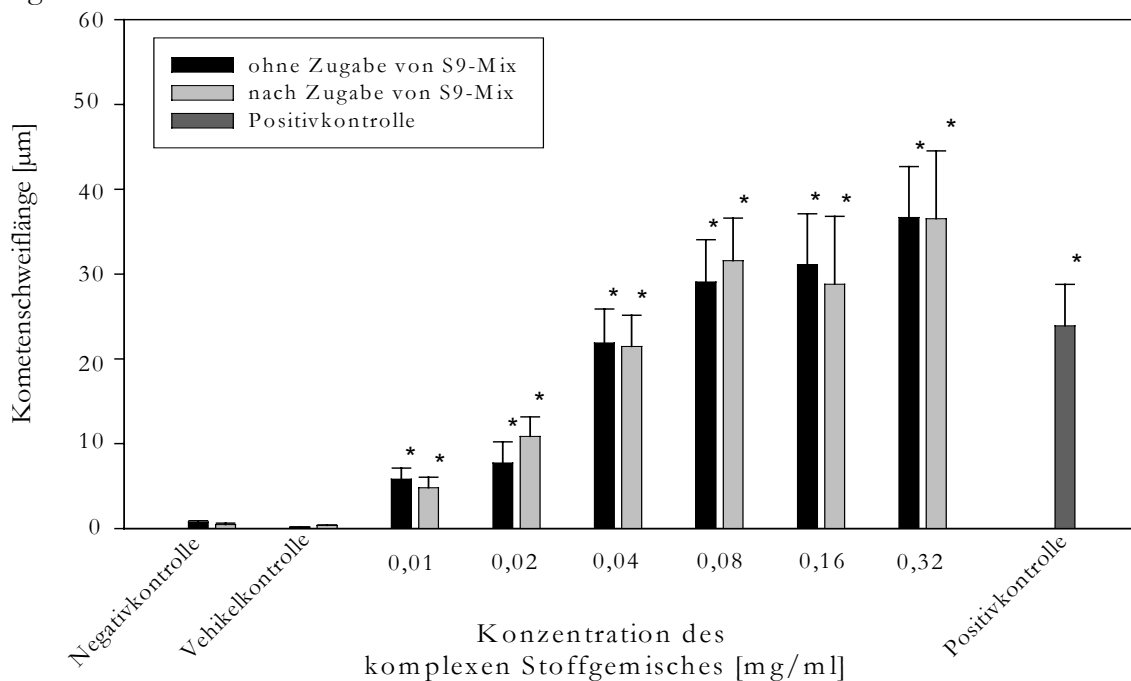


Abbildung 5. Abhängigkeit der DNA-Migration im Comet Assay von der Behandlung von NHBEZ mit unterschiedlichen Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches (1h). Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DMSO (56 µM) behandelt; Positivkontrolle: Zellsuspension mit H₂O₂ (300 µM) behandelt. Mittelwerte ± Standardabweichungen; * p ≤ 0,001 im Vergleich zur Negativkontrolle.

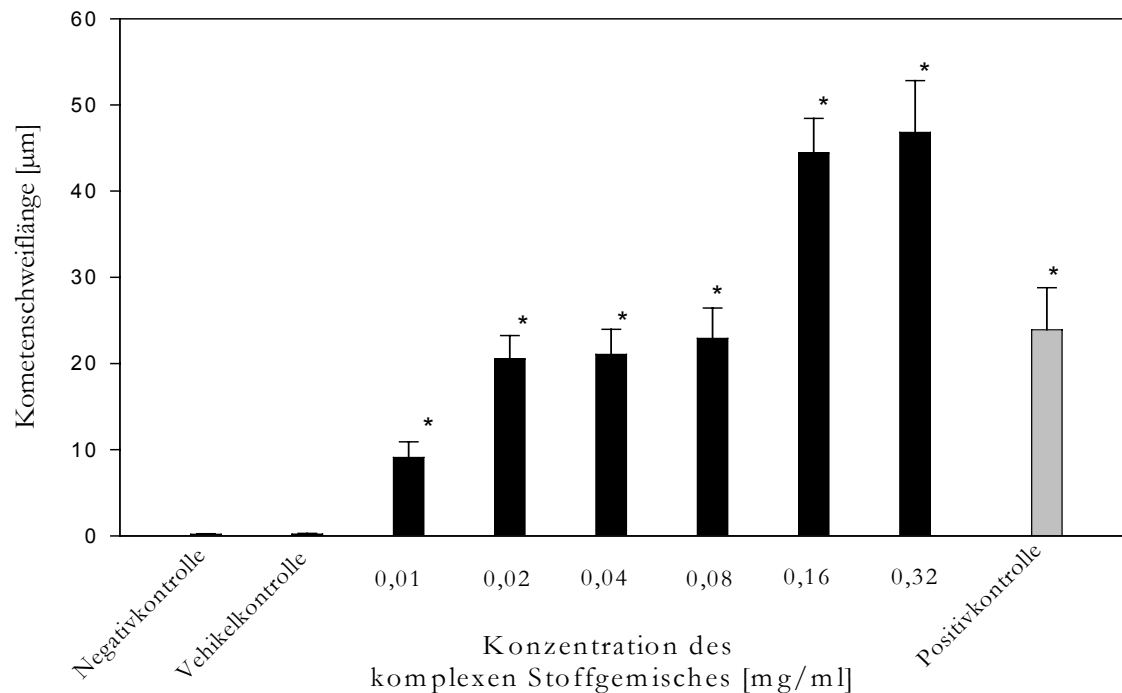


Abbildung 6. Abhängigkeit der DNA-Migration im Comet Assay von der Behandlung von Rattenhepatozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches (1h). Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DMSO (56 µM) behandelt; Positivkontrolle: Zellsuspension mit H₂O₂ (300 µM) behandelt. Mittelwerte ± Standardabweichungen; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kometenschweiflängen in allen Zelltypen proportional zur im Test eingesetzten Menge des komplexen Stoffgemisches anstiegen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen mit und ohne S9-Mix, so dass das Stoffgemisch als direkt gentoxisch zu charakterisieren ist (vgl. Abb. 4 und 5). Für Rattenhepatozyten war keine Zugabe von S9-Mix notwendig, da diese selbst über eine ausreichende Metabolisierungskapazität verfügen. Das als Vehikelkontrolle mitgeführte Lösungsmittel DMSO (56 µM Endkonzentration) löste keine DNA-Schädigungen aus. Dem gegenüber wurden in allen drei Zelltypen bereits bei der niedrigsten im Test verwendeten Konzentration des komplexen Stoffgemisches im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöhte DNA-Strangbruchraten ausgelöst.

Diese hier erzielten Ergebnisse stimmen mit Daten früherer Arbeiten überein (Müller, 2000). Durch den Einsatz des neuen Auswertesystems und -verfahrens konnte eine deutliche Zunahme der Auswertesensitivität erreicht werden. Aus diesem Grund wurde für die weitergehenden Untersuchungen nur noch das in dieser Arbeit beschriebene Auswertesystem verwendet (vgl. 2.2.4).

3.1.1.2 Induktion von DNA-Strangbrüchen durch fraktioniertes komplexes Stoffgemisch

Um Hinweise auf die toxikologischen Leitsubstanzen des komplexen Stoffgemisches zu erhalten, wurden drei verschiedene Fraktionen des Gemisches im Hinblick auf ihr Potential untersucht, DNA-Strangbrüche zu induzieren. Die Fraktionen wurden durch präparative Gaschromatographie hergestellt und sind analytisch sehr gut charakterisiert (vgl. 2.1.5). Der alkalische Comet Assay wurde mit und ohne Zusatz von S9-Mix durchgeführt.

Humanlymphozyten wurden entweder 2 h mit je 0,08 mg/ml Fraktion (Abb. 7) oder 1 h mit der doppelten Konzentration (Abb. 8) behandelt. Alle drei Fraktionen verursachten sowohl bei 0,08 mg/ml als auch bei 0,016 mg/ml signifikant erhöhte DNA-Strangbruchraten im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Fraktion #3 löste die höchste Anzahl an DNA-Strangbrüchen aus. In beiden Versuchsansätzen unterschied sich Fraktion #3 signifikant von Fraktionen #1 und #2 bezüglich der erhöhten genotoxischen Wirksamkeit. DCM in der Endkonzentration von 25 mM als Vehikelkontrolle löste keine zusätzlichen DNA-Strangbrüche in Humanlymphozyten aus.

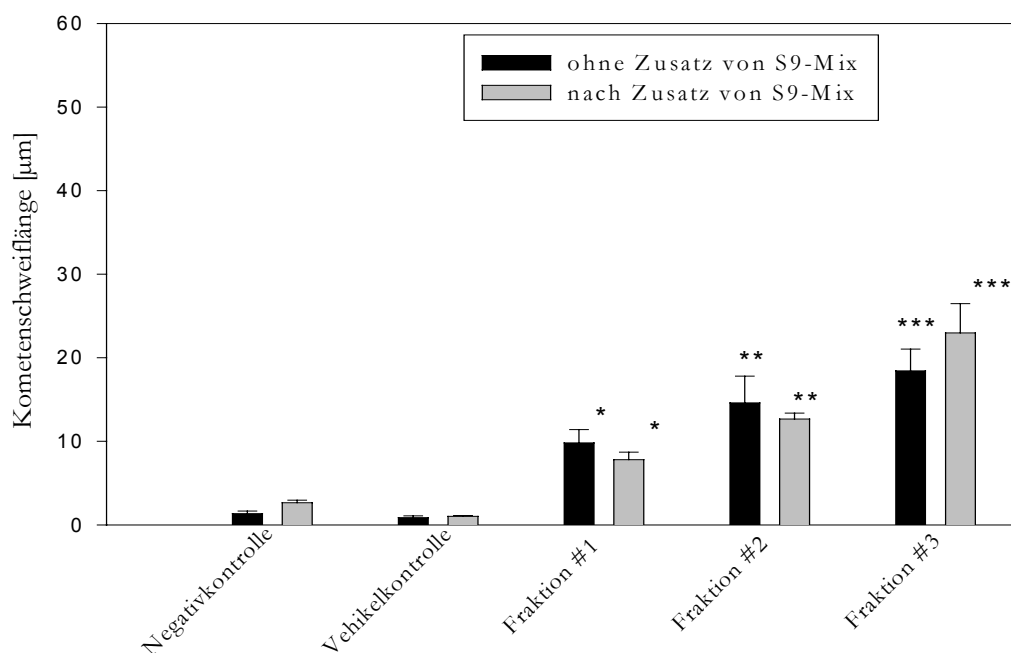


Abbildung 7. Induktion von DNA-Strangbrüchen (Comet Assay) in humanen Lymphozyten nach zweistündiger Behandlung mit den Fraktionen des komplexen Stoffgemisches, pro Fraktion wurden 0,08 mg/ml eingesetzt. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle; ** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle und Fraktion 1; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle und Fraktionen #1 und #2.

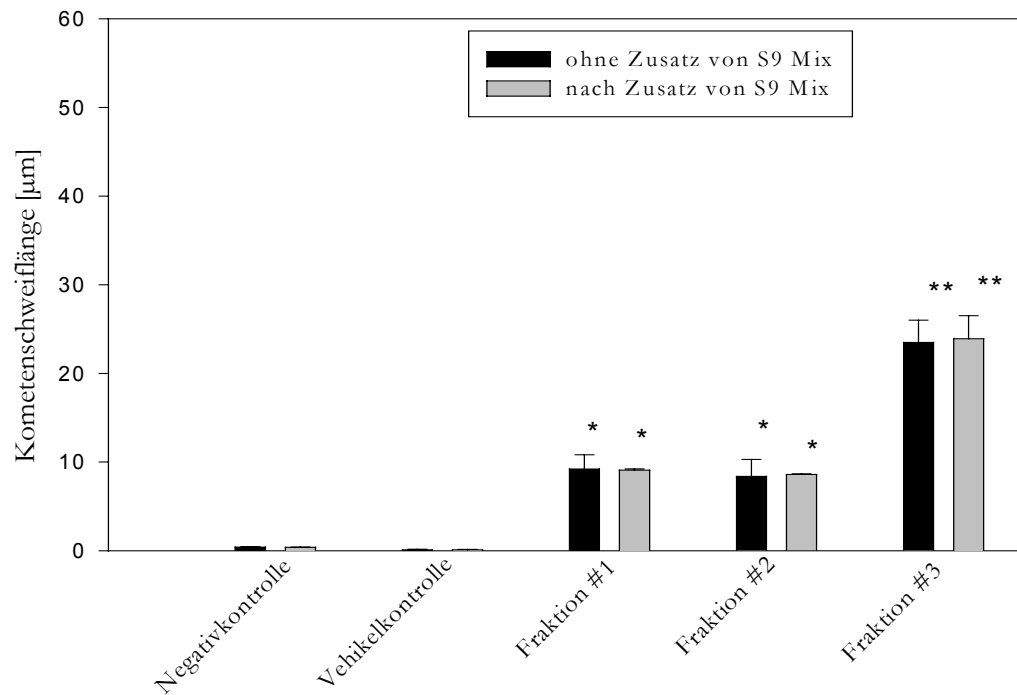


Abbildung 8. Induktion von DNA-Strangbrüchen (Comet Assay) in humanen Lymphozyten nach einstündiger Behandlung mit den Fraktionen des komplexen Stoffgemisches, pro Fraktion wurden 0,16 mg/ml eingesetzt. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle; ** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle und zu den Fraktionen #1 und #2.

Die Fraktionen wurden auch an NHBEZ getestet (Abbildungen 9 bis 11). Die 2-stündige Inkubation von NHBEZ mit jeweils 0,08 mg/ml der Fraktionen induzierte eine signifikante Erhöhung von DNA-Strangbrüchen (Abb. 9). Unter diesen Versuchsbedingungen konnte im Gegensatz zu den Experimenten mit Humanlymphozyten kein Unterschied hinsichtlich der genotoxischen Wirksamkeit zwischen den drei Fraktionen festgestellt werden. Erst nach Applikation von 0,16 mg/ml wurde ein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit zwischen Fraktion #1, #2 und #3 deutlich. Alle drei Fraktionen lösten nach 1- bzw. 2-stündiger Behandlung mit 0,16 mg/ml in NHBEZ im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöhte Kometenschweiflängen und damit erhöhte DNA-Schädigungen aus (Abb. 10 und 11). Dabei löste Fraktion #3 im Vergleich zu Fraktion #1 und #2 signifikant stärkere genotoxische Effekte aus.

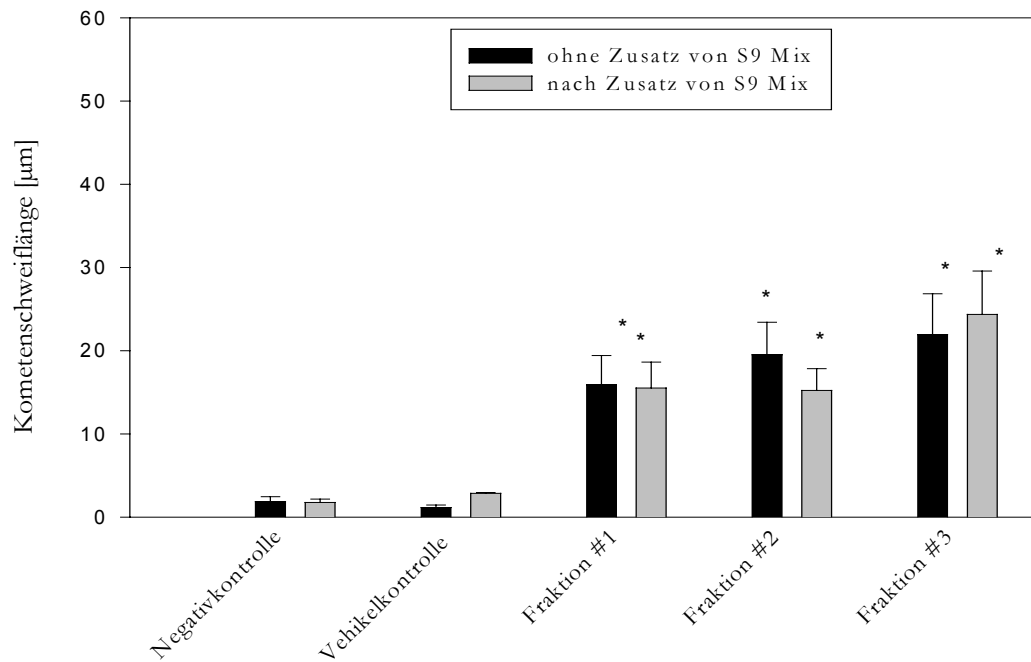


Abbildung 9. Induktion von DNA-Strangbrüchen (Comet Assay) in NHBEZ nach zweistündiger Behandlung mit den Fraktionen des komplexen Stoffgemisches, pro Fraktion wurden 0,08 mg/ml eingesetzt. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

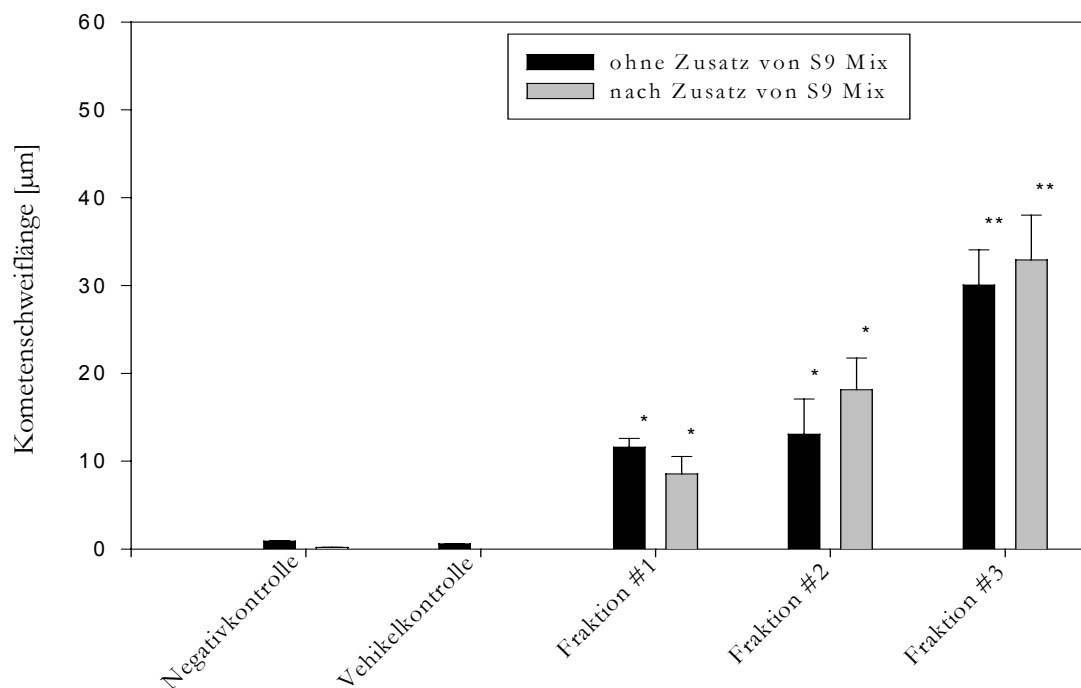


Abbildung 10. Induktion von DNA-Strangbrüchen (Comet Assay) in NHBEZ nach einstündiger Behandlung mit den Fraktionen des komplexen Stoffgemisches, pro Fraktion wurden 0,16 mg/ml eingesetzt. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle; ** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle und zu den Fraktionen #1 und #2.

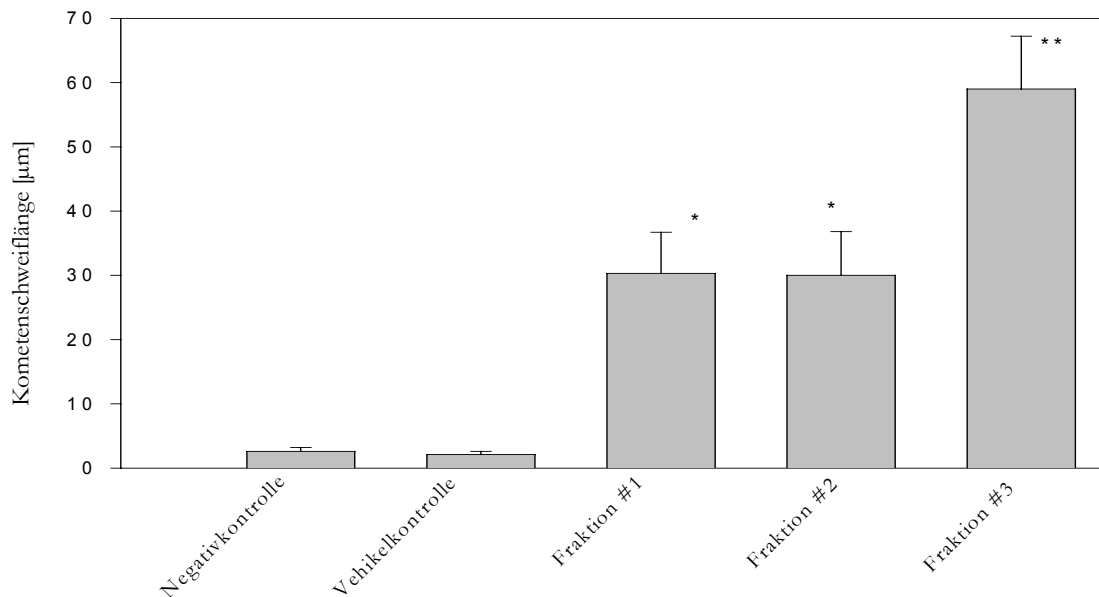


Abbildung 11. Induktion von DNA-Strangbrüchen (Comet Assay) in NHBEZ nach zweistündiger Behandlung mit den Fraktionen des komplexen Stoffgemisches, pro Fraktion wurden 0,16 mg/ml eingesetzt. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle; ** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle und zu den Fraktionen #1 und #2.

Da in den Experimenten zur Charakterisierung des komplexen Stoffgemisches und der Fraktionen in Humanlymphozyten und NHBEZ keine indirekten gentoxischen Effekte nachweisbar waren, wurde bei der 2-stündigen Gabe von 0,16 mg/ml der Fraktionen auf den Zusatz von S9-Mix als Metabolisierungssystem verzichtet (Abb. 11). DCM als Vehikelkontrolle (25 mM Endkonzentration) wirkte nicht gentoxisch.

Auch in Rattenhepatozyten löste Fraktion #3 im Vergleich zu den anderen beiden Fraktionen signifikant höhere DNA-toxische Effekte aus (Abb. 12).

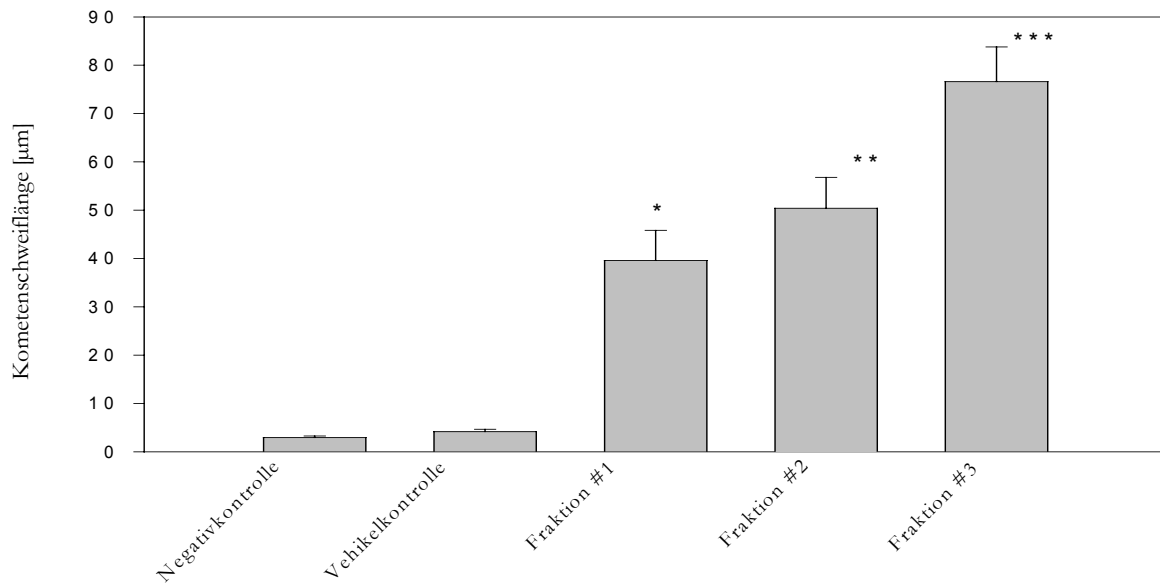


Abbildung 12. Induktion von DNA-Strangbrüchen (Comet Assay) in Rattenhepatozyten nach einstündiger Behandlung mit den Fraktionen des komplexen Stoffgemisches, pro Fraktion wurden 0,16 mg/ml eingesetzt. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle; ** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle und zur Fraktion #1; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle und zu den Fraktionen #1 und #2.

Die Charakterisierung des DNA-strangbruchinduzierenden Potentials der drei Fraktionen des Stoffgemisches ergab, dass alle Fraktionen Substanzen enthalten, die DNA-Schädigungen in Form von DNA-Strangbrüchen in den ausgewählten Testsystemen auslösten. Dabei verursachte die Fraktion #3 in allen drei Testsystemen signifikant höhere Schäden im Vergleich zu den Fraktionen #1 und #2. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden in den nachfolgenden Experimenten zur Identifizierung toxikologischer Leitsubstanzen im komplexen Stoffgemisch die Komponenten der Fraktion #3 näher untersucht. Da sich die Ergebnisse der zwei verschiedenen Konzentrationen und der verschiedenen Behandlungszeiten in allen drei Zellkultursystemen nicht unterschieden, wurde die Behandlungszeit auf 1 h und die Konzentration der im Test eingesetzten Substanzen auf 0,16 mg/ml festgelegt.

3.1.1.3 Identifizierung der Komponenten der Fraktion #3 durch chemisch-analytische Untersuchungen

Die hier durchgeführten gentoxikologischen Untersuchungen zeigten, dass die Fraktion #3 offensichtlich die Substanzen des komplexen Stoffgemisches mit dem größten gentoxischen Potential beinhaltet. Aus diesem Grund sollten die in dieser Fraktion enthaltenen Einzelsubstanzen isoliert und identifiziert werden. Die Komponenten der Fraktion #3 wurden bereits in einer früheren Untersuchung identifiziert (vgl. Tab. 3). Zur Erfassung möglicher lagerungsbedingter Veränderung der Zusammensetzung war eine erneute chemisch-analytische Untersuchung der Fraktion notwendig. Verschiedene Methoden- bzw. Geräteparameter wurden zur Optimierung der Trennung der Fraktion variiert, um eine ausreichende Abtrennung und Quantifizierung der interessierenden Komponenten bei möglichst geringer Laufzeit zu ermöglichen. Eine auch über Retentionsindexbestimmung angestrebte Identifizierung weiterer Komponenten gelang bislang nicht. Leider konnten nicht alle der in früheren Untersuchungen in der Fraktion #3 quantifizierten Komponenten als Vergleichssubstanz oder Standard für eine Quantifizierung beschafft werden.

Die Messungen am GC-FID wurden bei höchster Empfindlichkeit durchgeführt. Diese reichte jedoch nicht aus, um alle in der Fraktion #3 bzw. in Kalibrierlösungen enthaltenen Substanzen und Konzentrationen zu detektieren. So konnten im interessierenden Konzentrationsbereich von den 7 enthaltenen chlorierten Kohlenwasserstoffen lediglich 4 Verbindungen (Hexachlorcyclopentadien, Pentachlorpyridin, Octachlorcyclopenten und Hexachlorbenzol) sowie Dibromacenaphthen als interner Standard detektiert werden. Außerdem schwankten die Werte trotz Autosamplerbetrieb stark, so dass von weiteren Messungen mit FID abgesehen und die Untersuchungen mittels GC-MS durchgeführt wurden. Die Abb. 13 zeigt ein GC/MSD-Chromatogramm der Fraktion #3.

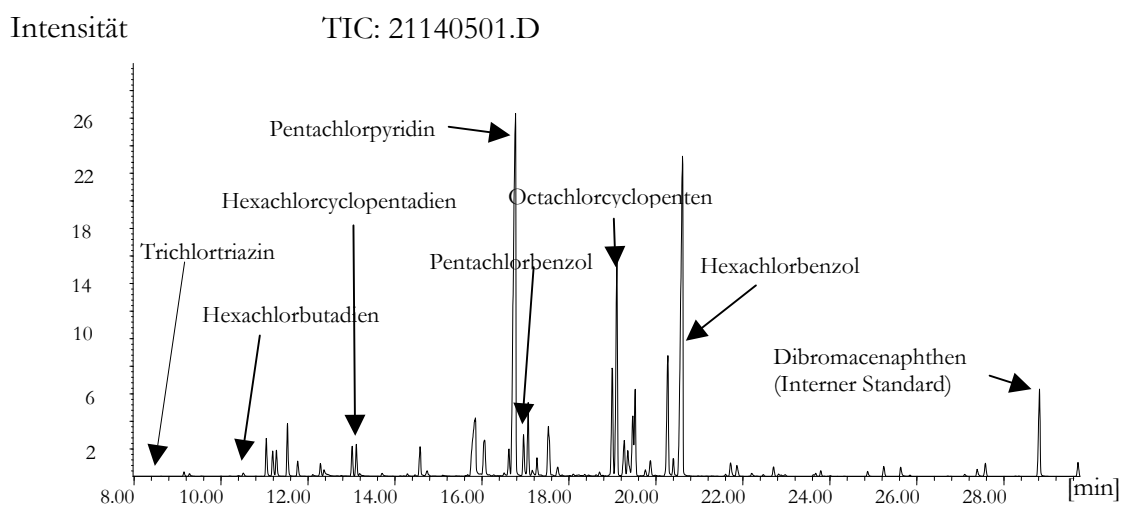


Abbildung 13. Totalionenstromchromatogramm der Fraktion #3.

Die ermittelten Konzentrationsverhältnisse der Komponenten zueinander entsprachen in den meisten Fällen den bereits in früheren Analysen in der Fraktion #3 angegebenen Konzentrationen, einige jedoch, z.B. Pentachlorbenzol oder Hexachlorbenzol, zeigten Abweichungen (vgl. Tab. 8). Da die vor einigen Jahren ermittelten Konzentrationen nicht mehr den aktuellen Werten entsprachen wurde in den weiteren Untersuchungen mit den aktuellen Konzentrationen der Fraktion #3 gearbeitet.

Substanz	GC/ITD Frühere Untersuchungen	GC/MSD (SIM) Kalibration mit ext. Standard	GC/MSD (SIM) Kalibration mit int. Standard	GC/MSD (SCAN) Kalibration mit int. Standard
Trichlortriazin	0,99	0,61	0,60	0,64
Hexachlorbutadien	0,35	0,08	0,08	0,10
Hexachlorcyclopentadien	3,66	1,60	1,56	1,79
Pentachlorpyridin	69,80	20,10	19,80	23,90
Pentachlorbenzol	0,76	0,16	0,15	0,17
Octachlorcyclopenten	37,20	n.b.	n.b.	22,90
Hexachlorbenzol	104,70	27,50	27,10	35,20

Tabelle 8. Ergebnisse der Quantifizierung ausgewählter chlorierter Kohlenwasserstoffe der Fraktion #3 in mg/l (n.b.- nicht bestimmbar)

3.1.1.4 Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Einzelsubstanzen der Fraktion #3

Um weitere Hinweise auf die toxikologischen Leitsubstanzen des hier untersuchten komplexen Stoffgemisches zu erhalten, wurde das strangbruchinduzierende Potential der verfügbaren

Einzelkomponenten der Fraktion #3 mit Hilfe des Comet Assays an humanen Lymphozyten charakterisiert.

Die Substanzen wurden in den jeweiligen Konzentrationen eingesetzt, in denen sie in der Fraktion #3 bei Applikation von 0,16 mg/ml vorhanden waren. Diese Angaben waren nach chemischer Analyse der Fraktion bekannt (für Konzentrationen vgl. Tab. 5).

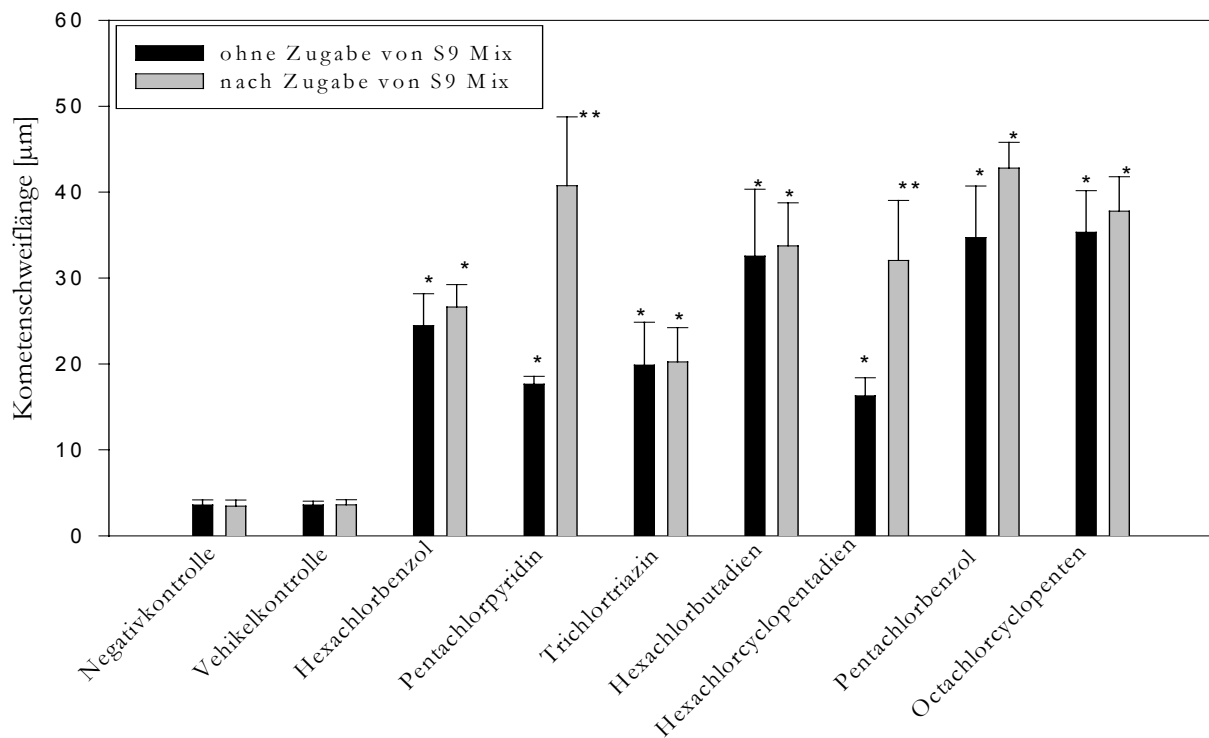


Abbildung 14. Abhängigkeit der DNA-Migration im Comet Assay nach einstündiger Behandlung humaner Lymphozyten von den in der Fraktion #3 vorhandenen, verfügbaren Einzelsubstanzen. Es wurden die Substanzen in den Konzentrationen getestet, in denen sie in 0,16 mg/ml der Fraktion #3 des Stoffgemisches enthalten waren (vgl. Tab. 8). Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle; ** $p \leq 0,001$ im Vergleich im Vergleich zur Negativkontrolle und zum Ergebnis ohne Zugabe von S9 Mix

Alle Einzelkomponenten lösten in der getesteten Konzentration signifikant erhöhte DNA-Schädigungen in humanen Lymphozyten im Vergleich zu den Negativkontrollen aus. Hexachlorbutadien, Octachlorcyclopenten und Pentachlorbenzol bewirkten im Vergleich zu den übrigen Substanzen in diesem Test die stärksten DNA-Schädigungen. Auf der Ebene der Einzelkomponenten war auch eine Aktivierung zweier Substanzen des Gemisches durch das extrametabolisierende System (S9-Mix) zu erkennen. Pentachlorpyridin und Hexachlorcyclopentadien lösten bei Zugabe von S9-Mix signifikant höhere DNA-Schäden im Vergleich zu der Inkubation ohne S9-Mix aus (Abb. 14).

3.1.1.5 Induktion von DNA-Strangbrüchen durch 2-Komponenten-Modellgemische

Um Aufschluss über die synergistischen bzw. antagonistischen Wirken der Einzelsubstanzen im Gemisch zu erhalten, wurde das DNA-Strangbruch induzierende Potential der Modellgemische im Comet Assay mit humanen Lymphozyten bestimmt. Die Konzentration der einzelnen Substanzen entsprach dem Gehalt in 0,16 mg/ml der Fraktion #3.

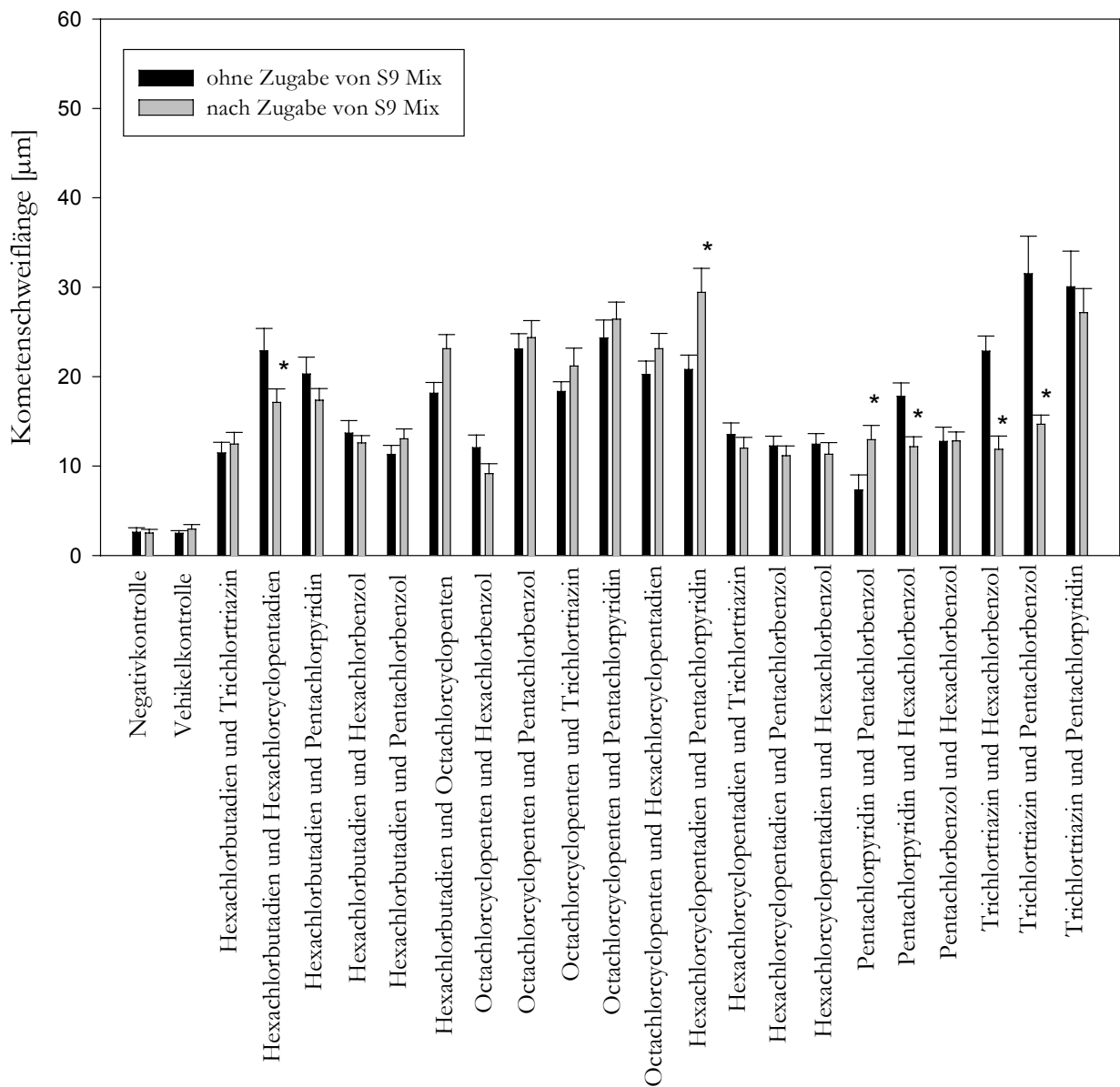


Abbildung 15. Abhängigkeit der DNA-Migration im Comet Assay von der Behandlung humaner Lymphozyten mit den 2-Komponenten-Modellgemischen. Es wurden die Modellgemische in den Konzentrationen getestet, in denen sie in 0,16 mg/ml der Fraktion #3 des Stoffgemisches enthalten waren. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; alle getesteten Modellgemische $p \leq 0,005$ im Vergleich zur Negativkontrolle; * $p \leq 0,005$ im Vergleich zur Behandlung ohne S9 Mix.

Alle in dieser Konzentration getesteten Modellgemische lösten in humanen Lymphozyten signifikant erhöhte DNA-Schäden aus. Dabei waren die meisten gentoxischen Wirkungen der getesteten Kombinationen deutlich geringer als die der Einzelstoffe. Bei dem Modellgemisch aus Pentachlorpyridin und Hexachlorcyclopentadien bestätigten sich die Voruntersuchungen zur indirekten Gentoxizität. Nach Zugabe des externen Metabolisierungssystems wurden signifikant höhere DNA-Schädigungen registriert (Abb.15). Bei einigen Modellgemischen wurden aber auch Entgiftungsreaktionen nach Zugabe des S9-Mix beobachtet. So wurden für die Modellgemische aus Hexachlorbutadien und Hexachlorcyclopentadien, Pentachlorpyridin und Hexachlorbenzol und Trichlortriazin im Gemisch mit Hexachlorbenzol bzw. Pentachlorbenzol signifikant niedrigere Schäden nach Zugabe des S9-Mix beobachtet als ohne S9-Mix. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass überwiegend Gemische, die die Komponenten Octachlorcyclopenten, Pentachlorpyridin und / oder Trichlortriazin enthielten, häufiger DNA-Strangbrüche auslösten als Gemische, die andere Komponenten enthielten.

3.1.1.6 Gaschromatographische Überprüfung der 2-Komponenten Modellgemische

Um die Authentizität der verwendeten Modellgemische sicher zu stellen, wurden die Konzentrationen der Einzelsubstanzen in den präparierten Gemischen durch Gaschromatographie bestimmt. Es ergab sich, dass die gewünschten Konzentrationen in guter Annäherung erreicht wurden (Tab. 9).

Mix #	Substanzen	Zielkonzentrationen der Modellgemische [$\mu\text{g/ml}$]	gemessene Konzentration der hergestellten Gemische [$\mu\text{g/ml}$]
Mix 01	Hexachlorbutadien Trichlortriazin	0,05 0,1	0,05 0,075
Mix 02	Hexachlorbutadien Hexachlorcyclopentadien	0,05 0,5	0,05 0,5
Mix 03	Hexachlorbutadien Pentachlorpyridin	0,05 10	0,05 9,72
Mix 04	Hexachlorbutadien Hexachlorbenzol	0,05 14,9	0,045 16,42
Mix 05	Hexachlorbutadien Pentachlorbenzol	0,05 0,1	0,058 0,11
Mix 06	Hexachlorbutadien Octachlorcyclopenten	0,05 5	0,05 5,77
Mix 07	Octachlorcyclopenten Hexachlorbenzol	5 13,9	5,23 13,03
Mix 08	Octachlorcyclopenten Pentachlorbenzol	5 0,1	6,06 0,1
Mix 09	Octachlorcyclopenten Trichlortriazin	5 0,13	5,75 0,13
Mix 10	Trichlortriazin Pentachlorbenzol	0,1 0,076	0,08 0,07
Mix 11	Trichlortriazin Pentachlorpyridin	0,1 6,96	0,08 7,08
Mix 12	Hexachlorcyclopentadien Pentachlorpyridin	0,5 9,4	0,34 9,34
Mix 13	Octachlorcyclopenten Pentachlorpyridin	5 9,1	5,29 8,8
Mix 14	Octachlorcyclopenten Hexachlorcyclopentadien	5 0,48	4,36 0,83
Mix 15	Hexachlorcyclopentadien Trichlortriazin	0,5 0,13	0,37 0,24
Mix 17	Hexachlorcyclopentadien Hexachlorbenzol	0,5 14,27	0,36 16,83
Mix 18	Pentachlorpyridin Pentachlorbenzol	10 0,11	10,5 0,11
Mix 19	Pentachlorpyridin Hexachlorbenzol	10 15,18	10,03 13,93
Mix 20	Pentachlorbenzol Hexachlorbenzol	0,1 13,9	0,1 14,4
Mix 21	Trichlortriazin Hexachlorbenzol	0,1 10,57	0,11 9,62

Tabelle 9. Ergebnisse der gaschromatographische Überprüfung der Modellgemische. Gegenüberstellung der Zielkonzentration und der nachgewiesenen Konzentrationen.

3.1.2 Untersuchungen zum DNA-Doppelstrangbruch induzierenden Potential des komplexen Stoffgemisches mit Hilfe des neutralen Comet Assay

Die Erfassung von DNA-Doppelstrangbrüchen, die durch das komplexe Stoffgemisch ausgelöst wurden, erfolgte mit dem neutralen Comet Assay, der sich methodisch vom alkalischen Comet Assay nur in der Durchführung der Elektrophorese unterscheidet (vgl. 2.2.4.2). Der Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen ist für die Aussage über das mutagene Potential des komplexen Stoffgemisches von Bedeutung, da für diese Schäden an der DNA in der Zelle die Reparaturprozesse schwieriger und unzuverlässiger sind als für Einzelstrangbrüche.

3.1.2.1 Validierung des Testsystems

Humane Lymphozyten wurden mit Wasserstoffperoxid, das an der DNA nur Einzelstrangbrüche auslöst, behandelt und anschließend wurde die DNA-Migration im neutralen Comet Assay beobachtet. Einzelstrangbrüche waren erwartungsgemäß mit dem neutralen Comet Assay nicht erkennbar.

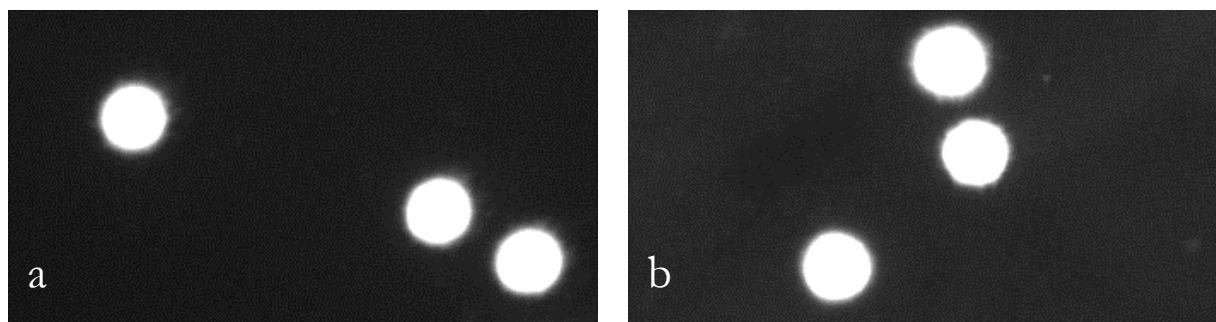


Abbildung 16. Mikroskopische Aufnahmen (400-fache Vergrößerung) humaner Lymphozyten im neutralen Comet Assay. a) nach einstündiger Behandlung mit 40 μM H_2O_2 ; b) Negativkontrolle ohne Behandlung

Zum Vergleich wurde der Test einmal unter alkalischen zum anderen unter neutralen Bedingungen durchgeführt. Während nach Wasserstoffperoxidbehandlung im alkalischen Comet Assay an humanen Lymphozyten deutlich DNA-Einzelstrangbrüche nachweisbar waren, wurden im neutralen Comet Assay keine Einzelstrangbrüche in Form von Kometenschweifen sichtbar (Abb. 17). Der Test war damit validiert.

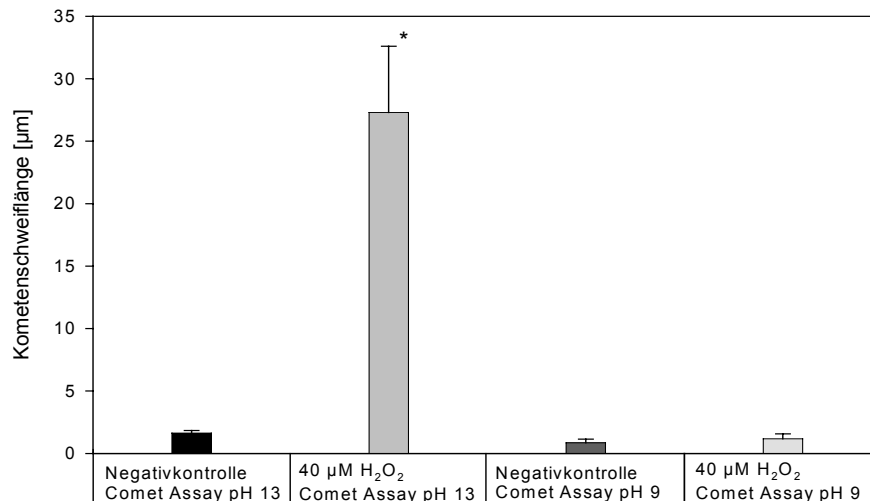


Abbildung 17. Induktion von DNA-Schädigung im alkalischen und neutralen Comet Assay nach einstündiger Behandlung von humanen Lymphozyten mit 40 µM H₂O₂.

3.1.2.2 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch das komplexe Stoffgemisch in TK6-Zellen

Der Einfluss des komplexen Stoffgemisches auf das DNA-Doppelstrangbruch-induzierende Potential wurde zuerst an der humanen lymphoblastoiden Zelllinie TK6 mit dem Ziel untersucht, die Sensitivität der Zellen gegenüber dem komplexen Stoffgemisch im neutralen Comet Assay zu prüfen. Das komplexe Stoffgemisch induzierte bereits ab der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,01 mg/ml signifikant erhöhte Raten an DNA-Doppelstrangbrüchen. Die Kometenschweiflänge nahm mit steigender Konzentration des komplexen Stoffgemisches zu (Abb. 18). Höhere Konzentrationen als 0,08 mg/ml konnten nicht getestet werden, da die Zellen ab einer Konzentration von 0,16 mg/ml über eine Vitalität von $\leq 85\%$ verfügten, so dass falsch-positive Ergebnisse nicht hätten ausgeschlossen werden können.

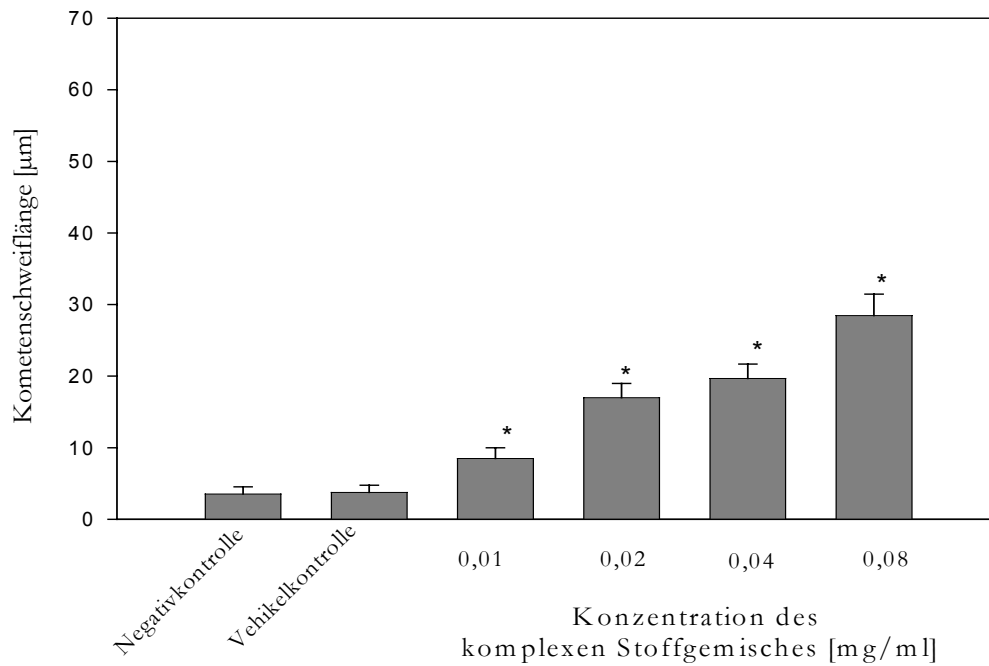


Abbildung 18. Abhängigkeit der DNA-Migration im neutralen Comet Assay von der Behandlung von TK6-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DMSO (56 µM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

3.1.2.3 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch das komplexe Stoffgemisch in humanen Lymphozyten

Das komplexe Stoffgemisch löste auch in humanen Lymphozyten mit steigenden Konzentrationen zunehmend DNA-Doppelstrangbrüche aus (Abb. 19). Da die Zytotoxizität des komplexen Stoffgemisches gegenüber den humanen Lymphozyten nicht so stark ausgeprägt war wie bei TK6-Zellen (Abb. 18), konnte der getestete Konzentrationsbereich des komplexen Stoffgemisches bis 0,32 mg/ml ausgedehnt werden. Die Sensitivität der humanen Lymphozyten gegenüber dem komplexen Stoffgemisch war der der TK6-Zellen vergleichbar.

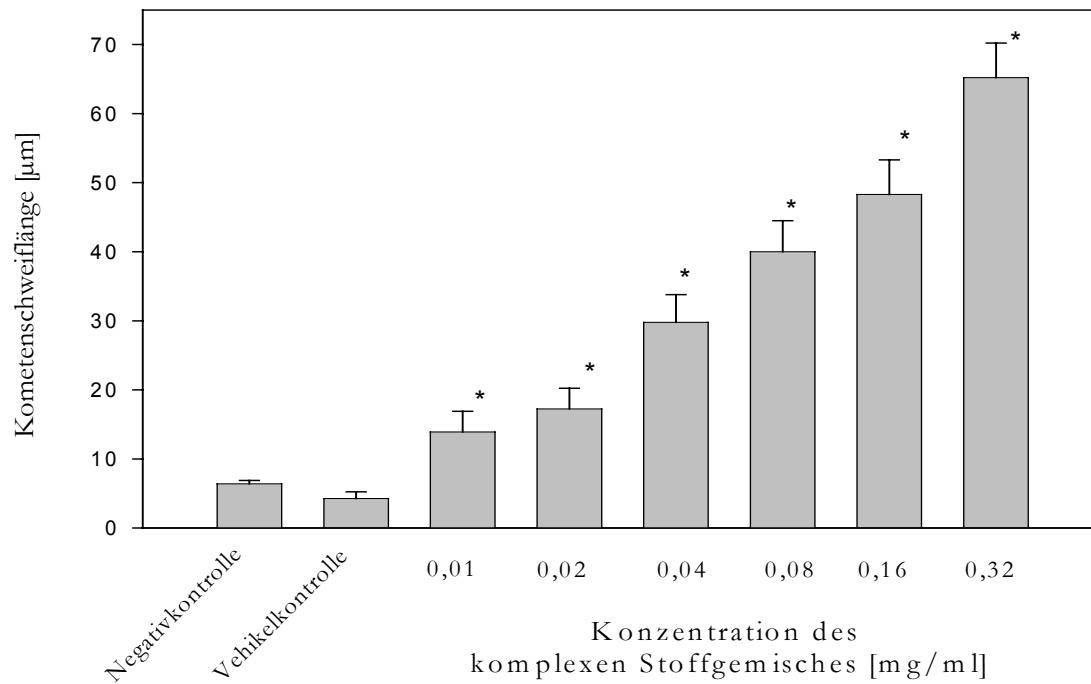


Abbildung 19. Abhängigkeit der DNA-Migration im neutralen Comet Assay von der Behandlung humaner Lymphozyten mit ansteigenden Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DMSO (56 µM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

Ein direkter quantitativer Vergleich zwischen neutralem und alkalischem Comet Assay ist nicht möglich, da sich beide Tests methodisch unterscheiden. Das wichtigste Resultat dieser Untersuchungen war der Nachweis der konzentrationsabhängigen Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in beiden getesteten Zellkultursystemen.

3.1.3 Untersuchungen zur Induktion von Chromosomenmutationen mit Hilfe des Mikrokerntests

Zum Nachweis aberrationsauslösender Effekte wurde der Mikrokerntest durchgeführt. Dabei wurden sowohl das Stoffgemisch als auch die Fraktionen und die Einzelsubstanzen in diesem Test geprüft. Als Maß für die Chromosomen-Schädigung wurden das Auftreten von Mikrokernen in proliferierenden Humanlymphozyten beobachtet und die Mikrokernraten bestimmt.

3.1.3.1 Validierung des Auswertesystems mit dem komplexen Stoffgemisch

Untersuchungen zum aberrationsauslösenden Potential des komplexen Stoffgemisches wurden bereits früher durchgeführt (Müller, 2000). Aufgrund des Wechsels des Auswertesystems mussten die Studien wiederholt werden, um die Vergleichbarkeit der nach dem neuen System erhobenen Daten mit denen aus früheren Arbeiten zu gewährleisten.

In primären humanen Lymphozyten nahm der Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen gegenüber der Negativkontrolle nach der Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches zu. Bereits nach Gabe niedriger Konzentrationen, ab 0,02 mg/ml, wurde eine signifikante Erhöhung der Zahl mikrokernhaltiger Lymphozyten beobachtet. Die Vehikelkontrolle mit DMSO in der Endkonzentration von 56 µM blieb ohne nachweisbare Effekte. Die mitgeführte Positivkontrolle von 0,5 M MMC löste wie erwartet signifikant erhöhte Mikrokernraten im Vergleich zur Negativkontrolle aus (Abb. 20).

Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten früherer Arbeiten überein, so dass das neue Auswertesystem im Weiteren für die *in vitro* Mikrokernuntersuchung verwendet wurde.

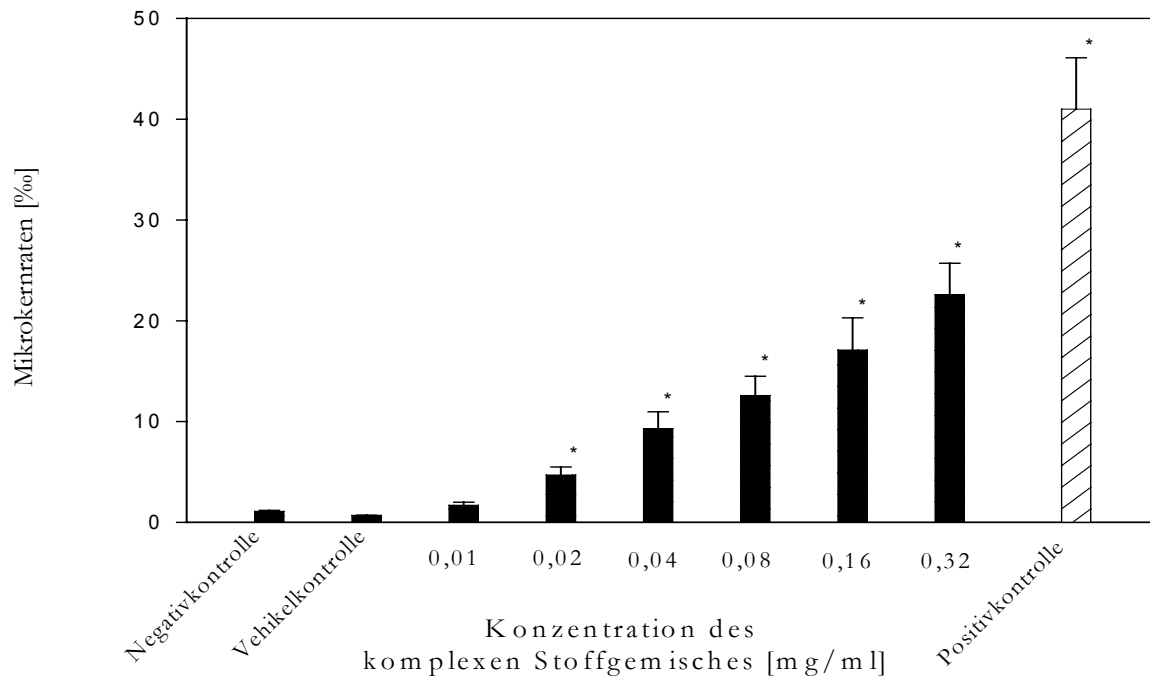


Abbildung 20. Abhängigkeit der Anzahl von Mikronuklei in humanen Lymphozyten von der Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DMSO (56 μ M) behandelt; Positivkontrolle: Zellsuspension mit MMC (0,5 M) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle. Mikrokernraten in ‰ angegeben, pro 1000 ausgezählter doppelkerniger Zellen.

3.1.3.2 Induktion von Mikronuklei durch Fraktionen des komplexen Stoffgemisches

Um Aufschluss über die toxikologischen Leitsubstanzen zu erhalten, wurde der Einfluss der drei Fraktionen des komplexen Stoffgemisches auf die Induktion von chromosomalen Aberrationen in Humanlymphozyten nach Behandlung mit je 0,16 mg/ml Fraktion im Mikrokernstest untersucht. Die beiden Fraktionen #2 und #3 lösten eine gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöhte Chromosomenaberrationsrate aus, wobei Fraktion #3 die stärkste Wirkung hatte. Für Fraktion #1 konnte kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle nachgewiesen werden (Abb. 21). Da diese Ergebnisse die im alkalischen Comet Assay erhobenen Daten bestätigten, lassen sie den Schluss zu, dass die Fraktion #3 die genotoxisch wirksamste Fraktion ist. Daher wurde für die weiteren Untersuchungen der Einzelkomponenten der Schwerpunkt auf die in der Fraktion #3 enthaltenen Substanzen gelegt.

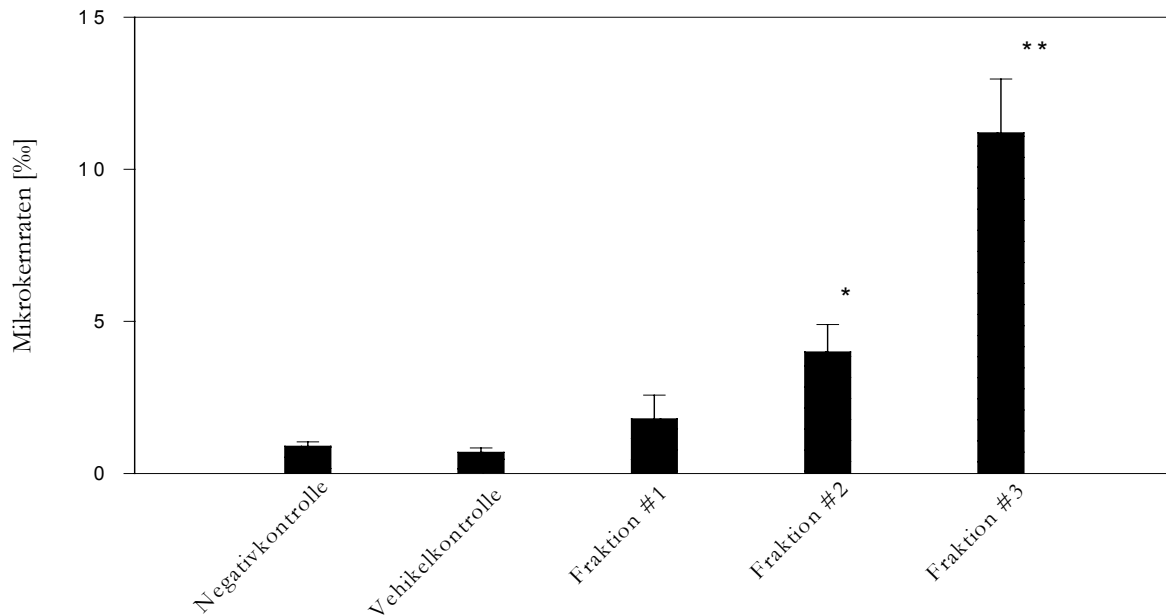


Abbildung 21. Induktion von Mikronuklei in humanen Lymphozyten nach 24-stündiger Behandlung mit den Fraktionen des komplexen Stoffgemisches, pro Fraktion wurden 0,16 mg/ml eingesetzt. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle; ** $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle und den Fraktionen #1 und #2. Mikrokernraten in ‰ angegeben (Anzahl pro 1000 ausgezählter doppelkerniger Zellen).

3.1.3.3 Induktion von Chromosomenaberrationen durch Einzelsubstanzen der Fraktion #3

Im Hinblick auf die Identifizierung der toxikologischen Leitsubstanzen wurden im Mikrokerntest humane Lymphozyten mit den verfügbaren Einzelkomponenten in den Konzentrationen behandelt, in denen sie in 0,16 mg/ml der Fraktion #3 vorlagen (vgl. Tab. 5). Alle Komponenten in den getesteten Konzentrationen induzierten gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte Mikrokernraten in humanen Lymphozyten. Die Komponenten Hexachlorbutadien und Pentachlorbenzol verursachten, verglichen mit den anderen Komponenten, die höchsten Mikrokernraten (Abb. 22) und lösten somit erhebliche Chromosomen-Schäden durch Chromosomenaberrationen aus. Die Resultate weisen darauf hin, dass sich Hexachlorbutadien und Pentachlorbenzol als die genotoxisch wirksamsten Komponenten der Fraktion #3 charakterisieren lassen.

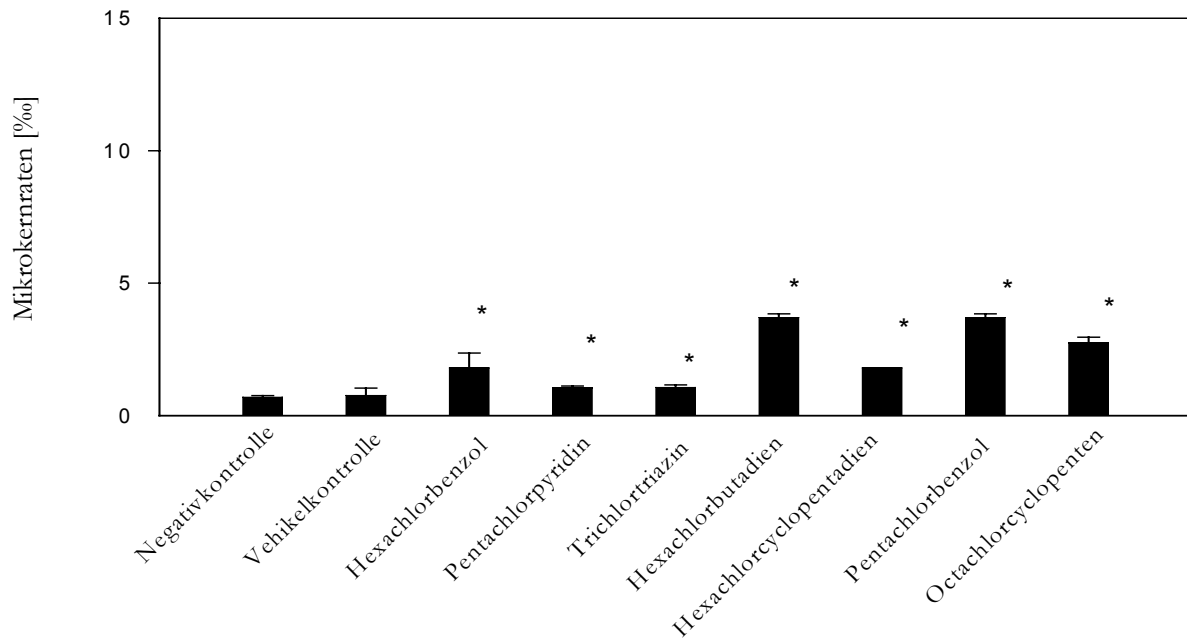


Abbildung 22. Induktion von Mikronuklei in humanen Lymphozyten nach 24-stündiger Behandlung mit den in der Fraktion #3 vorhandenen verfügbaren Einzelsubstanzen. Es wurden die Substanzen in den Konzentrationen getestet, die in 0,16 mg/ml der Fraktion #3 des Stoffgemisches bestimmt wurden. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle. Mikrokernraten in ‰ angegeben (Anzahl pro 1000 ausgezählter doppelkerniger Zellen).

3.1.4 Untersuchungen zur Reparatur in humanen Lymphozyten

Der zeitliche Verlauf der Reparatur von DNA-Schäden nach der Behandlung mit dem Stoffgemisch bzw. den drei Fraktionen wurde in humanen Lymphozyten untersucht. Die Untersuchungen dienen zur Erfassung möglicher unvollständiger DNA-Strangbruch-Reparaturen, aus denen bei Manifestation des Schadens Mutationen (z. B. Chromosomenaberrationen) resultieren könnten.

3.1.4.1 Reparatur nach Applikation von komplexem Stoffgemisch

Humane Lymphozyten wurden für 1 h oder 24 h mit 0,04 mg/ml des komplexen Stoffgemisches behandelt und anschließend der Zeitverlauf der DNA-Reparatur im Comet-Assay verfolgt. In den einstündig mit komplexem Stoffgemisch behandelten Zellen wurde spätestens 120 min nach Beginn der Reparatur keine signifikante Schädigung der DNA durch Brüche mehr nachgewiesen (Abb. 23).

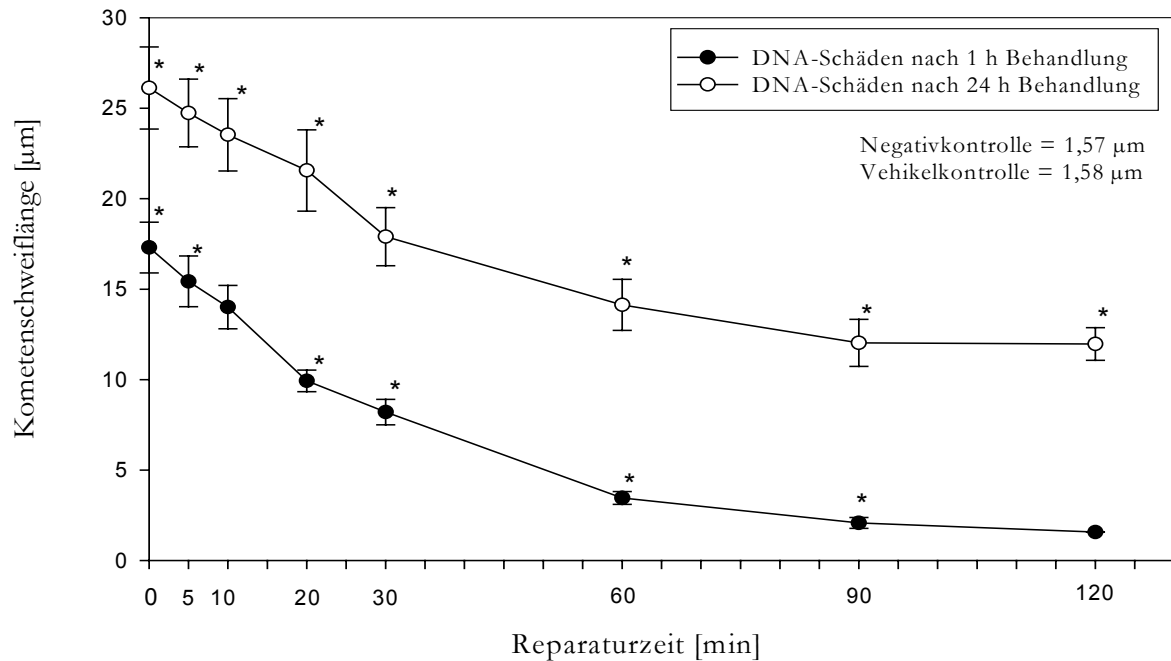


Abbildung 23. Abhängigkeit der DNA-Migration im Comet Assay von der Reparaturzeit nach einstündiger bzw. 24-stündiger Behandlung humaner Lymphozyten mit 0,04 mg/ml des komplexen Stoffgemisches. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DMSO (56 µM) behandelt. Die Kontrollwerte waren zu jedem Messpunkt gleich, angegeben wurde ein Durchschnitt aller Daten zu den jeweiligen Zeitpunkten. Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

Weder in den Negativ- noch in den Vehikelkontrollen wurden signifikant erhöhte DNA-Strangbrüche nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wies die DNA in 24 h-behandelten Zellen noch signifikant erhöhte DNA-Strangbruchraten nach 120 min Reparaturzeit auf, d.h. der DNA-Reparaturapparat konnte nach 24-stündiger Behandlung mit komplexen Stoffgemisch nicht alle gesetzten Schäden (Strangbrüche) beseitigen.

Da unvollständig reparierte DNA-Brüche u.a. die Voraussetzung für Chromosomenaberrationen sind, bestätigten die hier erfassten Daten die Resultate des Mikrokerntests. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten ein erhebliches chromosomenaberrationsauslösendes Potential des komplexen Stoffgemisches in 24 h-behandelten humanen Lymphozyten (vgl. 3.1.3).

3.1.4.2 Reparatur nach Applikation der Fraktionen

Humane Lymphozyten wurden für 1 h mit jeweils 0,04 mg/ml der drei Fraktionen behandelt und danach auf den zeitlichen Verlauf der DNA-Reparatur untersucht. Bei allen drei Fraktionen wurde bereits nach 10 Minuten eine signifikante Abnahme der Kometenschweiflänge der behandelten Zellen beobachtet. Dies wies auf das Einsetzen von Reparaturprozessen hin.

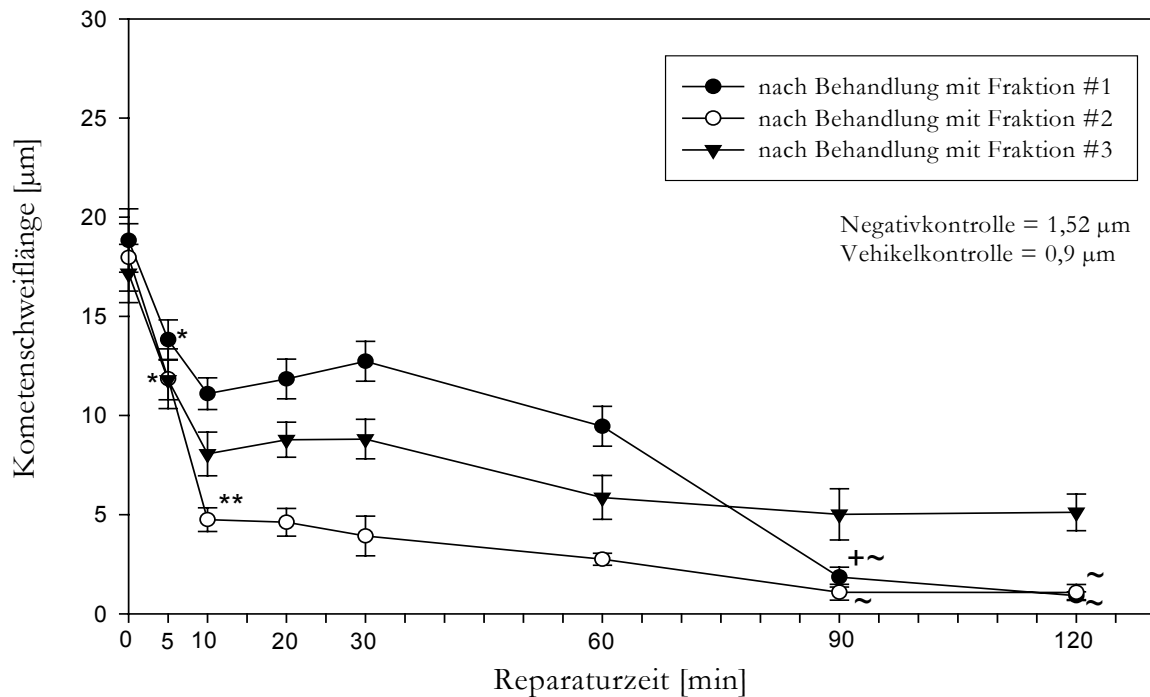


Abbildung 24. Abhängigkeit der DNA-Migration im Comet Assay von der Reparaturzeit nach einstündiger Behandlung von humanen Lymphozyten mit 0,04 mg/ml der Fraktionen des komplexen Stoffgemisches. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DCM (25 mM) behandelt. Die Kontrollwerte waren zu jedem Messpunkt gleich, angegeben wurde ein Durchschnitt aller Daten zu den jeweiligen Zeitpunkten. Mittelwerte \pm Standardabweichungen; alle Werte (außer +, ~) $p \leq 0,005$ im Vergleich zur Negativkontrolle; * $p \leq 0,005$ im Vergleich zum Schaden sofort nach der Behandlung; ** $p \leq 0,005$ im Vergleich zu 5 min Reparaturzeit; + $p \leq 0,005$ im Vergleich zu 60 min Reparaturzeit; ~ $p \geq 0,005$ im Vergleich zur Fraktion #3.

Die durch die Fraktionen #1 und #2 ausgelösten DNA-Schädigungen waren nach 90 min Reparaturzeit nicht mehr nachweisbar, die Daten unterschieden sich nicht signifikant von denen der Negativ- und der Vehikelkontrollen. Die DNA-Schädigungen nach einstündiger Behandlung mit Fraktion #3 hingegen waren auch nach 120 min noch nachweisbar, wobei sich die Kometenschweiflängen nach 5 min Reparaturzeit bis zum Ende der Beobachtungszeit nicht mehr signifikant änderten (Abb. 24). Dieses Ergebnis bestätigte, dass sich die bioaktiven Substanzen vorrangig in Fraktion #3 befanden.

3.1.4.3 Berechnung der Reparaturkapazität

Mit der Berechnung der Reparaturkapazität besteht die Möglichkeit, DNA-Reparaturvorgänge quantitativ zu beschreiben und Unterschiede im Reparaturverhalten der Lymphozyten nach der Behandlung mit dem komplexen Stoffgemisch und dessen Fraktionen darzustellen. Die Reparaturkapazität der Zellen sollte Hinweise auf mögliche Schädigungen des DNA-Reparatursystems geben. Sie berechnen sich aus dem Quotienten ungeschädigter Zellen nach 20 min Reparatur und ungeschädigter Zellen in der Negativkontrolle (modifiziert nach Harreus *et al.*, 2001).

Abbildung 25 zeigt den mittleren Prozentsatz der Lymphozyten unmittelbar nach der Behandlung und nach 20 min Reparaturzeit, die ein Tail Moment von ≤ 2 aufwiesen und als ungeschädigt galten (vgl. 2.2.4.3). In der Negativkontrolle verblieben durchschnittlich 92 % der Zellen ungeschädigt. Dieser Anteil war bei den Proben, die 1 h mit 0,04 mg/ml komplexem Stoffgemisch behandelt wurden, auf 38 % reduziert. Nach 20 min Reparaturzeit waren 52 % der Zellen ungeschädigt. Proben, die nach 24 h Behandlungszeit mit 0,04 mg/ml komplexem Stoffgemisch untersucht wurden, wiesen unmittelbar nach der Behandlung einen Anteil von 30 % ungeschädigter Zellen auf, der nach 20 min Reparaturzeit auf 68 % stieg.

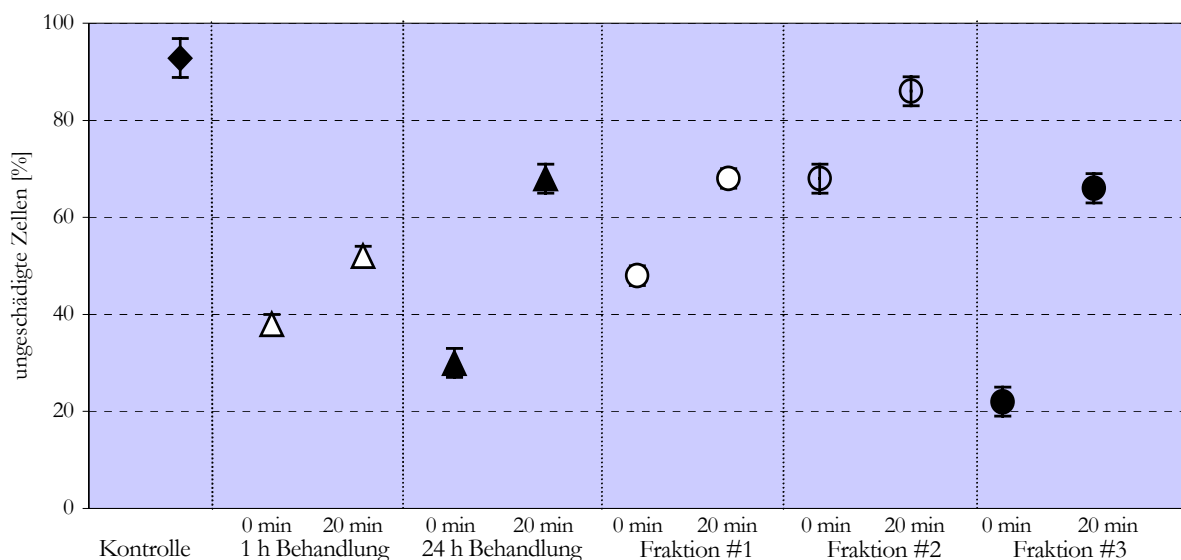


Abbildung 25. DNA-Reparatur in humanen Lymphozyten. Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Dargestellt ist der Anteil ungeschädigter Lymphozyten mit einem Tail Moment ≤ 2 nach Kontrollinkubation, nach einstündiger bzw. 24-stündiger Inkubation mit komplexem Stoffgemisch und nach einstündiger Inkubation mit den Fraktionen unmittelbar nach der Behandlung und nach 20-minütigem Reparaturintervall.

Der Anteil ungeschädigter Zellen betrug nach einstündiger Inkubation mit jeweils 0,04 mg/ml der Fraktionen #1, #2 und #3 zum Zeitpunkt 0 min 48 %, 68 % bzw. 22 %. Dieser Anteil erhöhte sich nach einem Reparaturintervall von 20 min auf 68 %, 86 % bzw. 66 %.

Aus dem prozentualen Anteil ungeschädigter Zellen nach 20 min Reparaturzeit wurden die Reparaturkapazitäten errechnet. Die Reparaturkapazität der Lymphozyten war nach einstündiger Behandlung mit dem komplexen Stoffgemisch am geringsten. Die errechnete Reparaturkapazität der Lymphozyten war nach der Behandlung mit 0,04 mg/ml der Fraktion #2 höher als nach Behandlung mit den Fraktionen #1 und #3. Dies deutete darauf hin, dass in Fraktion #2 im Vergleich zu #1 und #3 weniger bioaktive Substanzen bzw. diese in geringeren Mengen enthalten sein könnten (Tab. 10).

Behandlung	ungeschädigte Zellen Tail Moment ≤ 2 (nach 20 min)	Reparaturkapazität (nach 20 min)
Negativkontrolle	92,9 %	
komplexes Stoffgemisch 0,04 mg/ml		
1 h Behandlungszeit	52 %	0,56
24 h Behandlungszeit	68 %	0,73
Fraktionen 0,04 mg/ml		
F #1 (1 h Behandlungszeit)	68 %	0,73
F #2 (1 h Behandlungszeit)	86 %	0,92
F #3 (1 h Behandlungszeit)	66 %	0,71

Tabelle 10. Darstellung der errechneten Reparaturkapazitäten von humanen Lymphozyten nach Behandlung mit komplexem Stoffgemisch und den Fraktionen #1, #2 und #3.

Die Berechnung der Reparaturkapazitäten der humanen Lymphozyten nach Harreus *et al.*, 2001 ergab mit Ausnahme bei einstündiger Behandlung mit komplexem Stoffgemisch keine signifikanten Unterschiede, so dass keine eindeutigen Hinweise auf ein unterschiedliches Ausmaß der Schädigung von Reparatursystemen der behandelten Zellen abgeleitet werden können.

3.1.5 Induktion von Genmutationen durch das komplexe Stoffgemisch

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass das komplexe Stoffgemisch DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüche induzierte und sowohl zytotoxische Effekte als auch Chromosomenmutationen verursachte.

Um die Häufigkeit von durch das komplexe Stoffgemisch ausgelösten Mutationsereignissen in der DNA zu erfassen, wurden Genmutationstests durchgeführt. Die folgenden Untersuchungen dienten zur weiteren Charakterisierung der mutagenen Wirkung des komplexen Stoffgemisches.

3.1.5.1 Nachweis von Genmutationen im HPRT-Test

Der HPRT-Test wurde zunächst an humanen Lymphozyten durchgeführt, um im Hinblick auf ein mögliches Biomonitoring für die humane Anwendung auf ein etabliertes Testsystem zurückgreifen zu können. Im HPRT-Test werden durch die Bestimmung der Mutantenfrequenzen Mutationshäufigkeiten im x-chromosomal lokalisierten HPRT-Gen erfasst.

Nach der Behandlung der Zellen mit komplexem Stoffgemisch wurde der Test wie unter 2.2.6.1 angegeben, durchgeführt. Aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit war weder nach 14, noch nach 16 oder 20 Tagen Inkubationszeit eine Auswertung möglich. Auch nach Rücksprache mit Prof. Bo Lambert von der Karolinska Universität in Stockholm (Präsident der Nordic Environmental Mutagen Society und Mitglied des National Toxicology Council and the Research Board of the Swedish Cancer Society) und Anwendung des von ihm verwendeten Protokolls konnten die Platten zur Bestimmung der Mutantenfrequenz nicht ausgewertet werden.

Die Untersuchung von Genmutationen gehört zu einer wissenschaftlich fundierten gentoxikologischen Testbatterie (Li *et al.*, 1991). Die bisherigen Ergebnisse, die mit dem neutralen Comet Assay in TK6-Zellen nach der Behandlung mit komplexem Stoffgemisch (vgl. 3.1.2.2) erfasst wurden, zeigten, dass das komplexe Stoffgemisch Doppelstrangbrüche in der DNA von TK6-Zellen auslöste und dass die TK6-Zellen für gentoxikologische Untersuchungen mit dem komplexen Stoffgemisch geeignet waren. Aus diesen Gründen wurde der HPRT-Test auch mit den humanen lymphoblastoiden TK6-Zellen wie unter 2.2.6.1 beschrieben durchgeführt.

Die Platten zur Bestimmung der Mutationsfrequenz waren wiederum nicht auswertbar. Veränderungen der Behandlungszeiten der Zellen, der Inkubationszeiten der Platten oder auch eine sukzessive Verringerung bzw. Steigerung der 6-Thioguaninkonzentrationen brachten keine fassbaren Ergebnisse. Daher war es nicht möglich, mit dem HPRT-Test Ergebnisse zur Induktion von Genmutationen in den getesteten Zellkultursystemen nach der Behandlung mit komplexem Stoffgemisch zu erfassen.

3.1.5.2 Genmutationsuntersuchungen mittels Maus-Lymphoma-Assay

Da der HPRT-Test keine Ergebnisse zur Feststellung der mutagenen Wirkung des komplexen Stoffgemisches lieferte, wurde der Maus-Lymphoma-TK^{+/-}-Assay (MLA) etabliert.

Im MLA werden im Gegensatz zum HPRT-Genmutationstest neben Genmutationen auch Chromosomenmutationen erfasst. In diesem Test führt eine mutagene Wirkung zur Induktion von TFI-resistenten Kolonien (Mutantenfrequenz). Diese Kolonien unterscheiden sich auch deutlich hinsichtlich ihrer Größe. Dabei werden kleine Kolonien im Zusammenhang mit Chromosomenmutationen gesehen, während für große Kolonien Genmutationen als Mutationsereignis angenommen werden (Clements, 2000; Moore and Doerr, 1990).

In Vorversuchen zur Zytotoxizität, in denen L5178Y-Zellen mit komplexem Stoffgemisch behandelt wurden, zeigte sich, dass die L5178Y-Zellen deutlich sensibler auf diese Behandlung reagierten als die bisher getesteten Zellkultursysteme. Aufgrund der Ergebnisse aus den Voruntersuchungen wurde das komplexe Stoffgemisch daher in einem geringeren Konzentrationsbereich getestet: 0,00075 mg/ml; 0,001 mg/ml; 0,0025 mg/ml; 0,005 mg/ml und 0,01 mg/ml.

L5178Y-Zellen wurden für 1 h mit komplexem Stoffgemisch mit und ohne Zugabe von S9-Mix behandelt und die Mutantenfrequenz im MLA bestimmt. Ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Zytotoxizität war ab der geringsten getesteten Konzentration von 0,00075 mg/ml messbar. Dies zeigte sich in der konzentrationsabhängigen Abnahme der Klonierungseffizienz. Bei 0,01 mg/ml war die relative Klonierungseffizienz auf 30 % erniedrigt. Höhere Konzentrationen hemmten das Wachstum der Zellen vollständig und konnten daher nicht untersucht werden.

Eine statistisch signifikante Erhöhung der Mutantenfrequenz wurde ab 0,0025 mg/ml beobachtet. Bei 0,01 mg/ml war die Mutantenfrequenz gegenüber der Kontrolle zehnfach erhöht und überstieg die Mutantenfrequenz der Positivkontrollen. Obwohl es schon ab der niedrigsten Testkonzentration (0,00075 mg/ml) zu einem signifikanten Abfall der Klonierungseffizienz gegenüber der Negativkontrolle kam, fanden sich für die Mutantenfrequenz erst ab einer Behandlung mit 0,025 mg/ml signifikant erhöhte Werte. Daraus ließ sich eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung sowohl für die Klonierungseffizienz als auch für die Mutantenfrequenz nach Behandlung der Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von komplexem Stoffgemisch erkennen (Abb. 26). Die Zugabe von S9-Mix hatte keinen Einfluss. Zellen, die mit MMS oder B(α)P (Positivkontrollen, gut charakterisierte Mutagene) behandelt wurden, zeigten wie erwartet signifikant erhöhte Mutantenfrequenzen. Diese Resultate stimmten mit denen in dieser Arbeit durch andere toxikologische Tests erfassten überein.

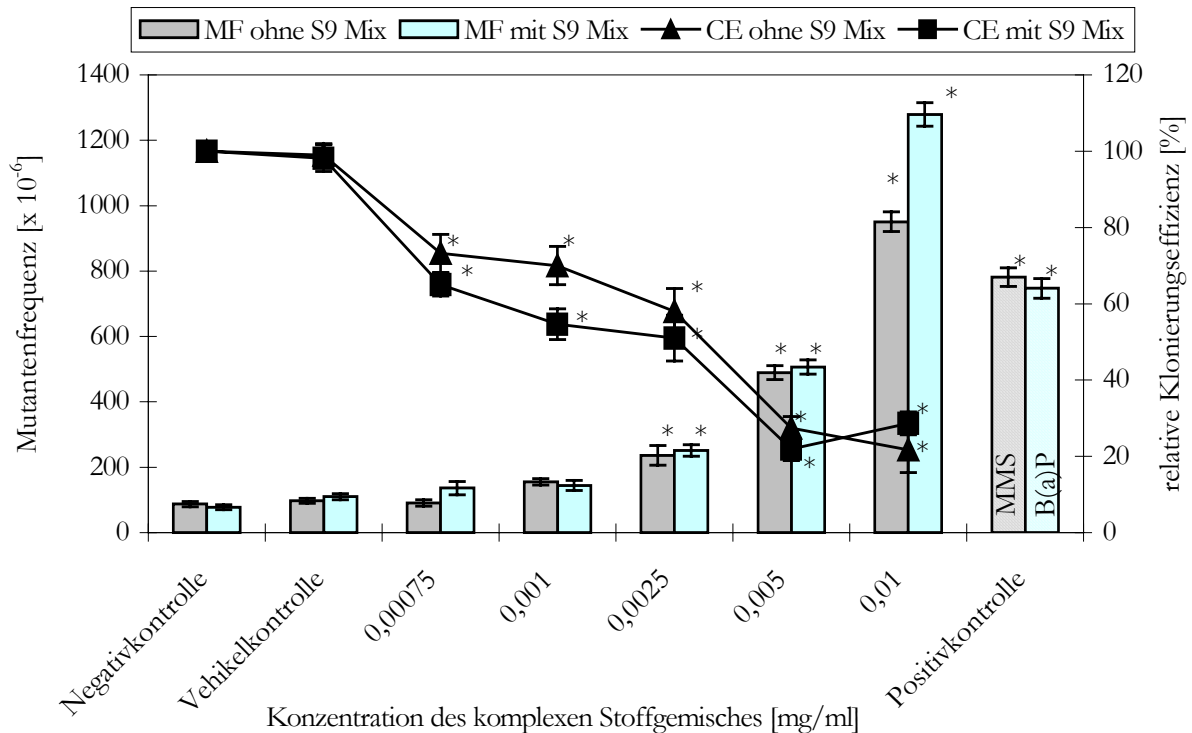


Abbildung 26. Induktion der TFT-Resistenz in L5178Y-Zellen nach einer einstündigen Behandlung mit komplexem Stoffgemisch mit und ohne Zugabe von S9-Mix. Als Maß der TFT-Resistenz ist die Mutantenfrequenz angegeben. Als Maß der Überlebensrate ist die relative Klonierungseffizienz angegeben. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DMSO (56 μ M); Positivkontrollen: MMS ohne S9-Mix und B(α)P mit S9-Mix behandelt. Mittelwerte aus 4 Versuchen \pm SEM; * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

Die einstündige Behandlung mit komplexem Stoffgemisch mit und ohne Zugabe von S9-Mix induzierte kleine und große TFT-resistente Kolonien. In der unbehandelten Kontrolle fanden sich weniger kleine als große Kolonien. Ab einer Konzentration von 0,0025 mg/ml des komplexen Stoffgemisches kam es zur signifikanten Erhöhung der Anzahl großer Kolonien, während die Anzahl der kleinen Kolonien schon ab der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,00075 mg/ml zur signifikanten Erhöhung bei der Behandlung ohne S9-Mix führte. Bei Konzentrationen von 0,005 und 0,01 mg/ml wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Mutantenfrequenzen in kleinen Kolonien mit und ohne S9-Mix beobachtet. Das Verhältnis zwischen der Behandlung ohne und nach Zugabe von S9-Mix betrug bei 0,01 mg/ml 1:4,5. Erwartungsgemäß führte die Behandlung der Zellen mit MMS und B(α)P ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl großer und kleiner Kolonien (Abb. 27).

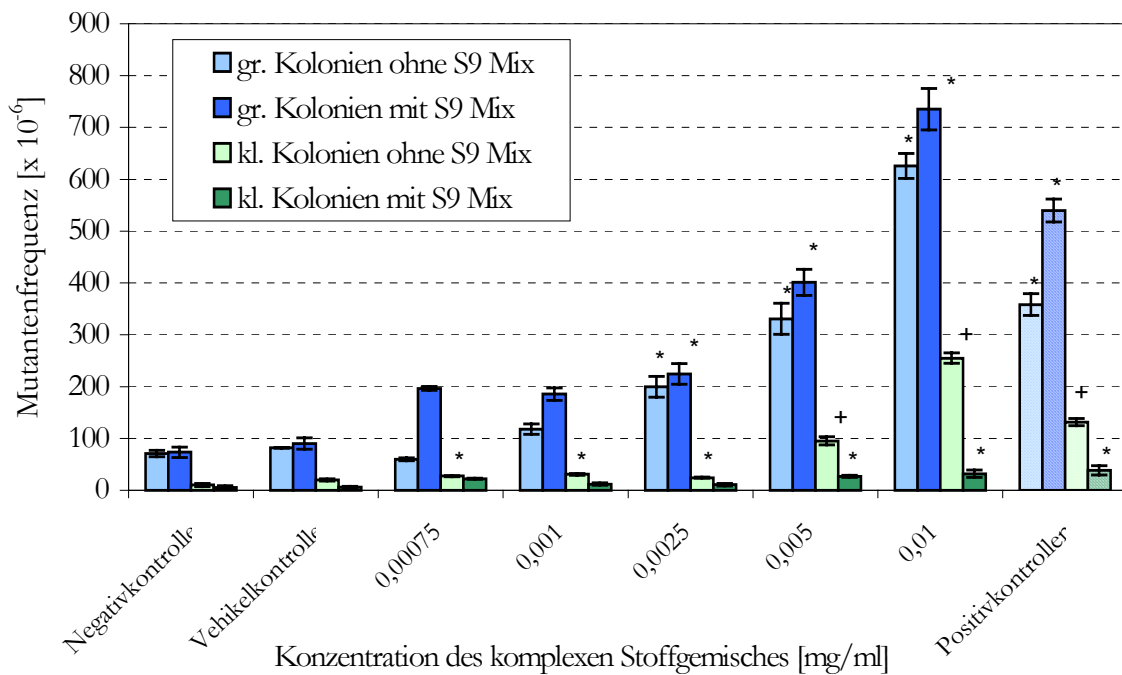


Abbildung 27. Bildung von kleinen und großen Kolonien im MLA nach einer einstündigen Behandlung mit komplexem Stoffgemisch, mit und ohne Zugabe von S9-Mix. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DMSO (56 μ M); Positivkontrollen: MMS ohne S9-Mix und B(α)P mit S9-Mix behandelt. Mittelwerte aus 4 Versuchen \pm SEM; * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle; + $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle und den Werten nach der Behandlung mit S9-Mix.

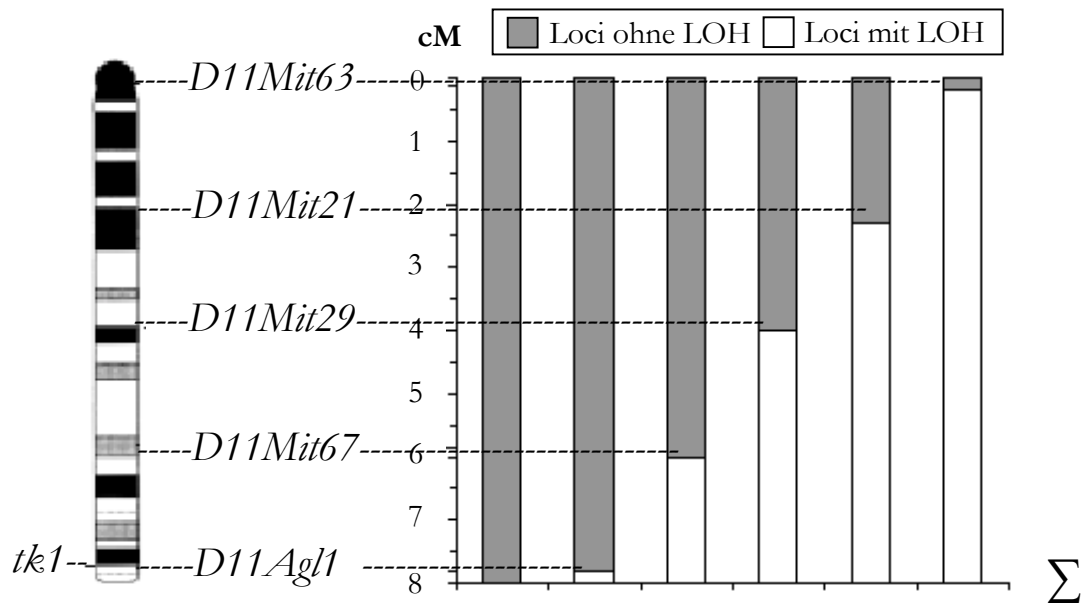
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit zunehmender Konzentration des komplexen Stoffgemisches ein signifikanter Anstieg sowohl der Gen- als auch der Chromosomenmutationen (kleine und große Kolonien) nachgewiesen werden konnte. Während bei den Chromosomenmutationsfrequenzen (große Kolonien) keine signifikanten Unterschiede in den Behandlungen mit und ohne Zusatz des externen metabolisierenden Systems S9-Mix auftraten, konnten bei der Frequenz von Genmutationen signifikante Unterschiede beobachtet werden. So trat eine signifikante Erhöhung der Anzahl kleiner Kolonien und somit der Frequenz an Genmutationen bei der Behandlung ohne zusätzliche Metabolisierung des komplexen Stoffgemisches ab einer Testkonzentration von 0,005 mg/ml auf. Chromosomenmutationen (große Kolonien) traten während der Behandlung mit komplexem Stoffgemisch häufiger auf als Genmutationen (kleine Kolonien).

3.1.5.3 Molekulargenetische Analyse von TFT-resistenten Zellen

Eine nähere Charakterisierung der Mechanismen, die zum Ausfall der Enzymaktivität der Thymidinkinase führten, wurde an spontanen und mutageninduzierten Kolonien durchgeführt. Durch den Vergleich des Spektrums der Mutationen ließen sich Rückschlüsse auf die mutagenen Wirkmechanismen des komplexen Stoffgemisches ziehen. Um die Arten der Veränderungen in den durch das komplexe Stoffgemisch induzierten Mutanten zu charakterisieren, wurde das Ausmaß des Verlusts der Heterozygotie (LOH) an fünf polymorphen Markern: *D11Agl1*, *D11Mit67*, *D11Mit29*, *D11Mit21*, *D11Mit63* des Chromosoms 11 analysiert.

Insgesamt wurden 55 spontan entstandene Kolonien untersucht, 28 kleine und 27 große Kolonien. Eine der untersuchten kleinen Kolonien zeigte Heterozygotie für alle untersuchten Marker, was einen Hinweis auf Genmutation darstellt. 10 Kolonien hatten nur einen LOH des Markers *D11Agl1*, dies weist auf eine kleine Deletion oder Rekombination hin. Siebzehn kleine Kolonien zeigten einen LOH über einen größeren Bereich, wobei 7 davon alle Marker des Chromosoms 11b verloren hatten, dies deutet auf eine größere Deletion, Rekombination oder den Totalverlust des Chromosoms 11 hin. Sechs der 27 untersuchten großen Kolonien zeigten keinen LOH (Hinweis auf Genmutation), in 4 kam es nur zu einem Verlust des Markers *D11Agl1* (Hinweis auf kleine Deletion oder Rekombination). Einen LOH über einen größeren Bereich zeigten siebzehn Kolonien, wobei keine der Kolonien einen Verlust aller untersuchten Marker aufwies (Hinweis auf größere Deletion, Rekombination oder den Totalverlust des Chromosoms 11).

Von den durch komplexes Stoffgemisch induzierten Kolonien wurden insgesamt 44 auf einen LOH auf dem Chromosom 11 untersucht, 20 kleine und 24 große Kolonien. In jeder der kleinen Kolonien konnte ein LOH nachgewiesen werden (kein Hinweis auf Genmutationen). Sechs der untersuchten Kolonien hatten dabei nur einen Verlust des Markers *D11Agl1* auf Chromosom 11b (Hinweis auf kleine Deletion oder Rekombination), in vierzehn Kolonien trat ein LOH über einen größeren Bereich auf. Eine Kolonie zeigte den Verlust aller untersuchten Marker (Hinweis auf größere Deletion, Rekombination oder den Totalverlust des Chromosoms 11). In den 24 untersuchten großen Kolonien finden sich acht ohne einen LOH (Genmutationshinweis) und sechs, die nur einen LOH im Marker *D11Agl1* zeigten (Hinweis auf kleine Deletion oder Rekombination). Es wurden insgesamt zehn Kolonien identifiziert, die einen LOH über einen größeren Bereich aufwiesen, wobei nur zwei einen Verlust aller untersuchten Marker zeigten, dies ist ein Hinweis auf größere Deletion, Rekombination oder den Totalverlust des Chromosoms 11 (Abb. 28).



spontan	große Kolonien	6	4	3	4	10	0	27
aufretend	kleine Kolonien	1	10	6	3	1	7	28

induziert durch	große Kolonien	8	6	2	5	1	2	24
komplexes Stoffgemisch	kleine Kolonien	0	6	4	4	5	1	20

Abbildung 28. Anzahl der spontanen und durch komplexes Stoffgemisch (ohne S9-Mix) induzierten TFT-resistenten L5178Y-Kolonien mit einem LOH auf Chromosom 11. Der Nachweis erfolgte durch PCR-Amplifikation der polymorphen Marker *D11Agl1*, *D11Mit67*, *D11Mit29*, *D11Mit21* und *D11Mit63*. (Illustration des *tk1* Locus nach Speit and Merk, 2002. Das Schema gibt die einzelnen Marker bzw. die LOH auf Chr. 11 wieder.)

Eine Zusammenfassung der Mutationen, die zur Bildung von spontanen und induzierten TFT-resistenten Kolonien führten, ist in Tab. 11 gezeigt.

	Spontane TFT-resistente Kolonien			Durch komplexes Stoffgemisch induzierte TFT-resistente Kolonien		
	Klein (28)	Groß (27)	Gesamt (55)	Klein (20)	Groß (24)	Gesamt (44)
Genmutation (kein LOH)	3,5 %	22,2 %	12,9 %	0 %	33,3 %	18,2 %
Kleine Deletion bzw. Rekombination (LOH nur <i>D11Agl1</i>)	35,7 %	14,8 %	25,3 %	30 %	25 %	27,3 %
Deletion oder Rekombination oder Totalverlust Chr. 11	60,7 %	62,9 %	61,8 %	70 %	41,6 %	54,5 %

Tabelle 11. Übersicht der erfassten Mutationsmechanismen, die zu spontan entstandenen oder durch Behandlung mit komplexem Stoffgemisch induzierten TFT-resistenten Kolonien geführt haben. Die Anzahl der jeweils untersuchten Kolonien ist in Klammern angegeben.

In den durch komplexes Stoffgemisch induzierten Kolonien war im Vergleich zu den spontanresistenten Kolonien seltener ein LOH am Marker *D11Agl1* (12,7 % gegenüber 18,2 %) zu beobachten, d.h. Genmutationen traten häufiger auf. Auffällig ist, dass gegenüber spontanen häufiger große induzierte Kolonien keinen LOH aufwiesen (33,3 % versus 22,2 %), bei den kleinen induzierten Kolonien dagegen war bei allen ein LOH erfassbar. Da der Marker innerhalb des TK-Gens liegt, kann man annehmen, dass die TFT-Resistenz in diesen Kolonien durch eine Genmutation entstanden sein muss.

Circa ein Viertel aller untersuchten sowohl spontan als auch nach Behandlung resistenten Kolonien besaß nur einen LOH am Marker *D11Agl1*, die damit entweder durch eine kleine Deletion oder eine Rekombination entstanden sein müssten. Während der Prozentsatz bei den induzierten kleinen Kolonien im Vergleich zu den spontan entstandenen Kolonien sank, erhöhte sich der Wert bei den induzierten großen Kolonien im Vergleich zu den Spontanen um 10 %.

Über die Hälfte der untersuchten Kolonien zeigte einen LOH über einen größeren Bereich, diese Kolonien können durch Deletion, Rekombination oder Totalverlust des Chromosoms 11 entstanden sein. Dabei fiel der Anteil bei den induzierten Kolonien mit 54,5 %, gegenüber den spontan entstandenen Kolonien mit 61,8 % geringer aus. Die Anteile großer und kleiner Kolonien bei den spontan entstandenen TFT-resistenten Kolonien lagen gleich hoch. Bei den durch komplexes Stoffgemisch induzierten TFT-resistenten Mutanten lag der Prozentsatz der kleinen Kolonien um 10 % höher im Vergleich zu den spontan resistenten und ca. 30 % über dem Anteil der großen Kolonien. Es war also eine Zunahme der kleinen TFT-resistenten Kolonien und eine Abnahme des Anteils großer Kolonien zu beobachten. Eine weitere Klassifizierung war mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht möglich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den durch das komplexe Stoffgemisch induzierten Mutanten (18,2 %) Hinweise auf Genmutationen häufiger auftreten als bei spontan entstandenen Mutanten, ein 1,4-facher Anstieg war zu beobachten. Die Anteile an Mutationen, die durch kleine Deletionen oder Rekombinationen entstanden sein könnten, sind etwa gleich groß und erscheinen sowohl bei spontan auftretenden als auch bei induzierten Mutanten in ca. einem Viertel der Fälle. Über 50 % der TFT-resistenten Kolonien beider Untersuchungsgruppen sind wahrscheinlich auf größere Deletionen oder Rekombinationen oder sogar Totalverlust des Chromosoms 11 zurückzuführen.

3.1.6 Koloniebildungsfähigkeit

Zur weiteren Überprüfung der Zytotoxizität wurde die Koloniebildungsfähigkeit als Maß für die zelluläre Proliferation und Vitalität untersucht. Nach der Behandlung wurde eine definierte Zellzahl ausgesät und das Überleben der Zellen beobachtet. Da TK6-Zellen als Suspensionskultur wachsen, wurde dieser Test in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Mit ansteigender Konzentration des komplexen Stoffgemisches nahm die Fähigkeit der Zellen zur Koloniebildung ab, d. h. die Proliferationsfähigkeit der Zellen wird mit steigender Testkonzentration zunehmend gestört (Abb. 29). Die relative Koloniebildungsfähigkeit war ab einer Konzentration von 0,02 mg/ml signifikant niedriger als bei der Negativkontrolle. Bei der höchsten Testkonzentration von 0,16 mg/ml behielten weniger Zellen die Fähigkeit zur Teilung als die Zellen der Positivkontrolle (200 μ M EMS), die erwartungsgemäß signifikant niedrigere Koloniebildungsfähigkeit als die der Negativkontrolle aufwiesen.

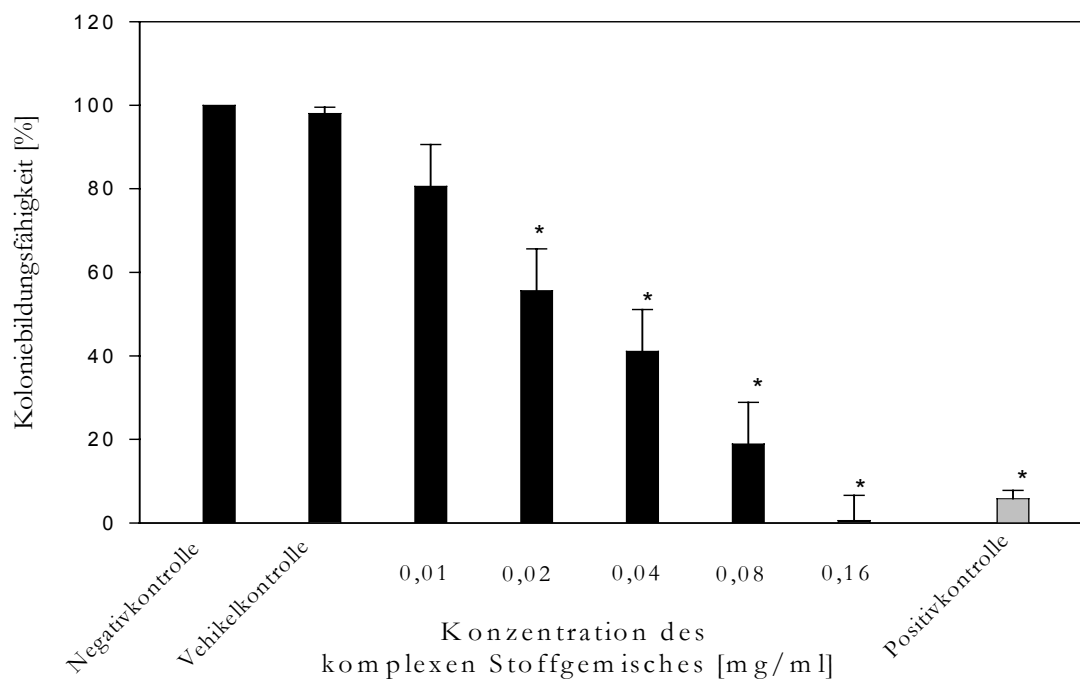


Abbildung 29. Abhängigkeit der relativen Koloniebildungsfähigkeit von TK6-Zellen nach 24-stündiger Behandlung von den unterschiedlichen Konzentrationen an komplexem Stoffgemisch. Negativkontrolle: unbehandelte Zellsuspension; Vehikelkontrolle: Zellsuspension mit dem Lösungsvermittler DMSO (56 μ M); Positivkontrolle: 200 μ M EMS behandelt. Die Negativkontrolle wurde auf 100 % gesetzt. Mittelwerte aus 4 Versuchen \pm SEM; * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

3.2 Verwendung kryokonservierter primärer Hepatozyten für toxikologische Untersuchungen

Die Leber gilt als das Organ der Entgiftung aber auch der Giftung von Xenobiotika. Da der Hepatozyt als kleinste funktionelle Einheit der Leber diese Stoffwechselleistung durchzuführen in der Lage ist, stellen Hepatozyten ein ideales Testsystem zur Untersuchung toxikologischer Eigenschaften neuer oder unbekannter Substanzen dar. Um Hepatozyten permanent verfügbar zu haben, ist die Etablierung von Hepatozytenbanken unabdingbar. Neben der Verwendung zu Forschungszwecken dienen Zellbanken als Ressource für die Transplantation von Hepatozyten zur Therapie bei Lebererkrankungen. Da Schweinehepatozyten als menschlichen Hepatozyten ähnlich gelten, wurden in der vorliegenden Untersuchung zwar Protokolle für die Kryokonservierung von Schweine- und Rattenhepatozyten erstellt, die Validierung des Systems und die toxikologischen Untersuchungen jedoch nur mit Schweinehepatozyten durchgeführt.

3.2.1 Optimierung des Protokolls zur Kryokonservierung

Die Fähigkeit der Hepatozyten, auf kollagenierten Kulturschalen anzuheften und damit die Möglichkeit, diese Zellen zu kultivieren, ist nach dem Auftauen kryokonservierter Zellen deutlich vermindert. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der Schädigung der genomischen DNA liegen. Deshalb wurde die DNA-Schädigung nach Kryokonservierung von primären Schweine- und Rattenhepatozyten und zur Kontrolle in der Zelllinie MH1C1 im Vergleich zur DNA-Schädigung in frisch isolierten primären Schweine- und Rattenhepatozyten mit Hilfe des alkalischen Comet Assays analysiert. Als Maß für die DNA-Schädigung wurde die mittlere Kometenschweiflänge mit und ohne Zusatz der kryoprotektiven Aminosäure Glyzin bestimmt. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit 300 μM H_2O_2 mitgeführt. In kryokonservierten Hepatozyten war der Wert der DNA-Schädigung signifikant höher als in frisch isolierten Hepatozyten, die ähnlich niedrige DNA-Schädigungen aufwiesen wie die MH1C1 Kontrollzellen. Beim Zusatz von Glyzin zum Einfrier- und Auftaumedium gab es artspezifische Unterschiede in der Wirksamkeit: Während in Schweinehepatozyten die durch die Kryokonservierung auftretende DNA-Schädigung verhindert wurde, konnte in Rattenhepatozyten diese Schädigung nicht unterbunden werden (Abb. 30).

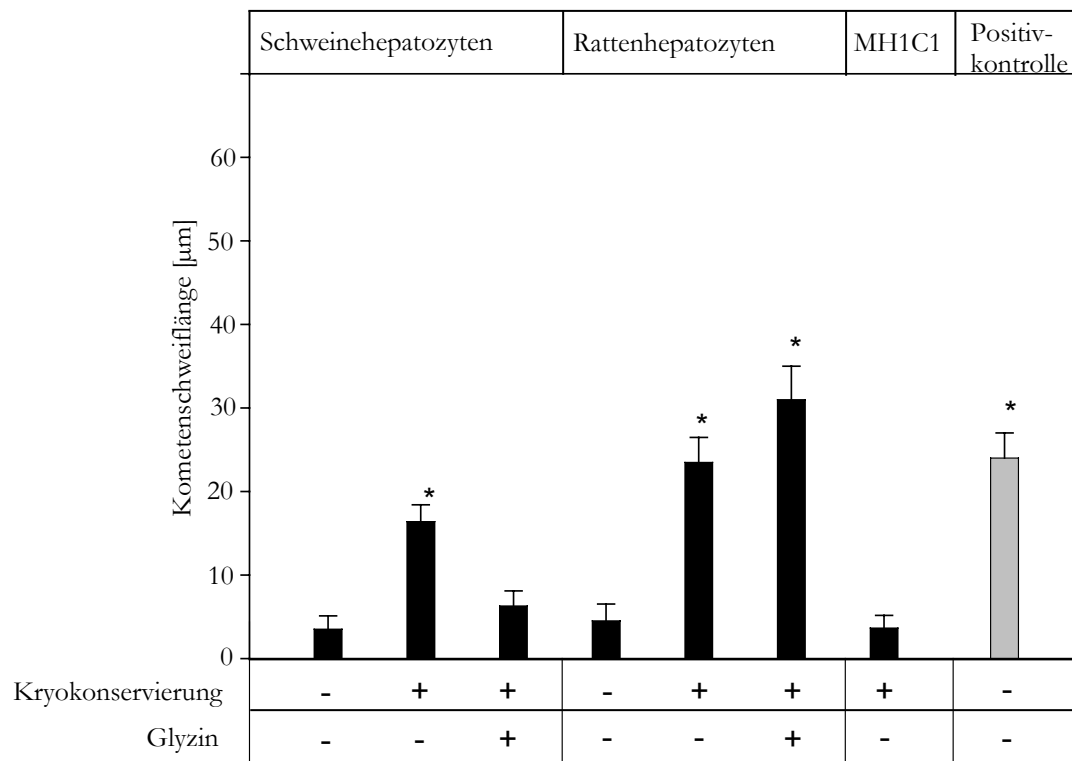


Abbildung 30. Induktion von DNA-Schäden in Hepatozyten durch Kryokonservierung. Die DNA-Schäden sind als Kometenschweiflänge im Comet Assay dargestellt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei verschiedenen Zellpräparationen; * $p \leq 0,01$ im Vergleich zu den nicht-kryokonservierten Hepatozyten.

Die Daten belegen, dass es während des Kryokonservierungsprozesses zur Schädigung der DNA in den Hepatozyten durch Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie durch alkalilabile-Stellen kam. Dies konnte in Schweinehepatozyten durch die Zugabe von 3 mM Glyzin zum Einfrier- und Auftaumedium verhindert werden. Daher kann man vermuten, dass der Verlust der Funktionalität und Vitalität kryokonservierter Hepatozyten in anschließender Kultur unter anderem auf die Schädigung der DNA zurückzuführen war.

Um den Effekt von 3 mM Glyzin auf die Vitalität der Hepatozyten zu bestimmen, wurden kryokonservierte Zellen aufgetaut und die Anzahl vitaler Zellen an der Gesamtzahl der Zellen nach Trypanblaufärbung bestimmt. Generell war die Vitalität von Rattenhepatozyten geringer als die von Schweinehepatozyten. Der Zusatz von Glyzin hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Hepatozyten (Abb. 31).

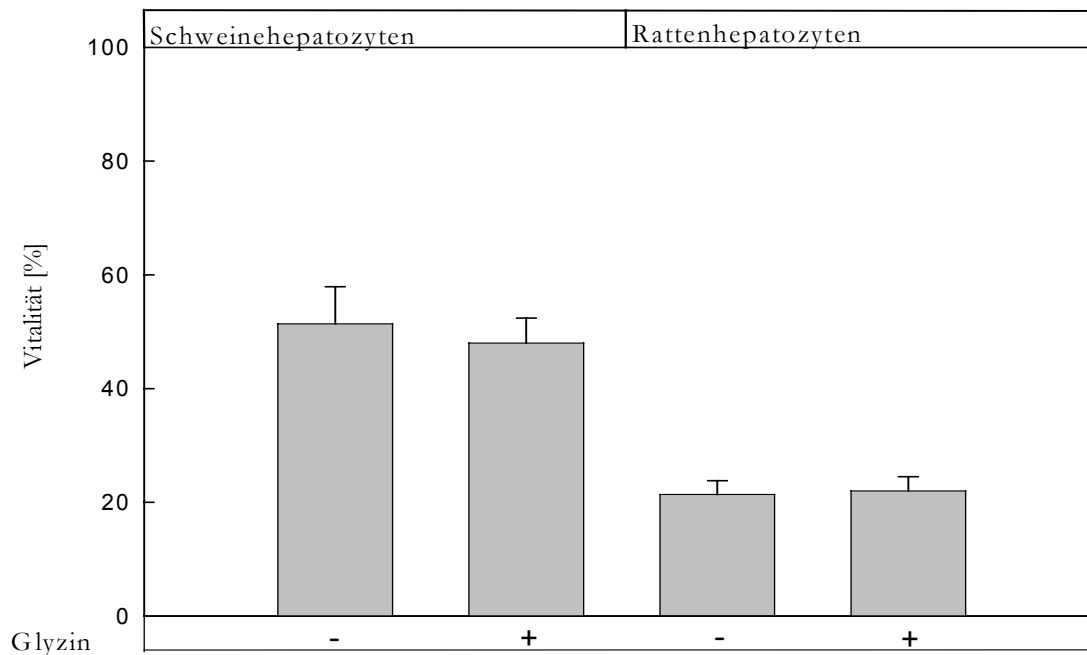


Abbildung 31. Anteil der vitalen Hepatozyten an der Gesamtzahl der Zellen (= 100 %) unmittelbar nach dem Auftauen kryokonservierter Schweine- oder Rattenhepatozyten. Wo angegeben, wurde dem Kryo- und Auftaumedium 3 mM Glyzin zugesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei verschiedenen Zellpräparationen.

Um den Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl zu erhöhen, wurden die aufgetauten Zellen über einen Percoll-Dichtegradienten aufgereinigt und die Zellausbeute ausgehend von der Zellzahl vor Dichtegradientenzentrifugation in der resultierenden Zellsuspension bestimmt. Während die Ausbeute an Schweinehepatozyten, die unter Zugabe von Glyzin eingefroren und aufgetaut wurden, nach der Percollaufreinigung ca. 6-fach höher als die der Zellen ohne Glyzinzusatz war, hatte der Zusatz von Glyzin auf die Ausbeute an Rattenhepatozyten keinen Einfluss (Abb. 32). Wenn auch Glyzin auf die Vitalität der Zellen, die mit der Trypanblau-Methode vor der Percollaufreinigung bestimmt wurde, scheinbar keinen Einfluss hatte (vgl. Abb. 31), so zeigten die Ergebnisse nach Percollaufreinigung doch, dass ein Großteil der Zellen geschädigt sein musste. Dies könnte für die niedrige Anheftungsrate der Zellen in der anschließenden Kultur verantwortlich sein. In den weiteren Untersuchungen wurde für den Kryokonservierungsprozess immer ein Protokoll mit Zusatz von Glyzin gewählt (vgl. 2.2.1.3 und 2.2.1.4).

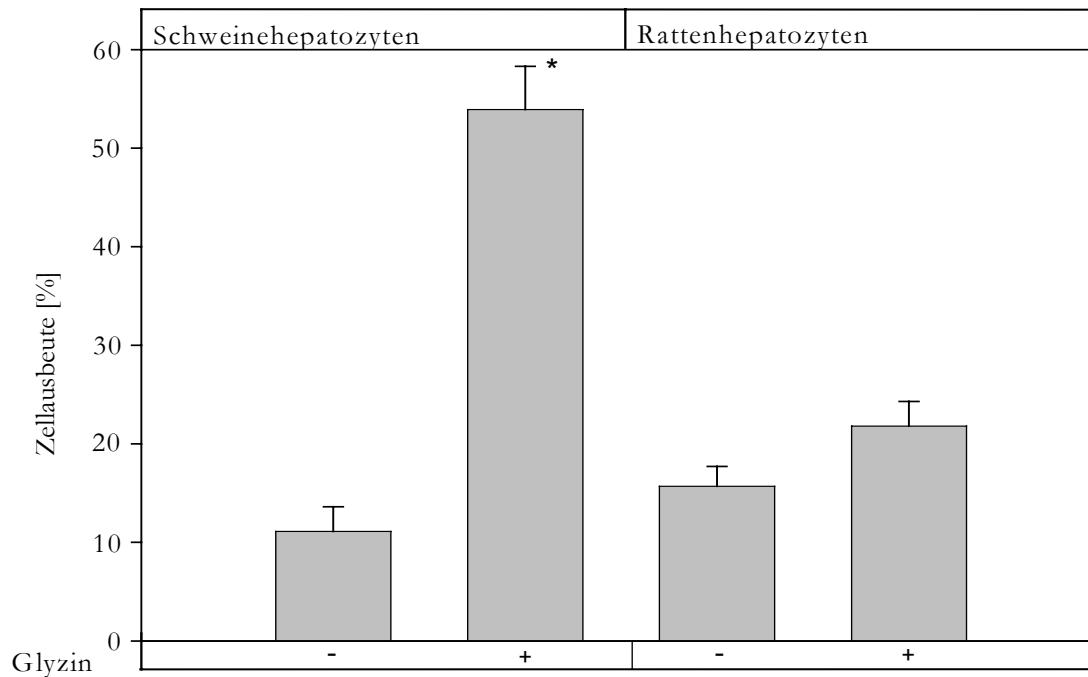


Abbildung 32. Zellausbeute kryokonservierter Schweine- und Rattenhepatozyten nach der Aufreinigung durch Percoll-dichtegradientenzentrifugation. Wo angegeben, wurde dem Einfrier- bzw. Auftaumedium Glyzin zugesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei verschiedenen Zellpräparationen; * $p \leq 0,01$ im Vergleich zur Kryokonservierung ohne Glyzin.

3.2.2 Kultivierung und Charakterisierung leberspezifischer Eigenschaften kryokonservierter Hepatozyten

Um kryokonservierte Hepatozyten für toxikologische Untersuchungen verwenden zu können, müssen leberspezifische Eigenschaften in einer anschließenden Kultur erhalten bleiben. Deshalb wurden zur Validierung von nach der Kryokonservierung kultivierten Hepatozyten deren Proliferationsfähigkeit, die Fähigkeit zur Fremdstoffmetabolisierung durch das Cytochrom P450-System sowie die Fähigkeit zur Harnstoffsynthese bestimmt.

Kultivierung

Die Verwendung von Glyzin wirkte sich nicht positiv auf die Anheftungs- und Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten aus. Die Anheftungsraten waren mit weniger als einem Prozent der eingesäten Zellen gering (Abb. 33 A+C). In der Literatur wurde beschrieben, dass konditioniertes Medium von Nichtparenchymzellen der Leber die Funktionalität kultivierter Hepatozyten deutlich verbesserte (Ries *et al.*, 2000). Konditioniertes Medium wurde aus Zellüberständen von Nichtparenchymzellen der Schweine- bzw. Rattenleber gewonnen und den

kryokonservierten Hepatozyten mit serumfreiem Medium im Verhältnis 1:1 für die Aussaat der Zellen und für weitere 24 h zugegeben (vgl. 2.2.1.5).

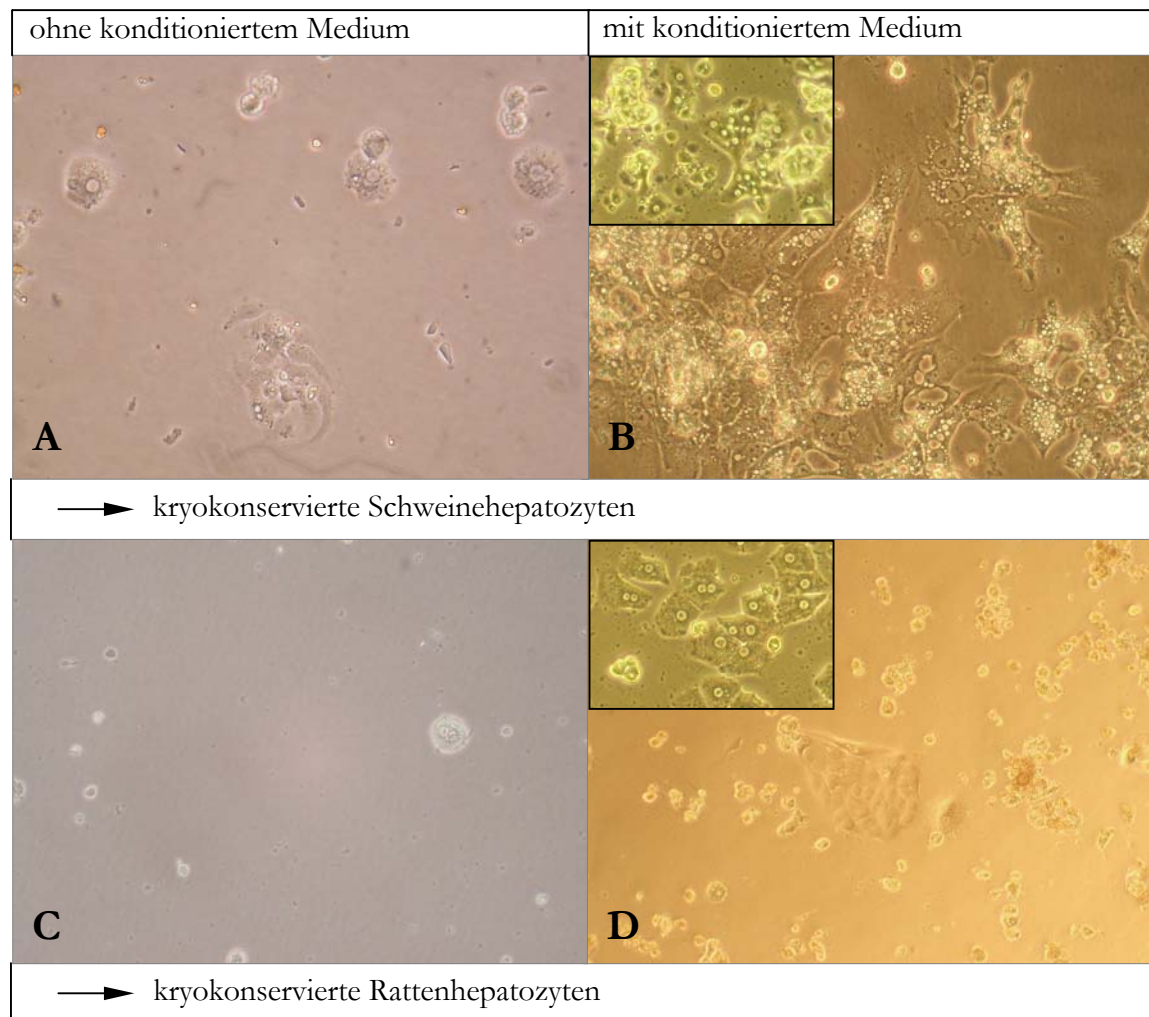


Abbildung 33. Verbesserung der Kultur von kryokonservierten Hepatozyten durch konditioniertes Medium von Nichtparenchymzellen der Leber. Mikroskopische Aufnahmen (200-fache Vergrößerung). A) 12 h alte kryokonservierte Schweinehepatozyten in HGM ohne konditioniertes Medium; B) 12 h alte kryokonservierte Schweinehepatozyten in HGM supplementiert mit 50 % konditioniertem Medium C) 15 h alte kryokonservierte Rattenhepatozyten in HGM ohne konditioniertes Medium; D) 15 h alte kryokonservierte Rattenhepatozyten in HGM supplementiert mit 50 % konditioniertem Medium (hier ist eine Kolonie von Endothelzellen sichtbar). Die Insets in B) und D) zeigen nicht-kryokonservierte Schweine- bzw. Rattenhepatozyten zum gleichen Zeitpunkt der Kultur.

Nach 12 h bzw. 15 h Kulturdauer führte die Verwendung von konditioniertem Medium zur Verbesserung der Kulturbedingungen, so dass sich deutlich mehr Schweinehepatozyten anhefteten als ohne konditioniertes Medium (Abb. 33 B vs. A). Auf die Anheftung von Rattenhepatozyten hatte die Verwendung von konditioniertem Medium allerdings keinen deutlichen Einfluss (Abb. 33 C vs. D). Das mikroskopische Bild kultivierter kryokonservierter Schweinehepatozyten unterschied sich nicht wesentlich von dem nicht-kryokonservierter Hepatozyten (Abb. 33 B und eingefügtes Bild). Die Zellen besaßen eine polygonale Gestalt,

vesikuläre Einschlüsse, die Lichtstreuung verursachten und kanalikuläre Strukturen an den basolateralen Zellverbindungen, die für den epithelialen Charakter der Zellen sprachen. Die Kultur kryokonservierter Rattenhepatozyten ließ dagegen keine funktionellen Hepatozyten erkennen (Abb. 33 D und eingefügtes Bild). Daher wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeiten die Untersuchungen zur Charakterisierung der leberspezifischen Eigenschaften nur noch mit Schweinehepatozyten fortgeführt.

In der Tabelle 12 ist für Schweinehepatozyten eine Gesamtbilanz der Zellzahl ausgehend von der Anzahl Zellen vor dem Einfrieren aufgestellt. Durch die Aufreinigung mit Percoll wurde eine Vitalität der Zellen von 90 % erreicht. Das entsprach in mit Glyzin behandelten Zellen einer Ausbeute von 30 % der ursprünglichen Zellzahl. Ohne Glyzin lag die Ausbeute nur bei ca. 6 %. In der folgenden Kultur wurden die Zellen nur in Gegenwart von konditioniertem Medium gehalten. Insgesamt betrug die Ausbeute 18 % der ursprünglichen Zellzahl (Tab. 12).

	Vitalität	Gesamtbilanz
Vor der Kryokonservierung	90% ± 5%	100%
Nach der Kryokonservierung (Auftauen)	60%	66,6%
Nach der Kryokonservierung und der Percollaufreinigung ohne Glyzin	90%	5,7% ± 1,2%
mit Glyzin		30% ± 2,2%
Nach der Kryokonservierung und der Anheftung an kollagenbeschichtete Kulturschalen ohne konditioniertes Medium		n.n.
mit konditioniertem Medium		18%

Tabelle 12. Vitalität und Ausbeute von Schweinehepatozyten nach der Kryokonservierung. n.n.- nicht nachweisbar

Abb. 34 zeigt den Verlauf einer Kultur kryokonservierter Schweinehepatozyten über vier Tage. Die kryokonservierten Zellen wurden in MEM, das mit 50 % konditioniertem Medium versetzt war, eingesät. Der erste Medienwechsel erfolgte 4 h später mit 50 % HGM und 50 % konditioniertem Medium. Ab dem zweiten Medienwechsel wurde das Medium aller 24 h ausgetauscht. Auf der Abbildung 34 A ist deutlich zu erkennen, dass sich Hepatozyten an den kollagenierten Boden der Kulturschale angeheftet haben. Diese Zellen flachten sich im Verlauf

der Kultur ab und boten nach 17 h das typische mikroskopische Bild von Hepatozyten (Abb. 34 B). Im weiteren Kulturverlauf flachten sich die Zellen weiter ab, begannen zu proliferieren (Abb. 34 C) und bildeten schließlich auf der Kulturschale einen konfluenten Monolayer (Abb. 34 D).

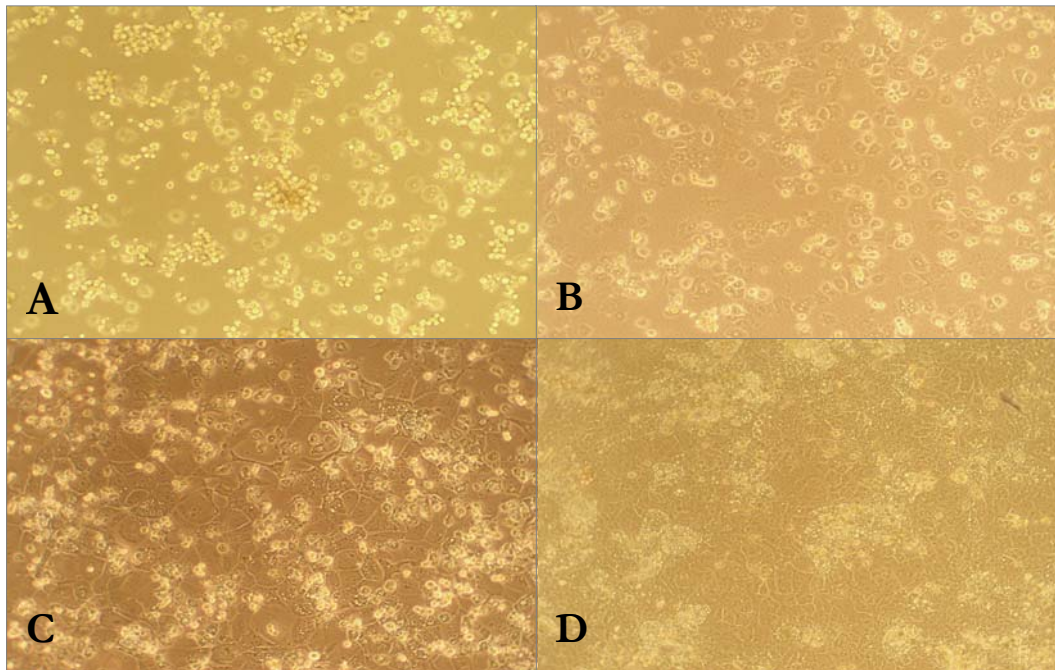


Abbildung 34. Verlauf einer Kultur kryokonservierter Schweinehepatozyten. Mikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung). A) 3½ h nach dem Auftauen und Aussaat in gleichen Teilen MEM und konditioniertem Medium von Nichtparenchymzellen der Schweineleber; B) weitere 14 h Kultur in Medium zu gleichen Teilen HGM und konditioniertes Medium; C) 72 h Kultur, von 48 h - 72 h in HGM; D) 96 h Kultur, von 72 h – 96 h in HGM. Bei der Kultivierung in HGM erfolgte ein Medienwechsel alle 24 h.

Unter den so gewählten Kulturbedingungen nahm die Zellzahl im untersuchten Zeitraum von 5 d gegenüber den Ausgangswerten ca. 3-fach zu. Damit wurde gezeigt, dass kryokonservierte Schweinehepatozyten unter den hier entwickelten Kulturbedingungen ihre typische Proliferationsfähigkeit erhalten konnten (Abb. 35).

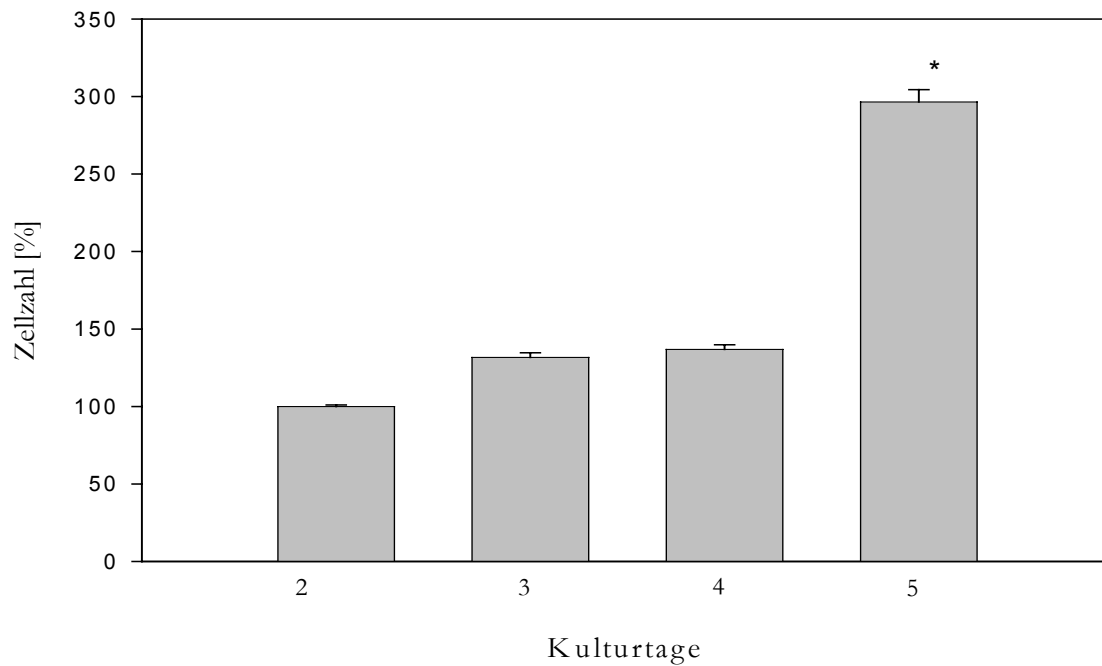


Abbildung 35. Zunahme der Zellzahl kryokonservierter Schweinehepatozyten in Kultur. Die Kulturbedingungen entsprachen denen unter Abb. 34 beschrieben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei verschiedenen Zellpräparationen; * $p \leq 0,01$ im Vergleich zum 4. Kulturtag.

Charakterisierung leberspezifischer Eigenschaften

Unter *in vivo* Bedingungen gehört die Übernahme leberspezifischer Funktionen, wie der Fremdstoffmetabolismus durch das Cytochrom P450-Enzymsystem (CYP450) oder die Entgiftung von Ammoniak über den Harnstoffzyklus zu den typischen Merkmalen von Hepatozyten. Um den Nachweis zu erbringen, dass kryokonservierte Schweinehepatozyten diese Eigenschaften auch unter den hier gewählten serumfreien Kulturbedingungen besaßen, wurden die Aktivität der CYP1A1 und 2B1, die Harnstoffsyntheserate sowie die Expression leberspezifischer Gene in 2 Tage alten Zellen für einen Zeitraum von 4 Tagen bestimmt.

Cytochrom P450-Aktivität

Die Aktivitäten der 7-Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) und der Pentoxyresorufin O-dealkylase (PROD), die die Cytochrom P450-Subtypen CYP1A1 und CYP2B1 repräsentieren, wiesen während der Kulturtag 2 und 3 ca. 10-fach höhere Werte als in nicht-kryokonservierten Schweinehepatozyten der gleichen Präparation auf. Ab Tag 4 fiel die Aktivität stark ab, die Werte betragen nur noch 10 % der Ausgangswerte am Tag 2 (Abb. 36). Dieser Unterschied ließ sich aus dem unterschiedlichen zeitlichen Verlauf der Aktivitäten in den unterschiedlichen

Zellpräparationen erklären: Die EROD-Aktivitäten in nicht-kryokonservierten Hepatozyten war am Tag 1 der Kultur der in kryokonservierten Hepatozyten am Tag 2 und 3 der Kultur vergleichbar, wohingegen die PROD-Aktivität in nicht-kryokonservierten Hepatozyten am Tag 1 der Kultur niedriger als in kryokonservierten Hepatozyten am Tag 2 und 3 war. Die EROD und PROD Aktivitäten der nicht-kryokonservierten Hepatozyten verminderten sich im weiteren Kulturverlauf, während die Aktivitäten bei kryokonservierten Hepatozyten bis zum dritten Kulturtag auf hohem Level erhalten blieben. Daraus resultierten die bis zu 10-fach höheren PROD-Aktivitäten in kryokonservierten Hepatozyten im Vergleich zu nicht-kryokonservierten Hepatozyten.

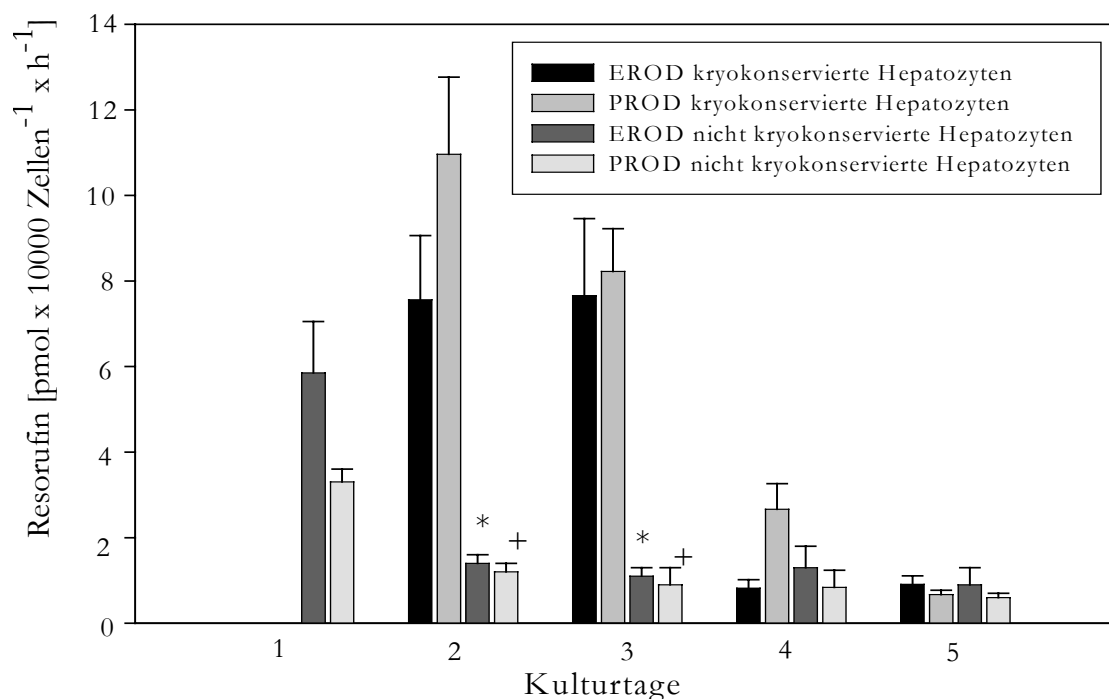


Abbildung 36. Cytochrom P450 Aktivität in serumfrei kultivierten kryokonservierten Schweinehepatozyten über 5 Kulturtage im Vergleich zu nicht-kryokonservierten Schweinehepatozyten. Die Enzymaktivitäten wurden an den angegebenen Tagen der Kultur bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus mindestens zwei verschiedenen Zellpräparationen in jeweils 2 voneinander unabhängigen Messungen; *, + $p \leq 0,05$ verglichen mit den Werten der kryokonservierten Hepatozyten am gleichen Kulturtag.

Die Daten zu den nicht-kryokonservierten Schweinehepatozyten wurden freundlicherweise von Dr. H. Aurich (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universität Halle) zur Verfügung gestellt.

Ammoniakentgiftung

Die Harnstoffsynthese in kryokonservierten Schweinehepatozyten in Kultur fiel vom 2.-5. Kulturtag allmählich ab und resultierte am fünften Tag in nur 10 % der Harnstoffproduktion des zweiten Tags (Abb. 37). Dies war vergleichbar mit den Werten aus der Kultur nicht-kryokonservierter Schweinehepatozyten der gleichen Präparation (Tag 2: $22,11 \pm 0,3 \text{ nmol} \times 10000 \text{ Zellen}^{-1}$; Tag 5: $3,13 \pm 0,7 \text{ nmol} \times 10000 \text{ Zellen}^{-1}$). Die unveröffentlichten Daten zu den nicht-kryokonservierten Schweinehepatozyten wurden freundlicherweise Weise von Dr. H. Aurich (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Universität Halle I) zur Verfügung gestellt.

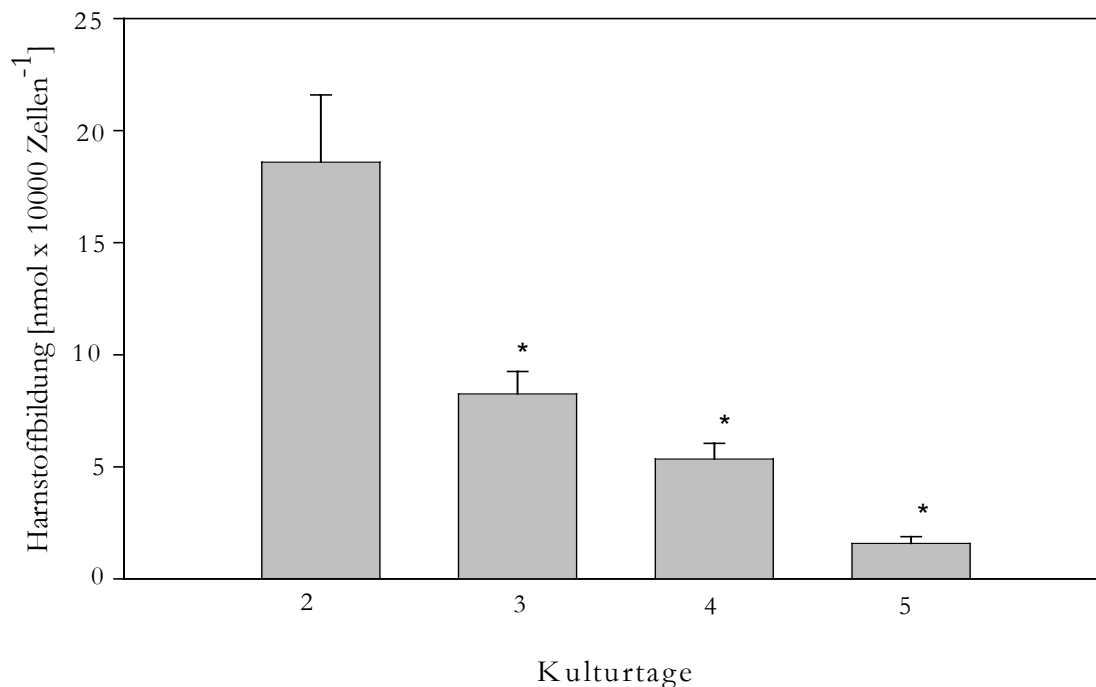


Abbildung 37. Harnstoffsynthese in serumfrei kultivierten kryokonservierten Schweinehepatozyten über 5 Kulturtage. Die Harnstoffkonzentration wurde an den angegebenen Tagen der Kultur im Mediumüberstand gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus zwei verschiedenen Zellpräparationen in jeweils 2 voneinander unabhängigen Versuchen; * $p \leq 0,01$ die Harnstoffkonzentration unterscheidet sich signifikant vom Wert am Tag 2.

Expression leberspezifischer Gene

Die Expression leberspezifischer Gene wurde in kultivierten kryokonservierten Schweinehepatozyten durch RT-PCR nachgewiesen. In 6 verschiedenen Präparationen kryokonservierter Schweinehepatozyten, die 48 h kultiviert wurden, konnten die mRNAs von Albumin, Transferrin, CYP1A1, CPS und PCK detektiert werden; GAPDH diente zur Ladungskontrolle. α -Fetoprotein wurde außer in einer Probe nicht detektiert, sichtbar sind nur die Primer. Dies zeigte, dass Schweinehepatozyten, die nach der Kryokonservierung kultiviert wurden, ihren differenzierten Phänotyp erhielten (Abb. 38).

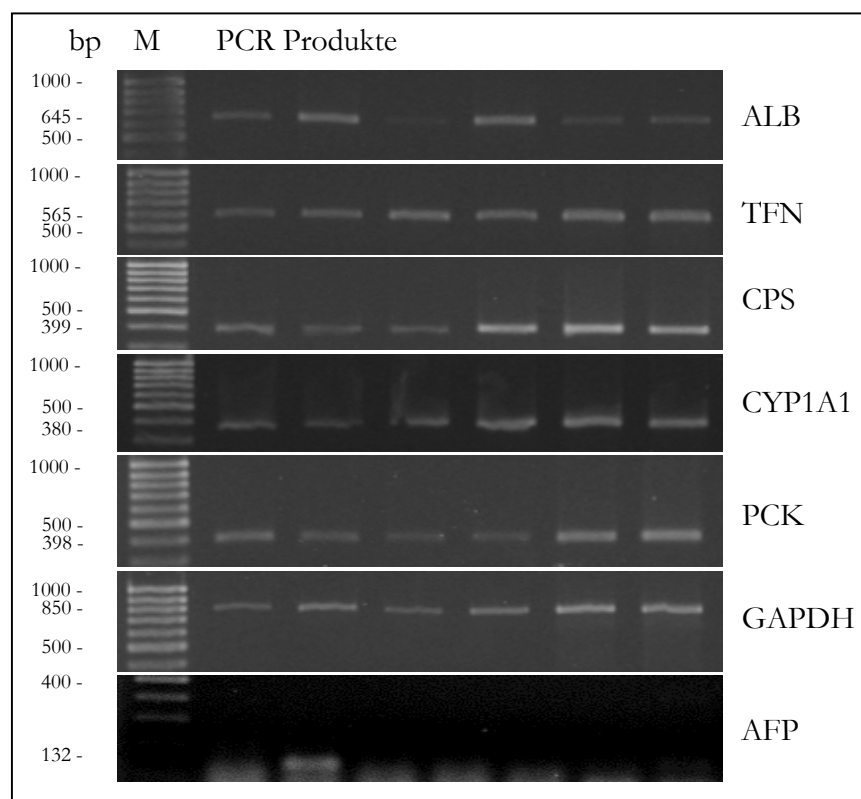


Abbildung 38. Nachweis der Expression leberspezifischer Gene in kultivierten kryokonservierten Schweinehepatozyten nach 48 h Kultur durch RT-PCR. Die 6 unterschiedlichen Bahnen zeigen PCR-Produkte von 6 verschiedenen Zellpräparationen. Albumin (ALB), Transferrin (TFN), Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS), Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1), Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und α -Fetoprotein (AFP). Die Größe des jeweiligen PCR-Produktes nach der Amplifikation mit spezifischen Primerpaaren (vgl. 2.1.4) ist markiert. M – DNA Größenmarker.

Die Expression der leberspezifischen Gene Transferrin, CYP1A1, CPS und PCK blieb über einen Zeitraum von 4 Tagen in der Kultur konstant. Während die Expression des Albumingens im Laufe der 4-tägigen Kultur in den Zellen abnahm, nahm die des AFP über den Kulturverlauf zu (Abb. 39). Der Zeitpunkt der Zunahme des AFP bzw. der Abnahme des Albumin fiel mit dem Zeitpunkt der Zunahme der Zellzahl zusammen (vgl. Abb. 35). Die Ergebnisse der AFP-

PCR wurden freundlicher Weise von Dr. I. Schäffner (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universität Halle) zur Verfügung gestellt.

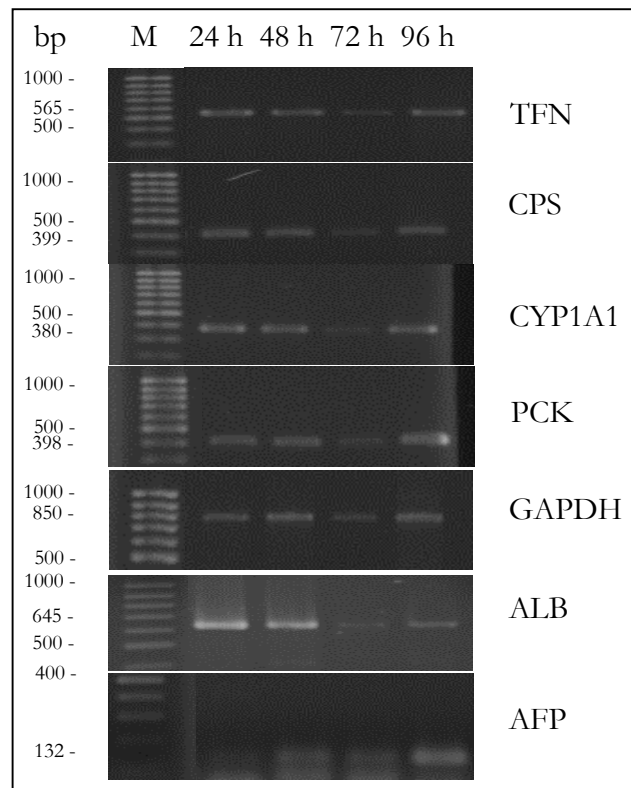


Abbildung 39. Nachweis der Expression leberspezifischer Gene in kultivierten kryokonservierten Schweinehepatozyten. Gesamt-RNA wurde aus den Zellen einer Zellpräparation zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und die mRNA des Albumin (ALB), Transferrin (TFN), α -Fetoprotein (AFP) und Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) sowie die der Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS), Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durch RT-PCR nachgewiesen. M – DNA Größenmarker.

3.2.3 Verwendung kryokonservierter Schweinehepatozyten in gentoxikologischen Untersuchungen

Die unter 3.2.2 beschriebenen Daten zeigen, dass Schweinehepatozyten nach Kryokonservierung ihre leberspezifischen Eigenschaften erhielten. Deshalb sollte ihre Einsatzfähigkeit in gentoxikologischen Analysen im Comet Assays unter Verwendung des komplexen Stoffgemisches getestet werden. Die eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut, über Percoll gereinigt und für 1 h mit dem komplexen Stoffgemisch über eine Konzentration von 0,005 mg/ml bis zu 0,08 mg/ml behandelt. Die Dosis-Wirkungsbeziehung zeigt, dass die Kometenschweiflänge proportional zur Testkonzentration zunahm. Bereits ab der geringsten getesteten Konzentration von 0,005 mg/ml zeigten die kryokonservierten Schweinehepatozyten eine signifikante Erhöhung der Kometenschweiflängen aufgrund der Schädigung der DNA durch Einzelstrangbrüche und AP-Stellen. Weder in der Negativkontrolle noch in der Vehikelkontrolle (56 μ M DMSO) wurden DNA-Schäden nachgewiesen. Die Behandlung der Zellen mit 300 μ M H_2O_2 (Positivkontrolle) ebenso wie die mit dem komplexen Stoffgemisch in Konzentrationen größer als 0,08 mg/ml führte zur vollständigen Zerstörung der DNA (Abb. 40). Diese Ergebnisse stimmten mit denen an nicht-kryokonservierten primären Hepatozyten überein.

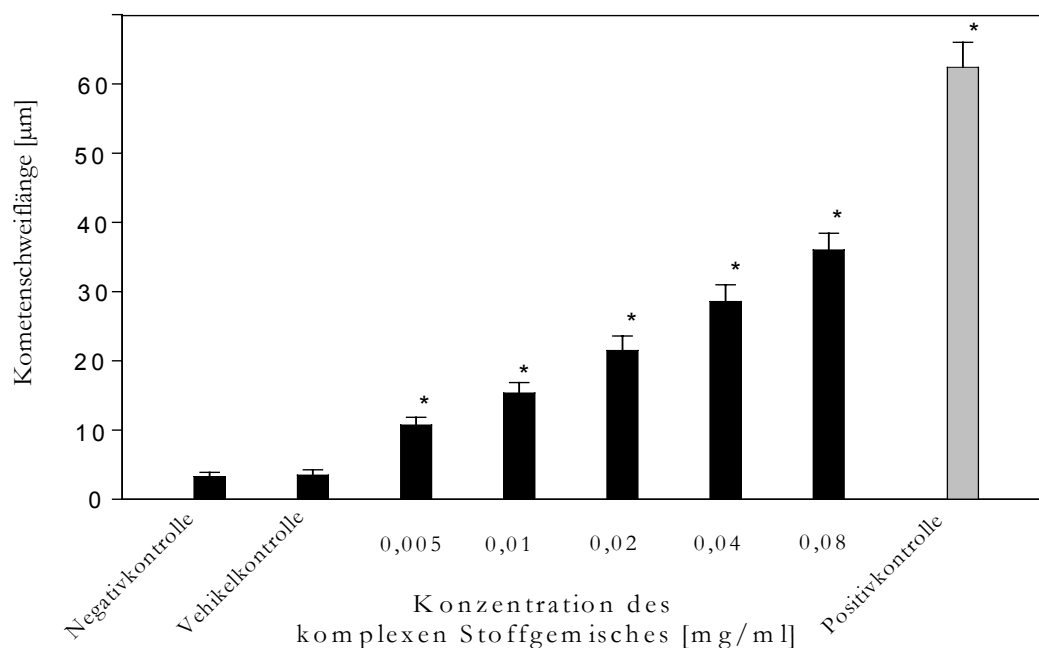


Abbildung 40. Abhängigkeit der Induktion von DNA-Schädigungen im Comet Assay von Behandlung kryokonservierter Schweinehepatozyten mit ansteigenden Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für 1 h behandelt und die Kometenschweiflänge als Maß für die DNA-Schädigung im Comet Assay bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (pro Konzentration 100 Zellen, 2 Versuche). Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

4 Diskussion

Obwohl Menschen in ihrer Umgebung oder an ihrem Arbeitsplatz meist gegenüber einer Vielzahl von verschiedenen chemisch-komplex zusammengesetzten Gemischen exponiert sind, beschränken sich Studien in der Toxikologie oft auf einzelne Substanzen. Bis jetzt sind nur wenige spezielle Strategien oder Standardprotokolle zur Bestimmung der toxischen und gentoxischen Effekte chemisch-komplexer Gemische verfügbar; dabei werden dieselben Konzepte wie für die Einschätzung von Einzelsubstanzen zu Grunde gelegt (Bolt *et al.*, 1993; White, 2002; Yang *et al.*, 1989).

Die qualitative und quantitative Zusammensetzung des in der vorliegenden Arbeit untersuchten komplexen Stoffgemisches ist im Wesentlichen bekannt. Nur einige Komponenten davon sind gentoxikologisch charakterisiert, z. B. Hexachlorbenzol, Trichlortriazin, Hexachlorbutadien und Hexachlorcyclopentadien. Für die Mehrzahl der Komponenten sind keine gentoxikologischen Daten verfügbar. Aufgrund der in komplexen Gemischen zu erwartenden Interaktionen zwischen den Einzelsubstanzen (antagonistisch, synergistisch) ist eine toxikologische bzw. gentoxikologische Beurteilung für komplex zusammengesetzte Gemische schwierig. Aus der Bewertung und dem Vergleich der Konzentrationen der Einzelsubstanzen im untersuchten komplexen Stoffgemisch mit den bekannten gentoxischen Effekten waren die beobachteten Auswirkungen nicht zu erwarten.

In vivo-Untersuchungen zur Charakterisierung der toxischen Wirkungen von komplexen Stoffgemischen aus Plasmaätzprozessen (Bauer *et al.*, 1995) hatten gezeigt, dass ein geringes bis mittleres allgemeintoxisches Potential der Stoffgemische besteht. Targetorgane sind vor allem die Leber und die Lunge der Versuchstiere. Bei den gentoxischen Untersuchungen des komplexen Stoffgemisches wurden im bakteriellen Ames-Test eine konzentrationsabhängige Induktion verschiedener Genmutationen (Basenpaarsubstitutionen, frame-shift-Mutationen) beobachtet, im Flügel-Mosaik-Test mit *Drosophila* wurde die Auslösung von Genmutationen und somatischen Rekombinationen in Eukaryonten registriert, bei subchronischer Behandlung von Laborsäugern kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Mikrokernrate in polychromatischen Erythrozyten des Knochenmarks, was als Beweis für die aberrationsauslösende Potenz des Gemisches anzusehen ist.

Die *in vitro*-Untersuchungen zu gentoxischen Wirkungen des komplexen Stoffgemisches in primären tierischen und humanen Zellkulturen ergaben eine konzentrationsabhängige Auslösung von DNA-Strangbrüchen und die konzentrationsabhängige Induktion von Chromosomenaberrationen in humanen Lymphozyten (Müller, 2000). All diese Effekte könnten auf synergistische Interaktionen zwischen einzelnen Komponenten des komplexen Stoffgemisches

zurückzuführen sein. Als weitere Ursachen für die beobachteten Effekte kommen aber auch nicht-detektierbare Komponenten, die nur in Spuren im Gemisch vorhanden sind, und/oder erfasste Substanzen ohne toxikologische Datenlage in Frage. Zur genaueren Eingrenzung der tatsächlichen Auslöser der gentoxischen Effekte wurden chemisch-analytische Untersuchungen in die Arbeit aufgenommen, die außerdem als begleitende Analytik zur regelmäßigen Kontrolle der genauen Zusammensetzung des komplexen Stoffgemisches, der Fraktionen und der Modellgemische ausgelegt waren.

Diese Aufgaben dienten dem Ziel, weitere gentoxische Wirkungen des komplexen Stoffgemisches auf der DNA-Ebene zu erfassen und in den hier vorgestellten Säugerzellkultursystemen zu charakterisieren.

4.1 Gentoxikologische Untersuchungen

4.1.1 Erfassung des DNA-einzelstrangbruchinduzierenden Potentials

Vor Beginn der Arbeiten zu den gentoxikologischen Untersuchungen und später zur Identifizierung der toxikologischen Leitsubstanzen war es durch einen Wechsel des Auswertesystems erforderlich, dieses zu validieren, um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Ergebnisse der Comet Assay Studien und des Mikrokerntests demonstrieren die Fähigkeit des komplexen Stoffgemisches, DNA-Strangbrüche in humanen und tierischen Zellkulturen bzw. chromosomale Aberrationen in humanen Lymphozyten in einem direkten Konzentrations-Wirkungsmechanismus zu induzieren. Diese Resultate (vgl. Abb. 4 – 6 und Abb. 20) stimmen mit den früher erhobenen Befunden überein (Müller, 2000). Im Gegensatz zu den früheren Studien ist es mit dem neuen Auswertesystem möglich, geringe Veränderungen im Ausmaß der DNA-Schädigung (Strangbrüche und chromosomale Aberrationen) zu erfassen und zu charakterisieren. Wie erwartet, lösten 300 μM H_2O_2 , im Comet Assay detektierbare und mit der Literatur korrelierende DNA-Einzelstrangbrüche aus (vgl. Abb. 4 – 6; Singh *et al.*, 1988). Damit wurde die Anwendbarkeit der Methode bestätigt. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass durch den Lösungsvermittler DMSO keine Schädigungen an der DNA hervorgerufen werden (vgl. Abb. 4 - 6), sodass die Untersuchungsergebnisse durch die Vehikelkontrolle nicht beeinflusst werden.

Da DNA-Fragmentation bekanntlich auch während des Vorganges der Apoptose auftritt, diskutieren einige Autoren darüber, dass Apoptose falsch-positive Resultate im Comet Assay liefern könnte (Baisch *et al.*, 1999; Choucroun *et al.*, 2001; Florent *et al.*, 1999; Godard *et al.*, 1999). Roser *et al.*, 2001 konnte zeigen, dass Stauroporin, ein gängiges Apoptose-induzierendes Agens,

keine Strangbrüche in HAT-29 Kolonkarzinomzellen induzierte und gentoxische Konzentrationen der Strangbruch-induzierenden Substanz N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin im gleichen Testsystem keine Apoptose auslöste. Rundell *et al.*, 2003 bewies in seinen Studien zum Vergleich gentoxischer Schäden und Kernfragmentation, dass keine apoptotische Zellen im Comet Assay erfasst werden. Es gibt Gründe zu der Annahme, dass die hier durchgeführten Studien nicht durch Begleitprozesse der Apoptose beeinflusst wurden. So besitzen die verwendeten Zellkultursysteme nicht die spezielle Sensitivität gegenüber apoptotischen Prozessen wie die von Choucroun *et al.*, 2001 genutzten Jurkat-Zellen. Die Auswertung folgte der Klassifikation nach Godard *et al.*, 1999, es wurden keine Zellen mit einem sogenannten „hedgehog-tail“ gemessen. Dieser Kometenschweif hat charakteristischer Weise einen kleinen Kopf und einen breiten Schwanz im mikroskopischen Bild. Wada *et al.*, 2003 konnte durch TUNEL-Analysen zeigen, dass alle apoptotischen Kometen im Comet Assay auch apoptotische Zellen sind. Es wurden nur Zellsuspensionen mit mindestens 85% Vitalität nach der Behandlung mit komplexem Stoffgemisch im Comet Assay untersucht. Dies impliziert, in Kombination mit einer geringen Behandlungszeit von 1-2 h, dass die beobachteten positiven Ergebnisse infolge gentoxischer Effekte des komplexen Stoffgemisches auftraten und nicht durch apoptotische Vorgänge verfälscht wurden.

Wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben kann der Einsatz des S9-Mix allein, zytotoxisch oder gentoxisch auf die im Test verwendeten Zellen wirken (vgl. 2.2.3). Durch entsprechende Kontrolltests konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des S9-Mix in den von uns ausgewählten Konzentrationen keine DNA-Strangbrüche auslöste und nicht zytotoxisch wirkte. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die DNA-Schädigungen auf die Wirkungen der Testsubstanzen zurückzuführen waren und nicht durch methodische Artefakte ausgelöst wurden. In den parallel durchgeführten Untersuchungen mit und ohne Zusatz von S9-Mix konnten keine Unterschiede im Ausmaß der DNA-Schädigung gefunden werden. Das ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass das gentoxische Potential der Substanzen auch ohne Metabolisierung sehr hoch ist. Andererseits spielten auch sogenannte „Entgiftungsmechanismen“ keine Rolle, die zu einer Verringerung der gentoxischen Effekte nach gleichzeitiger Gabe mit der Testsubstanz geführt hätten. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da sich schon in vorherigen Untersuchungen (Bauer *et al.*, 1995) im bakteriellen Ames-Test zeigte, dass die Reversionsrate durch Zugabe von S9-Mix nicht beeinflusst wurde.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen an Bronchialepithelzellen weisen darauf hin, dass die Lunge als Haupteintrittspforte des Stoffgemisches in den Organismus besonderen gentoxischen Einflüssen ausgesetzt ist. In Kombination mit den humanen Lymphozyten ergaben die zwei humanen Zellkultursysteme überzeugend reproduzierbare Resultate. Das in der Arbeit

untersuchte komplexe Stoffgemisch löste in primären humanen Zellkultursystemen DNA Einzel- und -Doppelstrangbrüche aus. Dies ist ein Indikator für das genotoxische Potential des komplexen Stoffgemisches.

4.1.2 Erfassung des aberrationsauslösenden Potentials

Die Ergebnisse des *in vitro* Mikrokerntestes an doppelkernigen humanen Lymphozyten korrespondierten mit den früheren *in vivo* Studien zu den PCE des Rückenmarks behandelter Tiere und belegen die aberrationsauslösende Wirkung des komplexen Stoffgemisches (Bauer *et al.*, 1992a; Bauer *et al.*, 1996; Bauer *et al.*, 1992b; Müller, 2000). Die dargestellten Daten sind vergleichbar mit den Beobachtungen einer Studie an Instandhaltungsmechanikern aus der Halbleiterindustrie (Roos, 1992; Szadkowski and Roos, 1989). Dabei wurden signifikante Unterschiede von Mikrokernraten in den peripheren Lymphozyten des Wartungspersonals im Vergleich zur Kontrollgruppe registriert. In späteren Kontrolluntersuchungen nach der Optimierung von Arbeitsschutzmassnahmen waren die Raten an Mikrokernen in beiden Gruppen vergleichbar.

Wie oben beschrieben, ist es unwahrscheinlich, dass die Ergebnisse des Mikrokerntests durch Apoptose/Nekrose verfälscht wurden. Daher folgten wir nicht der Spezifikation des Cytokineseblock-Mikrokerntests, wie von Fenech, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2003 beschrieben, mit der eine solche Unterscheidung möglich wäre.

Das Ergebnis des Mikrokerntests ist ein weiterer sicherer Hinweis auf das genotoxische Potential des komplexen Stoffgemisches im humanen System. Wenn auch durch den gewählten Versuchsansatz keine Unterscheidung zwischen strukturellen und numerischen Aberrationen möglich war, ist die aberrationsauslösende Wirkung an sich ausschlaggebend für die Charakterisierung des von dem komplexen Stoffgemisch ausgehenden genotoxikologischen Risikopotentials. Um Aufschluss über den Mechanismus der Aberrationen zu erhalten, wäre es erforderlich, weitere Untersuchungen mit einem fluoreszierenden antikinetor Antikörper, z.B. eine CREST-Färbung, vorzunehmen (Degrassi and Tanzarella, 1988; Fenech and Morley, 1989; Miller and Adler, 1990).

Die hier vorgestellten Untersuchungen belegen also die Einsatzfähigkeit der Methode, des Auswertesystems und der Zellkultursysteme zur Evaluation der Einzelkomponenten des komplexen Stoffgemisches.

4.1.3 Erfassung des DNA-doppelstrangbruchinduzierenden Potentials

Durch die Etablierung des neutralen Comet Assays bei $\text{pH} = 9,0$ von Singh and Stephens, 1997 konnte demonstriert werden, dass das komplexe Stoffgemisch neben DNA-Einzelstrangbrüchen auch die für die Reparaturmechanismen schwieriger zu behandelnden DNA-Doppelstrangbrüche in humanen Lymphozyten und lymphoblastoiden TK6-Zellen konzentrationsabhängig auslöste (vgl.3.1.2). Die selektive Erfassung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch diesen Test konnte durch die Ergebnisse aus den Voruntersuchungen unter Einsatz von Wasserstoffperoxid validiert werden. Der Nachweis von Doppelstrangbrüchen ist im Hinblick auf deren Reparatur und die möglichen mutagenen Ereignisse von Wichtigkeit. Vamvakas und Mitarbeiter postulierten, dass die Reparatur von Doppelstrangbrüchen ein komplexer Vorgang ist, bei dem auch nach erfolgter Reparatur Gentranslokationen, Rearrangements und Deletionen auftreten können, die wiederum Zelltransformationen und Tumorentwicklung fördern (Vamvakas *et al.*, 1997) Auch Singh, 2000, erwähnt, dass der Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen als Indikator für Genotoxizität wichtig sei, da die Reparatur schwieriger als bei Einzelstrangbrüchen ist und unreparierte Brüche zum Zelltod führen können. Allerdings treten Doppelstrangbrüche seltener auf als Einzelstrangbrüche (Singh, 2000). Ein direkter quantitativer Vergleich zwischen neutralem und alkalischem Comet Assay ist auf Grund der Unterschiede im Testablauf und der elektrophoretischen DNA-Auftrennung nicht möglich.

4.1.4 Erfassung der Reparaturfähigkeit

Um die Fähigkeit der humanen Lymphozyten zur Reparatur von DNA-Brüchen nach der Behandlung mit komplexem Stoffgemisch bzw. dessen Fraktionen zu erfassen, wurde der zeitliche Verlauf der Reparatur der DNA-Schäden im Comet Assay beobachtet (3.1.4). Es konnte gezeigt werden, dass bei einstündiger Behandlung die DNA-Schädigung der humanen Lymphozyten durch das komplexe Stoffgemisch nach 120 min wieder auf dem Niveau der Negativkontrolle war. Im Gegensatz dazu ließen sich bei den über 24 h behandelten Lymphozyten nach gleicher Reparaturzeit noch DNA-Brüche nachweisen. Mit den hier vorgelegten Ergebnissen zur unvollständigen Reparatur der DNA-Strangbrüche konnten die Resultate der Untersuchungen zur Induktion von Mikrokernen bestätigt werden, denn DNA-Brüche sind u.a. die Voraussetzung für Chromosomenaberrationen. Laut Vamvakas *et al.*, 1997; Würzler, 1993 geben diese Ergebnisse wiederum einen Hinweis auf das genotoxische Potential des komplexen Stoffgemisches. Wie erwartet konnte nachgewiesen werden, dass die Vehikelkontrollen DMSO bzw. DCM keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatten.

Bei den Lymphozyten kam es nach den ersten Reparaturminuten zu einem signifikanten Rückgang der Kometenschweiflängen, ein deutlicher Hinweis auf das Einsetzen der Reparaturprozesse. Die geringste Reparaturkapazität wurde in Zellen nach einstündiger Behandlung mit komplexem Stoffgemisch registriert. Sie unterschieden sich aber nicht signifikant von den anderen errechneten Reparaturkapazitäten. Diese Ergebnisse korrelieren mit in der Literatur beschriebenen Daten zur Reparaturkapazität humaner Lymphozyten (Harreus *et al.*, 2001; Singh, 2000).

Inwieweit die DNA-Strangbrüche korrekt repariert wurden oder nach der Reparatur Mutationen entstanden, ließ sich nach weiteren Untersuchungen zur Induktion von Genmutationen einschätzen.

4.1.5 Erfassung des mutationsauslösenden Potentials

Eine Gentoxizitätstestung umfasst nicht nur die Untersuchung auf Vorstufen von Mutationen sondern auch die Detektion der induzierten Mutationen (Würgler, 1993). Dazu sollte in der vorliegenden Arbeit der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test (HPRT-Test) an humanen Lymphozyten Anwendung finden. Dieser Test erfasst Mutationen im X-chromosomalen Strukturgen *hprt* oder in dessen Regulatorregion. Die Bestimmung der Mutationsfrequenz im HPRT-Test war undurchführbar, da die Auswertung der Mikrotiterplatten nicht möglich war (vgl. 3.1.5.1). Denkbare Fehlerquellen wären die ungenügende Wartezeit zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber Thioguanin und das Fehlen des LAK Überstandes. Die Ausprägung der Resistenz dauert im HPRT-Test 6-10 Tage (Glatt, 1993), diese wurden nicht eingehalten, vielmehr wurden die Zellen gleich nach der Behandlung in Mikrotiterplatten gesät. Der Zusatz von LAK Überstand wird in einigen Literaturstellen erwähnt (Branda *et al.*, 1992; Burkhart-Schultz and Jones, 1997), aber auch der in der vorliegenden Arbeit angewandte Einsatz von Interleukin 2 wird in der Literatur beschrieben (Branda and Albertini, 1995; Uematsu *et al.*, 1997).

Der HPRT-Test wurde als nächstes an den stabileren humanen lymphoblastoiden TK6-Zellen durchgeführt. Dieser Test ist laut Literaturdaten genauso ausreichend validiert wie der HPRT-Test an humanen Lymphozyten (Cochrane and Skopek, 1994; Furth *et al.*, 1981; Leong-Morgenthaler *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 1990; Steen *et al.*, 1997a; Sussman *et al.*, 1999). Während der Durchführung wurde auf die Expressionszeit des resistenten Phänotyps geachtet (vgl. 2.2.6.1). Auch bei diesem Testansatz war eine Bestimmung der Mutationsfrequenz nicht durchführbar, da eine Auswertung der selektiven Mikrotiterplatten nicht möglich war. Das

Versagen des Guanin-Analogons 6-Thioguanin kann ausgeschlossen werden, da Analysen zum Verhalten von Wachstumskurven der Zellen mit ansteigenden Thioguaninkonzentrationen parallel durchgeführt wurden. Dabei zeigten sich keine Unregelmäßigkeiten. Aus den gegenwärtigen Resultaten der Arbeit kann geschlossen werden, dass sich der HPRT-Test als Genmutationstest nicht für das hier untersuchte komplexe Stoffgemisch aus halogenierten Kohlenwasserstoffen eignet.

Die Vermutung, dass das hier untersuchte komplexe Stoffgemisch Genmutationen auslöst, konnte durch den Einsatz des Maus-Lymphoma-TK^{+/-}-Assays (MLA) zweifelsfrei bewiesen werden (vgl. 3.1.5.2). Es konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Mutationsfrequenzen nach Behandlung mit komplexem Stoffgemisch beobachtet werden. Der mutagene Effekt im MLA basierte auf der Induktion von großen Kolonien, die Induktion von kleinen Kolonien, die meist durch Chromosomenaberrationen entstehen, spielte eine geringere Rolle und nahm erst bei höheren Testkonzentrationen (ab 0,005 mg/ml) zu. Durch eine Analyse zur Prüfung auf den Verlust- der- Heterozygotie (LOH-Analyse) polymorpher Marker besteht die Möglichkeit zur Aufklärung des Umfangs und der Art des Verlustes innerhalb oder rund um den *tk* – Locus. Für das Chromosom 11 der Maus, auf welchem sich der *tk* – Locus befindet, sind einige einfache Sequenzwiederholungs-polymorphismen beschrieben (Liechty *et al.*, 1998; Rothfuss *et al.*, 2000). Ein LOH von Markern innerhalb oder nah am *tk* -Allel tritt generell als Konsequenz von Deletionen oder Rekombinationen auf, während ein LOH an allen Loci wahrscheinlich infolge eines Totalverlustes des Chromosoms erscheint. LOH- Analysen von durch komplexes Stoffgemisch induzierten Mutanten kleiner Kolonien offenbarten in allen Untersuchungen LOH- Mutanten ab Locus *D11Agl1*. Das weist darauf hin, dass ein teilweiser Verlust des *tk* Gens der Grund für die TK-Defizienz war. Es konnten Unterschiede in den LOH- Mustern von spontanen und durch das komplexe Stoffgemisch induzierten Mutanten registriert werden. Kein LOH, also Genmutationen, traten verstärkt nur bei den induzierten Mutanten großer Kolonien auf. Damit konnten Hinweise aus der Literatur bestätigt werden, dass kleine Kolonien zumeist durch Chromosomenmutationen entstehen (Clements, 2000). Auch kleine Deletionen und Rekombinationen, LOH am *D11Agl1*, wurden häufiger bei induzierten Mutanten großer Kolonien verzeichnet, als bei spontan entstandenen Mutanten großer Kolonien. Im Gegensatz dazu zeigten die induzierten Mutanten kleiner Kolonien vermehrt große Deletionen bzw. Totalverlust des Chromosoms, LOH ab *D11Mit67*, im Vergleich zu den spontanen Mutanten. Anzumerken sei, dass diese Mutationen bei induzierten Mutanten großer Kolonien im Vergleich zu spontan entstandenen Mutanten seltener auftraten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass ein bestimmter Typ DNA-Schädigungen für die Mutationen verantwortlich war. Die vorliegenden Resultate deuten darauf hin, dass verstärkt Modifikationen innerhalb des

Genes auftraten, die offensichtlich nicht so schnell und effizient repariert werden konnten. Somit wurden die primären DNA-Schäden als Mutationen fixiert (Ward, 1995). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Befunden aus dem Ames-Test überein. Dabei wurden durch den Einsatz von verschiedenen Salmonella-Stämmen (TA 1535 und 100: Basenpaarsubstitutionen, TA 1537 und 98: Frameshiftmutationen) signifikant erhöhte Reversionsraten beobachtet, die auf Genmutationen schließen lassen. Es wurde aber kein Hinweis auf die Bevorzugung eines bestimmten Genmutationstyps gefunden (Bauer *et al.*, 1995).

Die verfügbaren Resultate aus dem MLA zeigen aber auch, dass bei der Induktion von Mutationen durch das komplexe Stoffgemisch klastogene Mechanismen eine Rolle spielten. Diese Vermutung wird auch durch die Ergebnisse aus dem Mikrokerntest (vgl. 3.1.3) gestützt. Wie oben erwähnt, konnte ab der Testkonzentration 0,005 mg/ml eine signifikante Erhöhung der Mutantenfrequenzen von kleinen Kolonien im Testsystem ohne Zusatz von S9-Mix gegenüber der Behandlung mit S9-Mix beobachtet werden. Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit den bisher erhobenen Daten zur Charakterisierung des direkten oder indirekten genotoxischen Potentials des komplexen Stoffgemisches in den Behandlungen mit/ ohne S9-Mix im Comet Assay und Mikrokerntest. Ähnliche Resultate wurden nur bei den Untersuchungen der 2-Komponenten-Modellgemische detektiert, die zeigten, dass eine Metabolisierung der Inhaltsstoffe vorwiegend Genmutationen auslöste.

Die Erwartungen zu den Positivkontrollen der bekannten Mutagene MMS und B(α)P konnten bestätigt werden, es kam zu einer signifikanten Erhöhung der Mutationsfrequenzen im MLA. Durch den Einsatz von B(α)P konnte auch die Funktionalität des S9-Mix sicher nachgewiesen werden, da B(α)P nicht direkt genotoxisch wirkt, sondern erst nach Metabolisierung, also indirekte genotoxische Wirkungen besitzt. Eine Charakterisierung der erfassten Mutationen erfordert weitere Untersuchungen und kann mit einem sogenannten Chromosomenpainting erfolgen (Clements, 2000).

Eine wichtige Schlussfolgerung, die aus den Resultaten des MLA gezogen werden kann, ist die direkte Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse zur Charakterisierung des mutagenen Potentials des komplexen Stoffgemisches auf den Menschen, da die mit diesem Test erfassten Mutationsfrequenzen mit der gleichen Häufigkeit in jedem anderen Gen und in jeder anderen Zelle auftreten könnten.

4.1.6 Erfassung der Koloniebildungsfähigkeit

Durch die hier vorliegenden Resultate zur Koloniebildungsfähigkeit von TK6-Zellen konnte eindeutig gezeigt werden, dass es nach der Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen an komplexem Stoffgemisch zu einer Abnahme der Überlebensfähigkeit der TK6-Zellen kam. Die gleichen Ergebnisse konnten auch im MLA bei der Erfassung der Klonierungseffizienz an L5178Y-Zellen beobachtet werden. Damit bestätigte sich, dass TK6-Zellen zur Untersuchung der Zytotoxizität von chemisch komplex zusammengesetzten Gemischen eingesetzt werden können (Lachance *et al.*, 1999).

Abschließend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass mit den etablierten Testsystemen eine Untersuchung chemisch komplex zusammengesetzter Gemische möglich ist. Dies ist ein sehr wichtiger Beitrag für die Erarbeitung von Teststrategien für komplexe Stoffgemische, die in der Toxikologie zunehmend an Bedeutung gewinnen (Feron *et al.*, 1995; Johnson and DeRosa, 1995; Simmons, 1995; Teuschler and Hertzberg, 1995).

4.2 Identifikation der toxikologischen Leitsubstanzen

Als toxikologische Leitsubstanzen werden die Stoffe eines chemisch komplex zusammengesetzten Gemisches definiert, die in den toxikologischen Untersuchungen am häufigsten als Auslöser toxischer Schädigungen identifiziert wurden. In den vorangegangenen Analysen zu den gentoxischen Wirkungen konnte gezeigt werden, dass der alkalische Comet Assay und der *in vitro* Mikrokerntest reproduzierbare Ergebnisse bei der Untersuchung des komplexen Stoffgemisches erzeugten. Aus diesem Grund wurden diese Testsysteme für weiterführende Untersuchungen eingesetzt.

Zur Identifikation der toxikologischen Leitsubstanzen wurden zuerst drei Fraktionen des komplexen Stoffgemisches untersucht. Die Fraktionen wurden durch präparative Gaschromatographie gewonnen; ihre Inhaltsstoffe sind bekannt (vgl. Tab. 3). Sowohl in den Untersuchungen an humanen Primärzellen (periphere Lymphozyten und Bronchialepithelzellen) als auch an primären Rattenleberzellen konnte gezeigt werden, dass alle 3 Fraktionen des komplexen Stoffgemisches über ein DNA- strangbrechendes Potential verfügten, wobei die Fraktion #3 an der DNA aller drei Zellkultursysteme signifikant höhere Schädigungen induzierte (vgl. 3.1.1.2).

Auf einen Nachweis der Konzentrations-Wirkungsbeziehung konnte bei diesen Testungen zur Identifikation der toxikologischen Leitsubstanzen verzichtet werden. Die Testung von verschiedenen Konzentrationen oder Verlängerungen der Behandlungszeiten ergaben keine

wesentlichen Veränderungen der Ergebnisse. Deshalb wurden für die nachfolgenden Untersuchungen nur noch einstündige Behandlungszeiten und eine repräsentative Konzentration ausgewählt.

Es konnte wiederum gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Versuche an den beiden humanen primären Zellkultursystemen unter Zusatz des externen Metabolisierungssystems S9-Mix nicht verändert wurden. Dieses Ergebnis korreliert mit früher erhobenen Befunden in den Untersuchungen zum gesamten komplexen Stoffgemisch (siehe 3.1.1.1). Die Fraktionen verfügen auch ohne Metabolisierung über ein hohes genotoxisches Potential.

Auch bei den Rattenhepatozyten konnte eine signifikante Erhöhung der DNA-Schädigungen nach Behandlung mit Fraktion #3 gegenüber der Negativkontrolle und den anderen beiden Fraktionen nachgewiesen werden. Die Rattenhepatozyten zeigten einen hohen Schädigungsgrad der DNA. Der Grund hierfür ist, dass intakte Hepatozyten über eine große Palette an verschiedenen Metabolisierungsenzymen verfügen, die weit über die im S9-Mix enthaltene Enzymausstattung hinausgeht. Dieses Phänomen wurde schon früher in der Diplomarbeit registriert (Müller, 2000): Die Metabolisierung potentieller Prämutagene im Gemisch bewirkte eine Überlagerung mit zytotoxischen Effekten und machte eine Auswertung unmöglich. Dies konnte durch Beschränkung der Behandlungszeit verhindert werden und der Einsatz des neuen Auswertesystems ermöglichte durch seine hohe Sensitivität die Auswertung der Ergebnisse. Dem Einsatz intakter primärer Hepatozyten für *in vitro* Analysen zur metabolischen Umwandlung schreiben Sina und Mitarbeiter sowie Williams und Numoto eine große Praxisbedeutung zu (Sina *et al.*, 1983; Williams and Numoto, 1984). Die Einsatzfähigkeit primärer Hepatozyten im Comet Assay für Genotoxizitätstestungen an Pharmaka wird außerdem durch Martelli *et al.*, 2000 bestätigt.

Die untersuchten Zellkultursysteme verhielten sich bei der Testung der Fraktionen genauso wie bei den Untersuchungen des komplexen Stoffgemisches, damit bestätigte sich die Einsatzfähigkeit dieser Zellen für genotoxikologische Untersuchungen chemisch-komplex zusammengesetzter Gemische.

Durch den Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Zellkultursysteme und der Untersuchungen zum komplexen Stoffgemisch zu den Testungen der Fraktionen konnten Unterschiede im Ausmaß der DNA-Schädigungen registriert werden. Während in humanen Lymphozyten kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der DNA-Schädigung der Fraktionen im Vergleich zum komplexen Stoffgemisch beobachtet werden konnte, zeigte sich bei den NHBEZ und Rattenhepatozyten ein anderes Bild. In NHBEZ konnte eine Erhöhung um den Faktor 2 und in Rattenhepatozyten die vierfache Erhöhung der Schädigungen durch die einzelnen Fraktionen erfasst werden. Diese Ergebnisse geben wichtige Hinweise auf das Verhalten der Komponenten

im komplexen Gemisch. Eine bloße Summation der Schädigungen der Einzelkomponenten, wie von der EPA, 1989 beschrieben, kann somit nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse aus dem Mikrokerntest an doppelkernigen humanen Lymphozyten zeigten, dass die Fraktionen #2 und #3 chromosomale Aberrationen induzieren (vgl. 3.1.3.2), wobei die Fraktion #3 die stärksten Effekte auslöste und auch gegenüber der Fraktion #2 signifikant höhere Chromosomenaberrationsraten ermittelt wurden.

Auch die DNA-Reparaturstudien mit Hilfe des neutralen Comet Assays wurden mit den Fraktionen durchgeführt (vgl. 3.1.4.2). Die von den Fraktionen #1 und #2 ausgelösten DNA-Schädigungen waren nach 90 min Reparaturzeit nicht mehr detektierbar. Die DNA-Schädigungen der 1-stündigen Behandlung mit Fraktion #3 hingegen konnten auch nach 120 min noch erfasst werden. Die Lymphozyten, die mit der Fraktion #3 behandelt wurden, waren nicht in der Lage, eine vollständige Reparatur der DNA-Strangbrüche innerhalb des beobachteten Zeitraums vorzunehmen. Dieses Ergebnis deutet wiederum darauf hin, dass sich die bioaktiven Substanzen vorrangig in Fraktion #3 befinden.

Damit konnte nicht nur in einem Indikatorrest für Gentoxizität, dem Comet Assay, sondern auch in einem Chromosomenmutationstest, dem Mikrokerntest, der sichere Anhaltspunkt gewonnen werden, dass Fraktion #3 die gentoxisch wirksamsten Komponenten bzw. Kombination von Einzelsubstanzen enthält. Die Fraktion wurde daraufhin nochmals einer chemischen Analyse unterzogen (vgl. 3.1.1.3). Dabei konnten trotz hochauflösender GC/MS Technik keine weiteren Komponenten identifiziert werden. Die Analysen ergaben, dass die Konzentrationsverhältnisse der Komponenten im Gemisch denen in der Vergangenheit erfassten entsprach, aber die Einzelkonzentrationen der Stoffe um ca. 2/3 zurückgegangen waren. Dies lässt sich mit der extrem hohen Flüchtigkeit der Stoffe und der langen Lagerzeit erklären.

Die verfügbaren Einzelkomponenten (Trichlortriazin, Hexachlorbenzol, Hexachlorbutadien, Hexachlorcyclopentadien, Pentachlorpyridin, Pentachlorbenzol und Octachlorcyclopenten) der Fraktion #3 wurden mit Hilfe des Comet Assays und des Mikrokerntests in humanen Lymphozyten charakterisiert (vgl. 3.1.1.4 und 3.1.3.3). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass alle Verbindungen in der getesteten Konzentration (entspricht dem Gehalt von 0,16 mg/ml der Fraktion #3) signifikant erhöhte Raten an DNA-Strangbrüchen auslösten und Chromosomenaberrationen im Vergleich zur Negativkontrolle induzierten. Angaben zur Mutagenität bzw. Gentoxizität liegen nur zu Trichlortriazin, Hexachlorbenzol, Hexachlorbutadien und Hexachlorcyclopentadien vor (Canonero *et al.*, 1997; EPA/OTS, 1997; Schrenk and Dekant, 1989; Wyszynska *et al.*, 1994), während keine Daten zur Mutagenität bzw. Gentoxizität für Pentachlorpyridin verfügbar sind. In der Literatur wird dokumentiert, dass die

Substanz Pentachlorbenzol teratogen wirkt (Khera and Villeneuve, 1975). Für Octachlorcyclopenten wurden bis jetzt nur Literaturdaten zur akuten Toxizität veröffentlicht (EPA/OTS, 1977).

Die Substanz Trichlortriazin wird zur kovalenten DNA-Bindung an Glassbeads, zur Herstellung von DNA-Antikörpern (Steinberg *et al.*, 2004) und durch die Fähigkeit, Bakterienenzyme zu immobilisieren, auch zur Sterilisation genutzt (De Cordt *et al.*, 1994). Der starke Atemreizer wirkt laut Literatur nicht gentoxisch und wird auch in der MAK-Liste nicht geführt (DFG, 2003; Rydzynski and Jedrychowski, 1994; Wyszynska *et al.*, 1994). Das widerspricht den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten: Bei der Erfassung von Chromosomenaberrationen wurden im Mikrokerntest signifikant erhöhte Werte beobachtet, die Substanz löste auch DNA-Strangbrüche aus und wirkte somit auf beiden Ebenen gentoxisch.

Für Hexachlorbenzol stehen widersprüchliche Literaturdaten zur Verfügung: Während in Kurzzeittests keine Gentoxizität nachgewiesen wurde (Gorski *et al.*, 1986), stuft die DFG Hexachlorbenzol als kanzerogen nach der Stufe 4 ein, d.h. ein kanzerogenes Potential besteht, aber weitere Untersuchungen sind erforderlich. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Angaben von Canonero und Mitarbeitern und da Silva Augusto und Mitarbeitern überein, die ein leichtes gentoxisches Potential im Mikrokerntest nachweisen konnten bzw. bei Untersuchungen an Chemiarbeitern mit Kontakt zu Hexachlorbenzol signifikant höhere Mikrokernraten als in der Kontrollgruppe registrierten (Canonero *et al.*, 1997; da Silva Augusto *et al.*, 1997). Auch Charlier *et al.*, 2004 schloss in seinen Analysen das Risiko zwischen Hexachlorbenzol-Exposition und Brustkrebsentwicklung nicht ganz aus.

Zu Hexachlorcyclopentadien gibt es Hinweise aus älteren Literaturdaten dafür, dass es nicht mutagen wirkt (Greim *et al.*, 1977; NTP, 1994), allerdings liegen keine Daten zur Gentoxizität in Kurzzeittests vor. Mehrere Autoren und Studien beschrieb diesen Stoff als extrem toxisch bei Inhalation, das Targetorgan ist die Lunge (EPA, 1990; Lawrence and Dorough, 1982; Rand *et al.*, 1982). In der MAK-Liste 2003 wird der Stoff mit der Gefahr zur Hautresorption geführt, aber besitzt keinen MAK-Wert (DFG, 2003). Einer Studie der EPA zufolge wurde bei der Behandlung von Ratten eine signifikante Erhöhung von Aborten beobachtet (EPA/OTS, 1978). Die hier vorgelegten Ergebnisse sprechen zum ersten Mal für ein gentoxisches Potential des Stoffes in Kurzzeittests und an humanen Zellen. Durch den Einsatz des extrametabolisierenden S9-Mix konnte eine Metabolisierung des Stoffes beobachtet werden, die signifikant höhere DNA-Schädigungen in Form von Strangbrüchen zur Folge hatte.

Die gentoxische Wirkung von Hexachlorbutadien wurde in verschiedenen Testsystemen nachgewiesen (German, 1988; Reichert *et al.*, 1984; Schrenk and Dekant, 1989). In der MAK-Liste wird auf die Gefahr der Hautresorption hingewiesen und der Stoff als kanzerogen nach 3B

eingestuft, d.h. *in vitro* Daten liegen vor, es sind aber noch weitere Studien zur Gentoxizität erforderlich. Unsere Ergebnisse zur Substanz Hexachlorbutadien korrelieren mit den Literaturdaten.

Für Pentachlorpyridin konnte nach Behandlung von Humanlymphozyten im Comet Assay und im Mikrokerntest eine signifikant erhöhte DNA-Schädigung erfasst werden. Die Auslösung von DNA-Strangbrüchen wurde durch eine Metabolisierung mit S9-Mix signifikant verstärkt. Der Stoff ist nicht in der MAK-Liste verzeichnet.

Die vorliegenden Ergebnisse, die über Octachlorcyclopenten erfasst wurden, zeigen eine deutliche gentoxische Wirkung dieser Substanz in der getesteten Konzentration. Die Zellen wurden mit einer ca. 100.000-fach verdünnten Konzentration im Vergleich zum LD₅₀-Wert behandelt. Die verfügbaren Literaturdaten sind 25 Jahre alt, es gibt keine neueren Daten (DeLeon *et al.*, 1980; EPA/OTS, 1977). Der Stoff ist nicht in der MAK-Liste verzeichnet.

Für die Einzelkomponente Pentachlorbenzol liegen einige Literaturdaten zum kanzerogenen und teratogenen Potential vor (Gustafson *et al.*, 2000; Khera and Villeneuve, 1975). Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnisse zur Induktion von DNA-Strangbrüchen und Chromosomenaberrationen würden auch die in der Literatur angegebenen Effekte erklären. Pompa *et al.*, 1994 stellte in seinen Untersuchungen fest, dass Lindan (γ -Hexachlorcyclohexan; Insektizid und Holschutzmittel) und sein Metabolit Pentachlorbenzol sowohl plazenta- als auch milchgängig sind. Ein Gefährdungspotential durch den Stoff kann also nicht ausgeschlossen werden. In der MAK-Liste 2003 ist der Stoff nicht aufgeführt.

Die hier vorgelegten Ergebnisse konnten weiterhin zeigen, dass Hexachlorbutadien und Octachlorcyclopenten ebenso wie Pentachlorbenzol im Vergleich zu den übrigen Substanzen in beiden Tests an humanen Lymphozyten die stärksten DNA-Schädigungen auslösen.

Durch die Präparation von 2-Komponenten-Modellgemischen aus den verfügbaren Einzelkomponenten war es möglich, Kombinationswirkungen zu erfassen (vgl. 3.1.1.5). Durch die Ergebnisse aus der Testung der Modellgemische zum DNA-Strangbruchinduzierenden Potential der Modellgemische konnte gezeigt werden, dass alle in dieser Konzentration getesteten Modellgemische in humanen Lymphozyten signifikant erhöhte Raten an DNA-Schäden auslösten. Dabei kann darauf verwiesen werden, dass die meisten getesteten Kombinationen deutlich geringere gentoxische Wirkungen auslösten als die Einzelstoffe. So konnte nur für ein Gemisch, Trichlortriazin und Pentachlorpyridin, eine synergistische Wirkung bei der Induktion von DNA-Strangbrüchen beobachtet werden und auch nur in Abwesenheit von S9-Mix. Alle anderen getesteten Modellgemische +/- S9-Mix wirkten antagonistisch.

Bei dem Modellgemisch aus Pentachlorpyridin und Hexachlorcyclopentadien konnten die Ergebnisse der Voruntersuchungen zur indirekten Gentoxizität bestätigt werden. Nach Zugabe

des externen Metabolisierungssystems wurden signifikant höhere DNA-Schädigungen registriert. Bei einigen Modellgemischen waren aber auch Entgiftungsreaktionen nach Zugabe des S9-Mix zu beobachten. So konnten für die Modellgemische aus Hexachlorbutadien und Hexachlorcyclopentadien, Pentachlorpyridin und Hexachlorbenzol, und Trichlortriazin im Gemisch mit Hexachlorbenzol bzw. Pentachlorbenzol signifikant weniger Schäden nach Zugabe des S9-Mix erfasst werden als ohne Zugabe. Auch im Vergleich dieser Ergebnisse mit den beobachteten Effekten bei den Einzelsubstanzen kann die Vermutung bestätigt werden, dass es im komplexen Gemisch sehr wohl zu einer Metabolisierung bestimmter Substanzen kommt, diese aber aufgrund der Komplexität des Gemisches nicht erfasst werden. Die fehlenden Metabolisierungseffekte im gesamten komplexen Stoffgemisch bzw. in den Fraktionen könnten aber auch auf der Sättigung der Enzymsysteme aufgrund der Komplexität des Gemisches beruhen, d.h. die Inhaltsstoffe haben auch ohne Zusatz von S9-Mix durch ihre verschiedenen Wirkweisen die maximale Aktivierung des Cytochrom P450-Systems ausgelöst (Raucy, 1995; White, 2002). Erst nach Erniedrigung der Komplexität, d.h. bei der Testung von Einzel- bzw. 2-Komponentensystemen ließen sich Metabolisierungseffekte erfassen.

Durch die analytische Überprüfung der 2-Komponenten-Modellgemische konnte gezeigt werden, dass die gemessenen Konzentrationen der hergestellten Modellgemische mit den Zielkonzentrationen im Wesentlichen übereinstimmten (vgl. 3.1.1.6). Die aufgetretenen Abweichungen sind durch das verwendete leichtflüchtige Lösungsmittel DCM und die damit verbundenen Auftragsfehler erklärbar. Eine Optimierung der gemessenen Zusammensetzung der Modellgemische und der Zielkonzentrationen hätte durch die vorherige analytische Überprüfung der Modellgemische erreicht werden können, was aber durch den zeitlichen Ablauf der gentoxischen Testung nicht möglich war.

Zusammenfassend ergibt die Testung der Modellgemische, dass Gemische, die die Komponenten Octachlorcyclopenten, Pentachlorpyridin und/oder Trichlortriazin enthalten, häufiger DNA-Strangbrüche auslösen als Gemische, die andere Komponenten enthalten. Das kann als Hinweis auf deren Zuordnung zu den toxikologischen Leitsubstanzen des Gemisches gesehen werden.

Endgültige Aussagen zur Identifizierung der toxikologischen Leitsubstanz bedürfen aber noch weiterer Tests, da die Palette der bisher verfügbaren Einzelsubstanzen nicht umfassend genug ist.

4.3 Serumfreie Kryokonservierung von primären Schweinehepatozyten

In der Vergangenheit erfolgten *in vitro* gentoxikologische Untersuchungen nur an primären nicht-kryokonservierten Hepatozyten oder HepG2-Zellen (Lazarova and Slamenova, 2004; Martelli *et al.*, 2000; Sina *et al.*, 1983; Uhl *et al.*, 2000; Williams and Numoto, 1984; Yusuf *et al.*, 2000). Da Hepatozyten über die größte Bandbreite an Metabolisierungsenzymen der Zellen im Organismus verfügen, stellen sie das ideale System zur Untersuchung von toxikologisch relevanten Metabolisierungsvorgängen dar (Muller-Tegethoff *et al.*, 1995; Valentin-Severin *et al.*, 2003). Deshalb wäre es von Vorteil, die Bevorratung durch Kryokonservierung von Hepatozyten für den Einsatz in gentoxikologischen Untersuchungen zu verbessern. Diese Zellen würden in qualitätskontrollierten Prozessen hergestellt und eine konstante und schnelle Verfügbarkeit absichern. Zum jetzigen Stand der Wissenschaften ist die Kryokonservierung von Hepatozyten noch vom Verlust der Vitalität und der leberspezifischen Funktionen während des Einfrier- und Auftauvorgangs begleitet (Sauer *et al.*, 2003; Sheil, 2002; Watanabe *et al.*, 1999). Für den Einsatz der Hepatozyten in experimentellen Anwendungen kann der Verlust der Funktion durch den Zusatz von Serum zum Auftau- und Einfriermedium partiell verhindert werden. Folglich wurde in den meisten verfügbaren Studien zur Kryokonservierung von Hepatozyten in der Grundlagenforschung Serum eingesetzt, um die Funktionalität besser aufrecht erhalten zu können (Alexandre *et al.*, 2002; Arikura *et al.*, 2002; Chesne *et al.*, 1993; Dandri *et al.*, 2001; Houle *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2002; Jamal *et al.*, 2000; Swales *et al.*, 1996; Vian *et al.*, 2002). Im Hinblick jedoch auf eine korrekte chemische Definition während toxikologischer Untersuchungen, besonders von chemisch komplex zusammengesetzten Gemischen, ist es erforderlich, die Zellen unter serum-freien Bedingungen zu halten. Die hier vorgelegten Ergebnisse demonstrieren, dass bei der serum-freien Kryokonservierung von primären Schweinehepatozyten nach dem Auftauen ca. 60% scheinbar vitale Zellen zurückgewonnen wurden, davon aber nach der Aufreinigung durch eine Gradientenzentrifugation nur ein geringfügiger Teil der Zellen wiedergefunden wurden. Das weist darauf hin, dass ein Großteil der Hepatozyten nach dem Auftauen nur eine eingeschränkte Vitalität besitzt, auch wenn die Zellen Trypanblau ausschließen. Die Ausbeute konnte erheblich durch den Einsatz von Glyzin als Kryoprotektiv verbessert werden (Tab. 12 und Abb. 32). Dies bestätigt frühere Befunde mit kryokonservierten Hepatozyten verschiedener Spezies bei Verwendung von Einfrier- und Auftaumedien, denen Glyzin als Kryoprotektiv zugesetzt wurde (Southard, 2002; Vreugdenhil *et al.*, 1996). Als ein Hauptgrund für die geringe Ausbeute an Hepatozyten nach der serum-freien Kryokonservierung kann anscheinend die Schädigung der DNA angesehen werden, die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Comet Assays erfasst werden konnte (Abb. 30). Wie schon unter Kapitel 4.1 diskutiert, haben

Choucroun und Mitarbeiter in Jurkat-Zellen nachgewiesen, dass die Apoptoserate positiv mit der Kometenschweiflänge korrelierte (Choucroun *et al.*, 2001). Einige Autoren zeigten, dass die Kryokonservierung zu einem Anstieg der Apoptose und Nekrose in primären Maushepatozyten im Vergleich zu nicht-kryokonservierten Zellen führte (Fu *et al.*, 2001; Yagi *et al.*, 2001). Das könnte implizieren, dass Apoptose der Hauptgrund der DNA-Schädigung nach der Kryokonservierung ist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Comet Assay jedoch nach der Percollaufreinigung der kryokonservierten Hepatozyten durchgeführt und somit apoptotische Zellen abgetrennt wurden. Daher müssen andere Mechanismen neben der Apoptose für den extensiven DNA-Schaden verantwortlich sein. Bis jetzt sind noch keine Daten verfügbar, die eine eindeutige Korrelation zwischen der DNA-Schädigung der Hepatozyten und dem Zelltod nach der Kryokonservierung zeigen.

Der Erhalt der Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten nach der Kryokonservierung ist zum einen für entsprechende Anwendungen erforderlich, z.B. Bioassays oder für den Unscheduled-DNA-Synthesis-Test (UDS-Test). Aus diesem Grund muss zwischen der Vitalität, die mit der Trypanblaufärbung gemessen wurde, und dem Potential der Zellen auf der Kulturunterlage zu adhären, unterschieden werden. Die präsentierten Daten zeigen, dass serumfrei kryokonservierte Ratten- und Schweinehepatozyten sich nur schlecht an die Plastikunterlage der Kulturschale anhefteten. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass Kokulturen von nicht-kryokonservierten Hepatozyten und Nichtparenchymzellen der Leber den Funktionserhalt der Hepatozyten in Kultur begünstigten (Berthou *et al.*, 1998; Guguen-Guillouzo *et al.*, 1983; Kuri-Harcuch and Mendoza-Figueroa, 1989; Utesch and Oesch, 1992; Yagi *et al.*, 1995). Es wurde vermutet, dass der Zusatz von konditioniertem Medium, gewonnen von Nichtparenchymzellen der Leber, zu einer Verbesserung der Anheftung von Schweinehepatozyten führt (Tab. 12) und die Proliferation anregt (Abb. 35). Dies wurde bestätigt, wodurch erstmalig gezeigt wurde, dass der funktionelle Erhalt von Leberzellen nach der Kryokonservierung ohne Serum allein durch Zusatz von konditioniertem Medium gefördert werden konnte. Dies wird auch durch Daten gestützt, die in einem umfassenden Review zum Vergleich biochemischer Funktionen von kryokonservierten und nicht-kryokonservierten Hepatozyten verschiedener Tierspezies und des Menschen, zusammengefasst wurden. Im Allgemeinen bleiben Hepatozyten in Suspension oder bei unterschiedlichen Kulturbedingungen nur für wenige Stunden funktionell. Demnach sind Prognosen zu Langzeitereignissen, wie Zytotoxizität infolge der Akkumulation von Fremdstoffen oder die Aufrechterhaltung von hepatozellulären Funktionen als Antwort auf physiologische Reize eingeschränkt. Wenn die Kulturbedingungen so gewählt werden, dass sie dem physiologischen Umfeld am ehesten entsprechen, wie in Perfusionssystemen, Kokulturmodellen oder die Kultur auf einer speziell beschichteten Matrix erfolgt, eine adäquate

Nährstoffversorgung garantiert wird sowie die Zell-Zell und Zell-Matrix Kommunikation gewährleistet sind, können die hepatozellulären Funktionen signifikant verbessert und bis zu einigen Wochen erhalten werden (Gebhardt *et al.*, 2003).

Laut unserem Wissensstand sind bis jetzt nur zwei Studien verfügbar, die Protokolle zur serumfreien Kryokonservierung von Hepatozyten einsetzen. Zum einen für Maushepatozyten von Canaple *et al.*, 2001 und zum anderen für Schweinehepatozyten von Kunieda *et al.*, 2003. Die Arbeit von Canaple und Mitarbeitern beschreibt den Funktionserhalt von in Alginat verkapselten kryokonservierten Hepatozyten bis zum vierten Kulturtag. Kunieda und Mitarbeiter beobachteten unter Verwendung von UW-Solution (spezielles Medium u.a. zum Transport von Organen) Zellausbeuten an Schweinehepatozyten von ca. 50%. Jedoch FKS im Auftauprozess benutzt.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich nicht direkt auf die Situation humaner Hepatozyten übertragen. Dennoch leisten sie nicht nur einen Beitrag für verbesserte toxikologische Untersuchungen von Vielstoffgemischen, sie geben auch einen neuen Ansatz zur Entwicklung von Protokollen zur Kryokonservierung von humanen Hepatozyten unter Verwendung von konditioniertem Medium von humanen Nichtparenchymzellen der Leber, an Stelle von Serum. Die vorliegenden Ergebnisse liefern auch wichtige Grundlagen für die Etablierung von menschlichen Leberzellbanken, um hohe Qualitätsanforderungen an die Zellen für klinische und experimentelle Anwendungen zu gewährleisten.

Im Weiteren sollten Untersuchungen zur Verbesserung des Funktionserhaltes von kryokonservierten Schweinehepatozyten in Kultur erfolgen. Im Hinblick auf die Anwendung für klinische Applikationen sollte das Protokoll der Kryokonservierung auf humane Hepatozyten übertragen und Zelltransplantationen von kryokonservierten Hepatozyten im Tiermodell erwogen werden.

5 Zusammenfassung

Menschen sind in ihrer gesamten Umgebung vielfältigen, häufig auch gesundheitsschädlichen und toxischen Expositionen, meist gegenüber chemisch komplex zusammengesetzten Stoffgemischen, ausgesetzt. In der Toxikologie rücken zunehmend Untersuchungen zu Kombinationswirkung und toxikologischen Leitsubstanzen von Stoffgemischen in das Blickfeld des Interesses. Es die Aufgabe, am Beispiel eines komplexen Stoffgemisches aus ca. 80 halogenierten Kohlenwasserstoffen, welches als Abprodukt in der Halbleiterindustrie entsteht, die toxikologischen Leitsubstanzen zu ermitteln und alle in der Arbeit eingesetzten Testsysteme zur Erfassung gentoxischer Wirkungen bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf komplex zusammengesetzte chemische Gemische zu validieren.

Ausgehend von Arbeiten des Forschungsverbundprojektes „Gesundheitliche Risiken durch Plasmaätzprozesse in der Halbleiterindustrie“ zur Toxizität und Gentoxizität am Versuchstier, und meiner Diplomarbeit "Charakterisierung gentoxischer Wirkungen von komplexen Abproduktgemischen aus Plasmaätzprozessen in unterschiedlichen Säugerzellsystemen" konnten während der *in vitro*-Charakterisierung durch Gentoxizitätstestung (Alkalische sowie neutrale Einzelzell-Gelelektrophorese, DNA-Reparaturstudien, Mikrokerntest, Test zur Koloniebildungsfähig und Genmutationstests) wichtige Informationen zur DNA-Schädigung und dem mutagenen Potential des komplexen Stoffgemisches in primären Rattenhepatozyten, humanen Lymphozyten, humanen Bronchialepithelzellen und in Tumorzelllinien gewonnen werden. Die Untersuchungen zur Identifikation der toxikologischen Leitsubstanzen, ausgehend vom Gesamtgemisch, über die durch Gaschromatographie hergestellten Fraktionen zu den verfügbaren Einzelsubstanzen und hergestellten 2-Komponenten-Modellgemischen erbrachten wichtige Hinweise auf die toxikologischen Leitsubstanzen selbst. Zum ersten Mal wird ein Verfahren mit Modellcharakter bei der Vorgehensweise zur Identifikation einer toxikologischen Leitsubstanz in einem unbekanntem Gemisch gezeigt.

Es ist im Verlauf der Gentoxizitätstestung mit Hilfe des alkalischen und neutralen Comet Assays an tierischen und vor allem an humanen Primärzellkulturen gelungen, den Nachweis der konzentrationsabhängigen Auslösung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen und AP-Stellen zu erbringen und damit einen wichtigen Hinweis auf die molekularen Ursachen für die tierexperimentell erhobenen Befunde zur Gentoxizität des Stoffgemisches zu erhalten. Durch den Zusatz des extrametabolisierenden Systems S9-Mix bestätigte sich die direkte gentoxische Wirkung des komplexen Gemisches. Die konzentrationsabhängige Induktion von Chromosomenaberrationen in humanen Lymphozyten konnte durch signifikant erhöhte Mikrokernraten belegt werden. Es zeigte sich, dass die Ergebnisse des HPRT-Tests zur

Erfassung von ausgelösten Mutationsereignissen in der DNA nicht reproduzierbar waren. Dieser Test an primären humanen Lymphozyten und TK6-Zellen eignete sich nicht für die Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung des mutagenen Potentials des komplexen Stoffgemisches. Erst durch den Maus-Lymphoma-TK^{+/-}-Assay (MLA) bestätigte sich die Annahme, dass das komplexe Stoffgemisch ein erhebliches mutagenes Potential aufwies. Es konnte gezeigt werden, dass das komplexe Stoffgemisch mit ansteigenden Konzentrationen signifikant höhere Mutantenfrequenzen (Gen- und Chromosomenmutationen) im Vergleich zu den Kontrollen auslöste. Weitere molekulargenetische Analysen gaben Aufschluss über die Mutationsmechanismen. Es wurde ein leichter Anstieg an Genmutationen in mit komplexem Stoffgemisch induzierten Mutanten im Vergleich zu spontan entstandenen Mutanten registriert. Etwa die Hälfte der Mutationen ist durch größere Deletionen oder Rekombinationen oder sogar Totalverlust des Chromosoms 11 entstanden.

Somit ergaben die Untersuchungen, dass die hier verwendeten Testsysteme (neutraler und alkalischer Comet Assay, *in vitro*-Mikrokerntest und der Maus-Lymphoma-Assay) äußerst empfindliche Methoden zum Nachweis von DNA-Schäden sind und in Kombination Aussagen zum genotoxischen Gefährdungspotential komplexer Stoffgemische ermöglichen.

Die Analysen zur Identifikation der toxikologischen Leitsubstanz wurden mit begleitender chemischer Analyse fortgesetzt. Die Substanzen Hexachlorbutadien, Octachlorcyclopenten und Pentachlorbenzol bewirken die höchsten DNA-Schädigungen in primären humanen Lymphozyten sowohl im alkalischen Comet Assay als auch im *in vitro*-Mikrokerntest. Somit können der alkalische Comet Assay und der *in vitro*-Mikrokerntest zur Identifikation der toxikologischen Leitsubstanz eines chemisch komplex zusammengesetzten Gemisches beitragen.

In den Untersuchungen zur Reparatur von DNA wurde beobachtet, dass auch nach einer bestimmten Reparaturzeit massive Schädigungen durch komplexes Stoffgemisch an der DNA verbleiben können. Diese unreparierten DNA-Schädigungen können zur Manifestation von Mutationen führen, was im MLA bestätigt werden konnte.

Der Zusatz von Glyzin zum Einfrier- und Auftaumedium verhinderte die durch die Kryokonservierung auftretende DNA-Schädigung in Schweinehepatozyten und resultierte in einer höheren Zellausbeute an Schweinehepatozyten. Durch den Einsatz von durch Nichtparenchymzellen der Leber konditioniertem Medium konnten leberspezifische Eigenschaften (Poliferationsfähigkeit, Cytochrom P450-Aktivitäten und Harnstoffsynthese) und die Expression leberspezifischer Gene (Albumin, Transferrin, CYP1A1, Carbamoylphosphat-Synthetase und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) in der Kultur kryokonservierter Hepatozyten weitgehend erhalten. Der Nachweis der konzentrationsabhängigen Induktion von DNA-Strangbrüchen bestätigte, dass primäre Schweinehepatozyten in genotoxikologischen

Analysen komplexen Stoffgemischen eingesetzt werden können. Somit stellen kryokonservierte Schweinehepatozyten ein ideales Testsystem zur Untersuchung toxikologischer Eigenschaften neuer oder unbekannter Substanzen dar.

6 Literaturverzeichnis

Albertini RJ, Castle KL and Borchering WR. 1982. T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine-resistant lymphocytes present in human peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (21): 6617-21

Alexandre E, Viollon-Abadie C, David P, Gandillet A, Coassolo P, Heyd B, Manton G, Wolf P, Bachellier P, Jaeck D and Richert L. 2002. Cryopreservation of adult human hepatocytes obtained from resected liver biopsies. *Cryobiology* 44 (2): 103-13

Ames BN, McCann J and Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31 (6): 347-64

Arikura J, Kobayashi N, Okitsu T, Noguchi H, Totsugawa T, Watanabe T, Matsumura T, Maruyama M, Kosaka Y, Tanaka N, Onodera K and Kasai S. 2002. UW solution: a promising tool for cryopreservation of primarily isolated rat hepatocytes. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9 (6): 742-9

Baisch H, Bollmann H and Bornkessel S. 1999. Degradation of apoptotic cells and fragments in HL-60 suspension cultures after induction of apoptosis by camptothecin and ethanol. *Cell Prolif* 32 (5): 303-19

Bauer S. 1997. Umwelttoxikologische Gefährdungsabschätzung für komplexe Abprodukte aus Hochtechnologie Plasmaanlagen: Chemisch-analytische Pilotphase, Abschlussbericht zum BMBF-Projekt FKZ 07GTK01.

Bauer S, Werner N, Wolff I, Damme B, Oemus K and Hoffmann P. 1992a. Toxicological investigations in the semiconductor industry: II. Studies on the subacute inhalation toxicity and genotoxicity of gaseous waste products from the aluminum plasma etching process. *Toxicol Ind Health* 8 (6): 431-44

Bauer S and Wolff I. 1997. Perhalogenated organic by-products from plasma etching processes and their effects on human health and environmental impact in environment, safety, and health issues in IC production. in: *Symposium Proceedings* Ed.: Reif R, Heyns M, Bowling A and Tonti A. Materials Research Society. Pittsburgh. 447: 35-41

Bauer S, Wolff I, Schmidt R and Pelzing M. 1996. Toxicological hazards of plasma etching waste products. *Solid State Technology* July: 97-110

Bauer S, Wolff I, Schmidt R, Pelzing M, Pietzsch K and Weinert D. 1995. Gesundheitliche Risiken durch Plasmaätzprozesse in der Halbleiterindustrie.

Bauer S, Wolff I, Werner N, Hoffmann P, Herzsuh R, Oemus K, Rath FW and Voigt R. 1992b. Toxicological investigations in the semiconductor industry: I. Studies on the acute oral toxicity of a complex mixture of waste products from the aluminium plasma etching process. *Toxicol Ind Health* 8 (3): 141-56

Berry MN and Friend DS. 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43 (3): 506-20

- Berthou L, Langouet S, Grude P, Deneffe P, Branellec D and Guillouzo A. 1998. Negative regulation of Apo A-I gene expression by retinoic acid in rat hepatocytes maintained in a coculture system. *Biochim Biophys Acta* 1391 (3): 329-36
- Blazak WF, Stewart BE, Galperin I, Allen KL, Rudd CJ, Mitchell AD and Caspary WJ. 1986. Chromosome analysis of trifluorothymidine-resistant L5178Y mouse lymphoma cell colonies. *Environ Mutagen* 8 (2): 229-40
- Bolt HM, Westphal G and Riemer F. 1993. Studie "Kombinationswirkungen" für die Enquête-Kommission des Deutschen Bundestages. http://www.toxkom.uni-oldenburg.de/dateien/boldt_et_al_1993.pdf
- Branda RF and Albertini RJ. 1995. Effect of dietary components on hprt mutant frequencies in human T-lymphocytes. *Mutat Res* 346 (3): 121-7
- Branda RF, O'Neill JP, Jacobson-Kram D and Albertini RJ. 1992. Factors influencing mutation at the hprt locus in T-lymphocytes: studies in normal women and women with benign and malignant breast masses. *Environ Mol Mutagen* 19 (4): 274-81
- Burkhart-Schultz KJ and Jones IM. 1997. Deletion and insertion in vivo somatic mutations in the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt) gene of human T-lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 30 (4): 371-84
- Canaple L, Nurdin N, Angelova N, Hunkeler D and Desvergne B. 2001. Development of a coculture model of encapsulated cells. *Ann N Y Acad Sci* 944 350-61
- Canonero R, Campart GB, Mattioli F, Robbiano L and Martelli A. 1997. Testing of p-dichlorobenzene and hexachlorobenzene for their ability to induce DNA damage and micronucleus formation in primary cultures of rat and human hepatocytes. *Mutagenesis* 12 (1): 35-9
- Cassee FR, Groten JP, van Bladeren PJ and Feron VJ. 1998. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit Rev Toxicol* 28 (1): 73-101
- Charlier C, Foidart JM, Pitance F, Herman P, Gaspard U, Meurisse M and Plomteux G. 2004. Environmental dichlorodiphenyltrichlorethane or hexachlorobenzene exposure and breast cancer: is there a risk? *Clin Chem Lab Med* 42 (2): 222-7
- Chesne C and Guillouzo A. 1988. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: a critical evaluation of freezing and thawing conditions. *Cryobiology* 25 (4): 323-30
- Chesne C, Guyomard C, Fautrel A, Poullain MG, Fremond B, De Jong H and Guillouzo A. 1993. Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology* 18 (2): 406-14
- Choucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B and Dewitte JD. 2001. Comet assay and early apoptosis. *Mutat Res* 478 (1-2): 89-96
- Clements J. 2000. The mouse lymphoma assay. *Mutat Res* 455 (1-2): 97-110

Clive D, Caspary W, Kirby PE, Krehl R, Moore M, Mayo J and Oberly TJ. 1987. Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity. *Mutat Res* 189 (2): 143-56

Clive D, McCuen R, Spector JF, Piper C and Mavournin KH. 1983. Specific gene mutations in L5178Y cells in culture. *Mutat Res* 115 (2): 225-51

Cochrane JE and Skopek TR. 1994. Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: I. Mutagenic potential of 1,2-epoxybutene, 1,2,3,4-diepoxybutane and 3,4-epoxy-1,2-butanediol in cultured human lymphoblasts. *Carcinogenesis* 15 (4): 713-7

Cole J, Harrington-Brock K and Moore MM. 1999. The mouse lymphoma assay in the wake of ICH4--where are we now? *Mutagenesis* 14 (3): 265-70

Crocker CL. 1967. Rapid determination of urea nitrogen in serum or plasma without deproteinization. *Am J Med Technol* 33 (5): 361-5

Cullen MR, Checkoway H, Eisen EA, Kelsey K, Rice C, Wegman DH and Whitehead L. 2001. Cancer Risk among Wafer Fabrication Workers in the Semiconductor Industry Evaluation of Existing Data and Recommended Future Research http://www.sia-online.org/downloads/sac_summary.pdf

Czygan P, Greim H, Garro AJ, Hutterer F, Schaffner F, Popper H, Rosenthal O and Cooper DY. 1973. Microsomal metabolism of dimethylnitrosamine and the cytochrome P-450 dependency of its activation to a mutagen. *Cancer Res* 33 (11): 2983-6

da Silva Augusto LG, Lieber SR, Ruiz MA and de Souza CA. 1997. Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to organochlorides. *Environ Mol Mutagen* 29 (1): 46-52

Dandri M, Burda MR, Gocht A, Torok E, Pollok JM, Rogler CE, Will H and Petersen J. 2001. Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. *Hepatology* 34 (4 Pt 1): 824-33

De Cordt SF, Hendrickx ME, Maesmans GJ and Tobback PP. 1994. Convenience of immobilized *Bacillus licheniformis* alpha-amylase as time-temperature-integrator (TTI). *J Chem Technol Biotechnol* 59 (2): 193-9

De Meo M, Laget M, Castegnaro M and Dumenil G. 1991. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutat Res* 260 (3): 295-306

Degrassi F and Tanzarella C. 1988. Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutat Res* 203 (5): 339-45

Dekant W and Vamvakas S. 1994. *Toxikologie für Chemiker und Biologen* in: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford. 3-86025-218-6.

DeLeon IR, Brown NJ, Cocchiara JP, Miles SK, Laseter JL, Kremer EH, 3rd and Makk L. 1980. Determination of trace levels of hexachlorocyclopentadiene and octachlorocyclopentene in body fluids. *J Anal Toxicol* 4 (6): 314-7

DFG. 2003. List of MAK and BAT Values 2003 in: Report No. 39 Ed.:Area CftIoHHoCCitW. Deutsche Forschungsgemeinschaft. 3527275177.

Donnelly KC, Brown KW, Anderson CS, Barbee GC and Safe SH. 1990. Metabolism and bacterial mutagenicity of binary mixtures of benzo(a)pyrene and polychlorinated aromatic hydrocarbons. *Environ Mol Mutagen* 16 (4): 238-45

EPA. 1986. (Environmental Protection Agency), Guidelines for mutagenicity risk assessment. *Federal Register* 51 (185): 34006-34012, Citation 30411

EPA. 1989. United States Environmental Protection Agency, Risk Assessment Guidelines for Superfund. Human Health Evaluation Manual. Part A. US EPA, Office of Emergency and Remedial Response, Washington, DC, EPA/540/1-89/002.

EPA. 1990. Drinking Water Criteria Document for Hexachlorocyclopentadiene. *Govt Reports Announcements & Index* (18):

EPA/OTS. 1977. Acute Toxicity Studies in Rats and Rabbits with Octachlorocyclopentene. EPA/OTS Doc #88-7800062

EPA/OTS. 1978. Pilot Teratology Study in Rats. EPA/OTS Doc #88-7800208

EPA/OTS. 1997. Hepatocyte Primary Culture/ DNA Repair Assay on Compound Hexachlorocyclopentadiene using Rat Hepatocytes in Culture. EPA/OTS Doc #878212097

EWG. 1986. EWG-Directive, 79-831, Anlage V: Toxikologische Methoden für Anlage VIII in: Ed.:Gemeinschaften KdE. Luxemburg. pp: 104-107

Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455 (1-2): 81-95

Fenech M and Morley AA. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147 (1-2): 29-36

Fenech M and Morley AA. 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res* 161 (2): 193-8

Fenech M and Morley AA. 1989. Kinetochores detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis* 4 (2): 98-104

Feron VJ, Groten JP, Jonker D, Cassee FR and van Bladeren PJ. 1995. Toxicology of chemical mixtures: challenges for today and the future. *Toxicology* 105 (2-3): 415-27

Florent M, Godard T, Ballet JJ, Gauduchon P and Sola B. 1999. Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation. *Cell Biol Toxicol* 15 (3): 185-92

Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K and Förstermann. 2001. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie in: Ed.:Forth W, Henschler D, Rummel W and Starke K. Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG. 3-437-42520-X.

Furth EE, Thilly WG, Penman BW, Liber HL and Rand WM. 1981. Quantitative assay for mutation in diploid human lymphoblasts using microtiter plates. *Anal Biochem* 110 (1): 1-8

Gatehouse DG, Wilcox P, Forster R, Rowland IR and Callander RD. 1990. Bacterial mutation assays in Basic Mutagenicity Tests in: Ed.:Kirkland DJ. Cambridge University Press. 0-521-39347-7. pg: 13-63

Gebhardt R, Hengstler JG, Muller D, Glockner R, Buenning P, Laube B, Schmelzer E, Ullrich M, Utesch D, Hewitt N, Ringel M, Hilz BR, Bader A, Langsch A, Koose T, Burger HJ, Maas J and Oesch F. 2003. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev* 35 (2-3): 145-213

German IV. 1988. [Mutagenic activity of the pesticide hexachlorobutadiene]. *Tsitol Genet* 22 (4): 40-2

Glatt H. 1993. HPRT-Genmutationstest in V79-Zellen des Chinesischen Hamsters in: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie* Ed.:Fahrig R. Wissenschaftliche Buchgesellschaft. Darmstadt. pg: 243-262

Glatt H. 1994. Comparison of common gene mutation tests in mammalian cells in culture: a position paper of the GUM Commission for the Development of Guidelines for Genotoxicity Testing. *Mutat Res* 313 (1): 7-20

Godard T, Deslandes E, Lebailly P, Vigreux C, Sichel F, Poul JM and Gauduchon P. 1999. Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays. *Histochem Cell Biol* 112 (2): 155-61

Gorski T, Gorska E, Gorecka D and Sikora M. 1986. Hexachlorobenzene is non-genotoxic in short-term tests. *IARC Sci Publ* (77): 399-401

Greim H, Bimboes D, Egert G, Goggelmann W and Kramer M. 1977. Mutagenicity and chromosomal aberrations as an analytical tool for in vitro detection of mammalian enzyme-mediated formation of reactive metabolites. *Arch Toxicol* 39 (1-2): 159-69

Guguen-Guillouzo C, Clement B, Baffet G, Beaumont C, Morel-Chany E, Glaise D and Guillouzo A. 1983. Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res* 143 (1): 47-54

Gustafson DL, Long ME, Thomas RS, Benjamin SA and Yang RS. 2000. Comparative hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene, pentachlorobenzene, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene, and 1,4-dichlorobenzene: application of a medium-term liver focus bioassay and molecular and cellular indices. *Toxicol Sci* 53 (2): 245-52

Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A and Speit G. 1997. A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res* 390 (1-2): 179-88

Harreus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER and Kleinsasser NH. 2001. [DNA repair in mucous membrane cells and lymphocytes with the comet assay]. *Laryngorhinootologie* 80 (1): 23-6

Hayashi M, Sofuni T and Ishidate M, Jr. 1983. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res* 120 (4): 241-7

Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M, Swales N, Fischer T, Biefang K, Gerl M, Bottger T and Oesch F. 2000. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev* 32 (1): 81-118

Herb GK, Caffrey RE, Eckroth ET, Jarrett QT, Fraust CL and Fulton JA. 1983. Plasma processing: Some safety health and engineering considerations. *Solid State Technology* 26: 185-193

Hermann M. 1981. Synergistic effects of individual polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of their mixtures. *Mutat Res* 90 (4): 399-409

Honma M, Hayashi M, Shimada H, Tanaka N, Wakuri S, Awogi T, Yamamoto KI, Kodani N, Nishi Y, Nakadate M and Sofuni T. 1999. Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the in vitro chromosomal aberration test. *Mutagenesis* 14 (1): 5-22

Houle R, Raoul J, Levesque JF, Pang KS, Nicoll-Griffith DA and Silva JM. 2003. Retention of transporter activities in cryopreserved, isolated rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 31 (4): 447-51

Hozier J, Sawyer J, Clive D and Moore M. 1982. Cytogenetic distinction between the TK+ and TK- chromosomes in the L5178Y TK+/- 3.7.2C mouse-lymphoma cell line. *Mutat Res* 105 (6): 451-6

Huttner E and Holzapfel B. 1996. HPRT mutant frequencies and detection of large deletions by multiplex-PCR in human lymphocytes of vinyl chloride exposed and non-exposed populations. *Toxicol Lett* 88 (1-3): 175-83

Huttner E, Holzapfel B and Kropf S. 1995. Frequency of HPRT mutant lymphocytes in a human control population as determined by the T-cell cloning procedure. *Mutat Res* 348 (2): 83-91

Ikeda S, Mitaka T, Harada K, Sugimoto S, Hirata K and Mochizuki Y. 2002. Proliferation of rat small hepatocytes after long-term cryopreservation. *J Hepatol* 37 (1): 7-14

Jackson L. 1999. Mouse Genome Informatics Web Site <http://www.informatics.jax.org>

Jamal HZ, Weglarz TC and Sandgren EP. 2000. Cryopreserved mouse hepatocytes retain regenerative capacity in vivo. *Gastroenterology* 118 (2): 390-4

Johnson BL and DeRosa CT. 1995. Chemical mixtures released from hazardous waste sites: implications for health risk assessment. *Toxicology* 105 (2-3): 145-56

Khera KS and Villeneuve DC. 1975. Teratogenicity studies on halogenated benzenes (pentachloro-, pentachloronitro- and hexabromo-) in rats. *Toxicology* 5 (1): 117-22

Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M, Jr., Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surralles J, Vanhauwaert A and Wakata A. 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* 540 (2): 153-63

Kunieda T, Maruyama M, Okitsu T, Shibata N, Takesue M, Totsugawa T, Kosaka Y, Arata T, Kobayashi K, Ikeda H, Oshita M, Nakaji S, Ohmoto K, Yamamoto S, Kurabayashi Y, Kodama M, Tanaka N and Kobayashi N. 2003. Cryopreservation of primarily isolated porcine hepatocytes with UW solution. *Cell Transplant* 12 (6): 607-16

Kuri-Harcuch W and Mendoza-Figueroa T. 1989. Cultivation of adult rat hepatocytes on 3T3 cells: expression of various liver differentiated functions. *Differentiation* 41 (2): 148-57

Lachance B, Robidoux PY, Hawari J, Ampleman G, Thiboutot S and Sunahara GI. 1999. Cytotoxic and genotoxic effects of energetic compounds on bacterial and mammalian cells in vitro. *Mutat Res* 444 (1): 25-39

Lang R and Madle S. 1993. Allgemeine Strategie für Genotoxizitätsprüfungen in: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie* Ed.:Fahrig R. Wissenschaftliche Buchgesellschaft. Darmstadt. pg: 155-157

Lawrence LJ and Dorough HW. 1982. Fate of inhaled hexachlorocyclopentadiene in albino rats and comparison to the oral and IV routes of administration. *Fundam Appl Toxicol* 2 (5): 235-40

Lazarova M and Slamenova D. 2004. Genotoxic effects of a complex mixture adsorbed onto ambient air particles on human cells in vitro; the effects of Vitamins E and C. *Mutat Res* 557 (2): 167-75

Leong-Morgenthaler PM, Op Het Velt C, Jaccaud E and Turesky RJ. 1998. Mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in human lymphoblastoid cells. *Carcinogenesis* 19 (10): 1749-54

Lewis CFV. 1996. *Cytochrom P450* in: Taylor & Francis. London. 0-7484-0443-0.

Li AP, Aaron CS, Auletta AE, Dearfield KL, Riddle JC, Slesinski RS and Stankowski LF, Jr. 1991. An evaluation of the roles of mammalian cell mutation assays in the testing of chemical genotoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 14 (1): 24-40

Liechty MC, Scalzi JM, Sims KR, Crosby H, Jr., Spencer DL, Davis LM, Caspary WJ and Hozier JC. 1998. Analysis of large and small colony L5178Y tk^{-/-} mouse lymphoma mutants by loss of heterozygosity (LOH) and by whole chromosome 11 painting: detection of recombination. *Mutagenesis* 13 (5): 461-74

Lindl T and Bauer J. 1994. *Zell- und Gewebekultur* in: 3. Auflage Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-Jena-New York. 3-437-30736-3.

Lubet RA, Mayer RT, Cameron JW, Nims RW, Burke MD, Wolff T and Guengerich FP. 1985. Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch Biochem Biophys* 238 (1): 43-8

Madle S, Beek B and Nowak C. 1993. Zum Verständnis von Chromosomenmutationstests an Somazellen in: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie* Ed.:Fahrig R. Wissenschaftliche Buchgesellschaft. Darmstadt. pg: 224-242

Madle S and Obe G. 1980. Methods for analysis of the mutagenicity of indirect mutagens/carcinogens in eukaryotic cells. *Hum Genet* 56 (1): 7-20

- Malich G, Markovic B and Winder C. 1998. Human cell line toxicity of binary and ternary chemical mixtures in comparison to individual toxic effects of their components. *Arch Environ Contam Toxicol* 35 (3): 370-6
- Martelli A, Campart GB, Carrozzino R, Ghia M, Mattioli F, Mereto E, Orsi P and Puglia CP. 2000. Evaluation of flutamide genotoxicity in rats and in primary human hepatocytes. *Pharmacol Toxicol* 86 (3): 129-34
- McCarty LS and Mackay D. 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. *Environ Sci Technol* 27 1718-1728
- McGregor D. 1990. *In vitro* mammalian cell genotoxicity assay: their use and interpretation. in: *Mutation and Environment, Part B*: 159-169
- McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP and Collins A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* 288 (1): 47-63
- Miller B, Albertini S, Locher F, Thybaud V and Lorge E. 1997. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutat Res* 392 (1-2): 45-59, 187-208
- Miller BM and Adler ID. 1990. Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*. *Mutagenesis* 5 (4): 411-5
- Miltenburger HG. 1993. Die Durchführung von Gentoxizitätstests. Der Einfluss der Zytotoxizität auf das Testergebnis in: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie* Ed.:Fahrig R. Wissenschaftliche Buchgesellschaft. Darmstadt. pg: 162-168
- Mitchell AD, Auletta AE, Clive D, Kirby PE, Moore MM and Myhr BC. 1997. The L5178Y/tk+/- mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 394 (1-3): 177-303
- Moore MM and Doerr CL. 1990. Comparison of chromosome aberration frequency and small-colony TK- deficient mutant frequency in L5178Y/TK(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 5: 609-614
- Müller P. 2000. "Charakterisierung gentoxischer Wirkungen von komplexen Abproduktgemischen aus Plasmaätzprozessen in unterschiedlichen Säugerzellsystemen". unveröffentlichte Diplomarbeit Martin Luther Universität Halle-Wittenberg
- Muller P, Stock T, Bauer S and Wolff I. 2002. Genotoxicological characterisation of complex mixtures. Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. *Mutat Res* 515 (1-2): 99-109
- Müller P, Stock TW, Bauer S and Wolff I. 2001. The alkaline comet assay: a useful tool to investigate DNA damage caused by complex mixtures. *International Comet Assay Workshop*. Ulm

- Muller-Tegethoff K, Kasper P and Muller L. 1995. Evaluation studies on the in vitro rat hepatocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 335 (3): 293-307
- NRC. 1988. Complex Mixtures: Methods for In Vivo Toxicity Testing in: 0-309-03778-6.
- NTP. 1994. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Hexachloropentadiene in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). Govt Reports Announcements & Index (24):
- O'Brien KA, Gatehouse DG and Tiley M. 1990. Induction of mutations in TK6 human lymphoblastoid cells by ethyl methanesulphonate, benzo[a]pyrene and benzidine. *Mutagenesis* 5 Suppl 55-60
- OECD. 1983. OECD guidelines for testing of chemicals. Genetic Toxicology, Mikronucleus test Adopted May 26. (No. 474):
- Ogawa S, Hirayama T, Nohara M, Tokuda M, Hirai K and Fukui S. 1985. The effect of quercetin on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene and benzo[alpha]pyrene in *Salmonella typhimurium* strains. *Mutat Res* 142 (3): 103-7
- Ohlson J. 1986. Dry etch chemical safety. *Solid State Technology* 29: (69-73):
- Olive PL and Banath JP. 1993. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res* 294 (3): 275-83
- Olive PL, Banath JP and Durand RE. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 122 (1): 86-94
- Ostling O and Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123 (1): 291-8
- Pastides H, Calabrese EJ, Hosmer DW, Jr. and Harris DR, Jr. 1988. Spontaneous abortion and general illness symptoms among semiconductor manufacturers. *J Occup Med* 30 (7): 543-51
- Pelzing M. 1994. "Untersuchungen zur Analytik und Bildung von Chlororganika in der Halbleiterindustrie". unveröffentlichte Dissertation, Universität Leipzig, Fakultät für Chemie und Mineralogie, Institut für Analytische Chemie
- Plappert U, Raddatz K, Roth S and Fliedner TM. 1995. DNA-damage detection in man after radiation exposure--the comet assay--its possible application for human biomonitoring. *Stem Cells* 13 Suppl 1 215-22
- Pompa G, Fadini L, Di Lauro F and Caloni F. 1994. Transfer of lindane and pentachlorobenzene from mother to newborn rabbits. *Pharmacol Toxicol* 74 (1): 28-34
- Pool-Zobel BL and Leucht U. 1997. Induction of DNA damage by risk factors of colon cancer in human colon cells derived from biopsies. *Mutat Res* 375 (2): 105-15
- Preston RJ. 1985. Use of cytogenetic endpoints in human Lymphocytes as indicators of exposure to genotoxicants in: *New approaches in toxicity testing and their applications in human risk assessment*. Ed.: Li AP. Raven Press. New York.

- Rand GM, Nees PO, Calo CJ, Alexander DJ and Clark GC. 1982. Effects of inhalation exposure to hexachlorocyclopentadiene on rats and monkeys. *J Toxicol Environ Health* 9 (5-6): 743-60
- Raucy JL. 1995. Risk assessment: toxicity from chemical exposure resulting from enhanced expression of CYP2E1. *Toxicology* 105 (2-3): 217-24
- Reichert D, Neudecker T and Schutz S. 1984. Mutagenicity of hexachlorobutadiene, perchlorobutenoic acid and perchlorobutenoic acid chloride. *Mutat Res* 137 (2-3): 89-93
- Ries K, Krause P, Solsbacher M, Schwartz P, Unthan-Fechner K, Christ B, Markus PM and Probst I. 2000. Elevated expression of hormone-regulated rat hepatocyte functions in a new serum-free hepatocyte-stromal cell coculture model. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36 (8): 502-12
- Romagna F. 1993. Mikrokerntestsyste in: Mutationsforschung und genetische Toxikologie Ed.:Fahrig R. Wissenschaftliche Buchgesellschaft. Darmstadt. pg: 290-298
- Roos G. 1992. Arbeitsmedizinische Bewertung von Plasmaätzprozessen einschließlich der Beurteilung genotoxischer Risiken. Jahrestagung des Verbandes der Deutschen Betriebs-und Werksärzte. Braunschweig
- Roser S, Pool-Zobel BL and Rechkemmer G. 2001. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutat Res* 497 (1-2): 169-75
- Ross GM, McMillan TJ, Wilcox P and Collins AR. 1995. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutat Res* 337 (1): 57-60
- Rothfuss A, Schutz P, Bochum S, Volm T, Eberhardt E, Kreienberg R, Vogel W and Speit G. 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res* 60 (2): 390-4
- Rudolph L and Swan SH. 1986. Reproductive hazards in the microelectronics industry. *Occup Med* 1 (1): 135-43
- Rundell MS, Wagner ED and Plewa MJ. 2003. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation? *Environ Mol Mutagen* 42 (2): 61-7
- Runge DM, Runge D, Foth H, Strom SC and Michalopoulos GK. 1999. STAT 1alpha/1beta, STAT 3 and STAT 5: expression and association with c-MET and EGF-receptor in long-term cultures of human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 265 (2): 376-81
- Rydzynski K and Jedrychowski R. 1994. Sensory irritating properties of cyanuric chloride as revealed with plethysmographic method. *Int J Occup Med Environ Health* 7 (2): 149-54
- Salamone MF, Heddle JA and Katz M. 1979. The use of the Salmonella/microsomal assay to determine mutagenicity in paired chemical mixtures. *Can J Genet Cytol* 21 (1): 101-7
- Sauer IM, Kardassis D, Zeillinger K, Pascher A, Gruenwald A, Pless G, Irgang M, Kraemer M, Puhl G, Frank J, Muller AR, Steinmuller T, Denner J, Neuhaus P and Gerlach JC. 2003. Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation* 10 (5): 460-9

Sawyer J, Moore MM, Clive D and Hozier J. 1985. Cytogenetic characterization of the L5178Y TK+/-3.7.2C mouse lymphoma cell line. *Mutat Res* 147 (5): 243-53

Schrenk D and Dekant W. 1989. Covalent binding of hexachlorobutadiene metabolites to renal and hepatic mitochondrial DNA. *Carcinogenesis* 10 (6): 1139-41

Seglen PO. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13 29-83

Sgura A, Antoccia A, Ramirez MJ, Marcos R, Tanzarella C and Degrassi F. 1997. Micronuclei, centromere-positive micronuclei and chromosome nondisjunction in cytokinesis blocked human lymphocytes following mitomycin C or vincristine treatment. *Mutat Res* 392 (1-2): 97-107

SIA. 2004a. Annual Report 2004 http://www.sia-online.org/downloads/SIA_AR_2004.pdf

SIA. 2004b. Global Billings Report History <http://www.sia-online.org/downloads/ACFC7.pdf>

Silva JM, Day SH and Nicoll-Griffith DA. 1999. Induction of cytochrome-P450 in cryopreserved rat and human hepatocytes. *Chem Biol Interact* 121 (1): 49-63

Simmons JE. 1995. Chemical mixtures: challenge for toxicology and risk assessment. *Toxicology* 105 (2-3): 111-9

Sina JF, Bean CL, Dysart GR, Taylor VI and Bradley MO. 1983. Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential. *Mutat Res* 113 (5): 357-91

Singh NP. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res* 455 (1-2): 111-27

Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175 (1): 184-91

Singh NP and Stephens RE. 1997. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutat Res* 383 (2): 167-75

Smyth HF, Jr., Weil CS, West JS and Carpenter CP. 1969. An exploration of joint toxic action: twenty-seven industrial chemicals intubated in rats in all possible pairs. *Toxicol Appl Pharmacol* 14 (2): 340-7

Somani SM, Schaeffer DJ and Mack JO. 1981. Quantifying the toxic and mutagenic activity of complex mixtures with *Salmonella typhimurium*. *J Toxicol Environ Health* 7 (3-4): 643-53

Southard JH. 2002. Hypothermic and Cryo-Preservation of Hepatocytes. Single Topic Conference. Warrenton, Virginia, USA

Speit G and Merk O. 2002. Evaluation of mutagenic effects of formaldehyde in vitro: detection of crosslinks and mutations in mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 17 (3): 183-7

Speit G, Trenz K, Schutz P, Rothfuss A and Merk O. 1999. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol Lett* 110 (1-2): 73-8

Steen AM, Meyer KG and Recio L. 1997a. Analysis of hprt mutations occurring in human TK6 lymphoblastoid cells following exposure to 1,2,3,4-diepoxybutane. *Mutagenesis* 12 (2): 61-7

Steen AM, Meyer KG and Recio L. 1997b. Characterization of hprt mutations following 1,2-epoxy-3-butene exposure of human TK6 cells. *Mutagenesis* 12 (5): 359-64

Steinberg G, Stromborg K, Thomas L, Barker D and Zhao C. 2004. Strategies for covalent attachment of DNA to beads. *Biopolymers* 73 (5): 597-605

Stock TWB. 2002. Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen und ihre toxikologische Anwendungsprüfung <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/02/02H153/index.htm>

Strang CR and Levine SP. 1987. Preliminary investigation of the contamination of semiconductor process pump oil by halogenated organic compounds. *Solid State Technology* April: 69-70

Surralles J and Natarajan AT. 1997. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat Res* 392 (1-2): 165-74

Sussman HE, Olivero OA, Meng Q, Pietras SM, Poirier MC, O'Neill JP, Finette BA, Bauer MJ and Walker VE. 1999. Genotoxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine in the human lymphoblastoid cell line, TK6: relationships between DNA incorporation, mutant frequency, and spectrum of deletion mutations in HPRT. *Mutat Res* 429 (2): 249-59

Swales NJ, Luong C and Caldwell J. 1996. Cryopreservation of rat and mouse hepatocytes. I. Comparative viability studies. *Drug Metab Dispos* 24 (11): 1218-23

Swartz RC, Shults DW, Ozretich RJ, Lamberson JO, Cole FA, DeWitt TH, Redmond MS and Ferraro SP. 1995. PAH:a model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments. *Environ Toxicol Chem* 14 1977-1987

Szadkowski D and Roos G. 1989. Zum gesundheitlichen Risikopotential in der Halbleiterfabrikation. *Arbeitsmedizin - Sozialmedizin - Präventivmedizin*, 24 244-248

Tawn EJ and Holdsworth D. 1984. Mutagen-induced chromosome damage in human lymphocytes in: *Handbook of mutagenicity test procedures* Ed.:Kilbey BJ and Legator M. Elsevier Verlag. Amsterdam. 0-444-80519-2.

Taylor MS, Setzer RW and DeMarini DM. 1995. Examination of the additivity assumption using the spiral and standard Salmonella assays to evaluate binary combinations of mutagens. *Mutat Res* 335 (1): 1-14

Teuschler LK and Hertzberg RC. 1995. Current and future risk assessment guidelines, policy, and methods development for chemical mixtures. *Toxicology* 105 (2-3): 137-44

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35 (3): 206-21

- Uematsu K, Yasuda J, Sekine T, Sugano K, Kudoh S and Sekiya T. 1997. A new T-lymphocyte cloning assay for detection of in vivo mutations in the human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. *Environ Mol Mutagen* 30 (1): 31-9
- Uhl M, Helma C and Knasmüller S. 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat Res* 468 (2): 213-25
- Utesch D and Oesch F. 1992. Dependency of the in vitro stabilization of differentiated functions in liver parenchymal cells on the type of cell line used for co-culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A (3 Pt 1): 193-8
- Valentin-Severin I, Le Hegarat L, Lhuguenot JC, Le Bon AM and Chagnon MC. 2003. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat Res* 536 (1-2): 79-90
- Vamvakas S, Vock EH and Lutz WK. 1997. On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol* 27 (2): 155-74
- Visvardis EE, Tassiou AM and Piperakis SM. 1997. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and gamma-irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat Res* 383 (1): 71-80
- Vreugdenhil PK, Marsh DC and Southard JH. 1996. Comparison of isolated hepatocytes and tissue slices for study of liver hypothermic preservation/reperfusion injury. *Cryobiology* 33 (4): 430-5
- Wada S, Khoa TV, Kobayashi Y, Funayama T, Yamamoto K, Natsuhori M and Ito N. 2003. Detection of radiation-induced apoptosis using the comet assay. *J Vet Med Sci* 65 (11): 1161-6
- Ward JF. 1995. Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat Res* 142 (3): 362-8
- White PA. 2002. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat Res* 515 (1-2): 85-98
- Williams GM and Numoto S. 1984. Promotion of mouse liver neoplasms by the organochlorine pesticides chlordane and heptachlor in comparison to dichlorodiphenyltrichloroethane. *Carcinogenesis* 5 (12): 1689-96
- Wojewodzka M, Buraczewska I and Kruszewski M. 2002. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutat Res* 518 (1): 9-20
- Wu H, Sachs RK and Yang TC. 1998. Radiation-induced total-deletion mutations in the human hprt gene: a biophysical model based on random walk interphase chromatin geometry. *Int J Radiat Biol* 73 (2): 149-56
- Würgler FE. 1993. Genetische Endpunkte in: Mutationsforschung und genetische Toxikologie Ed.:Fährig R. Wissenschaftliche Buchgesellschaft. Darmstadt. pg: 18-29

Wyszynska K, Przybojewska B, Spiechowicz E, Chwialkowska-Liro W, Dziubaltowska E and Rydzynski K. 1994. Cyanuric chloride has no genotoxic and mutagenic properties in bacteria and bone marrow cells. *Int J Occup Med Environ Health* 7 (3): 281-9

Yagi K, Yamada C, Serada M, Sumiyoshi N, Michibayashi N, Miura Y and Mizoguchi T. 1995. Reciprocal regulation of prothrombin secretion and tyrosine aminotransferase induction in hepatocytes. *Eur J Biochem* 227 (3): 753-6

Yagi T, Hardin JA, Valenzuela YM, Miyoshi H, Gores GJ and Nyberg SL. 2001. Caspase inhibition reduces apoptotic death of cryopreserved porcine hepatocytes. *Hepatology* 33 (6): 1432-40

Yang RS, Abdo KM, Elwell MR, Levy AC and Brennecke LH. 1989. Subchronic toxicology studies of hexachloro-1,3-butadiene (HCBD) in B6C3F1 mice by dietary incorporation. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 9 (4): 323-32

Yendle JE, Tinwell H, Elliott BM and Ashby J. 1997. The genetic toxicity of time: importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. *Mutat Res* 375 (2): 125-36

Yusuf AT, Vian L, Sabatier R and Cano JP. 2000. In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using Hep G2 cells. *Mutat Res* 468 (2): 227-34

Danksagung

Ich möchte mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. B. Christ danke ich für die Überlassung des Themas, für die ausgezeichnete Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Frau Prof. Dr. K. Breunig danke ich für die Übernahme der Betreuung am Fachbereich Biologie.

Frau Dr. I. Wolff, Herrn Dr. H. Aurich und Herrn Dr. S. Bauer möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Bei Frau Dr. A. Kraus bedanke ich mich für die chemisch-analytischen Untersuchungen und der Präparation der Modellgemische.

Frau Dr. I. Schäffner und Herrn Chr. Schneider für die geduldige und freundliche Unterstützung bei allen PCR-Arbeiten.

Frau M. Hempel, Frau S. Ebensing und Frau Th. Hensel möchte ich für die exzellente Assistenz bei meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. G. Speit danke ich für die Übernahme der Gutachtertätigkeit und der freundlichen Unterstützung bei Problemen während der Arbeit.

Bei Herrn Dr. P. Stadelmann bedanke ich mich für die Bereitstellung des Protokolls und der L5178Y-Zellen zu Durchführung des MLA.

Herrn Prof. Dr. B. Lambert und Herrn Dr. O. Merk danke ich für die freundliche Unterstützung und Beantwortung von Fragen bei der Durchführung des HPRT-Test.

Herrn Prof. Dr. Tates für die Bereitstellung der TK6-Zellen.

Frau S. Behl gilt mein Dank für die freundlichen Hinweise zur Durchführung der statistischen Auswertung.

Herrn B. Engers von der Firma angaris GmbH danke ich für die Durchsicht des Kapitels Theoretischer Hintergrund Plasmaverfahren.

Den Mitgliedern des Instituts für Umwelttoxikologie danke ich für die Bereitstellung der NHBEZ und freundliche Assistenz.

Bei Herrn Dr. Gerlach bedanke ich mich für die Bestrahlung der RKJ-Zellen.

Dem gesamten ZAMED-Dreamteam gilt mein besonderer Dank, sie haben mit ihren hochspannenden Frühstücksrunden, unzähligen Kaffeepausen, gutem Arbeitsklima und durch viele kleine und große Ratschläge auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich auch bei meinem Freund Thomas ganz herzlich für die Unterstützung während dieser Zeit bedanken.

Meiner gesamten Familie möchte ich danken, ohne deren Unterstützung ich den langen Weg bis hierher nie hätte beschreiten können.

Und nicht zuletzt möchte ich mich auch bei all meinen Freunden bedanken.

I would like to thank all members of the Monga-Lab at the Department of Pathology, University of Pittsburgh, especially Satdarshan Paul S. Monga, MD; Amanda Miscenyi; Udayan M. Apte, PhD and last but not least Yuko Suguta MD, PhD, Lindsay Barua, Pallavi Apte, PhD and Dr. Thomas Lehmann for the warm welcome in Pittsburgh and the continual asking about my thesis.

Diese Arbeit wurde von der DFG (BA 1697 / 1-1) und dem Land Sachsen-Anhalt gefördert.

Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur.

Arno Penzias

Publikationsliste

Veröffentlichungen in Zeitschriften:

Müller P, Stock TW, Bauer S, Wolff I. 2002. Genotoxicological characterisation of complex mixtures. Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. *Mutat Res.* Mar 25; 515 (1-2): 99-109.

Müller P, Aurich H, Wenkel R, Schäffner I, Wolff I, Walldorf J, Fleig WE, Christ B. 2004. Serum-free cryopreservation of porcine hepatocytes. *Cell Tissue Res.* 317 (1): 45-56.

Müller P and Monga D, Micsenyi A, Loizos N, Monga SPS. 2005. PDGFR α : A novel therapeutic target in human hepatocellular cancer. Eingereicht: *N Engl J Med.* NEJM manuscript # 05-0782.

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen:

Poster

Wolff I, Müller P, Stock TW, Bauer S, Foth H. 1999. Generations of DNA Single-Strand Breaks by Complex Mixtures. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Suppl.* 359 (3): 666 (R170)

Stock TW, Müller P, Wolff I, Bahn H, Foth H. 1999. Normal Human Bronchial Epithelial Cells as a Tool to Monitor Genotoxic Effects of Complex Mixture. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Suppl.* 359 (3): 693 (R177)

Wolff I, Müller P, Stock TW, Bauer S, Foth H. 1999. Genotoxic Activity of Complex Mixtures from Plasma Etching in Lymphocytes, Bronchial Cells and Hepatocytes. *Toxicology Letters Suppl.* 1: P100 (47)

Müller P, Stock TW, Wolff I, Bauer S, Foth H. 2000. Assessment of DNA Damage in Various Mammalian Cells Using the Alkaline Comet Assay. 30th Annual Meeting of EEMS-2000, Budapest, Hungary. P/34 http://www.swan.ac.uk/cget/eigt/abstracts_eems.pdf

Müller P, Wolff I, Bauer S, Stock TW, Foth H. 2000. Assessment of DNA Damage Induced by Complex Mixtures of Halogenated Hydrocarbons using the Alkaline Comet Assay. *Toxicology Letters Suppl.* 1: 136 (36)

Stock TW, Müller P, Lehmann T, Hofmann SH, Foth H, Silber RE. 2001. Activity, morphology and utility of primary normal human bronchial epithelial cells cultured from resection material. 30th Annual Meeting of the German Society of Thoracic and Cardiovascular Surgery. Leipzig. <http://www.thieme.de/thoracic/abstracts2001/daten/fp12.html>

Müller P, Wolff I, Bauer S, Stock TW, Foth H. 2001. Increased Rates of Micronuclei in cultured human Lymphocytes following the treatment with a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Suppl.* 363 (4): 583 (R149)

Müller P, Wolff I, Stock TW, Bauer S, Foth H. 2002. Screening toward genotoxic effects of halogenated hydrocarbons. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Suppl.* 365 (1): 533 (R137)

Mueller P, Aurich H, Fleig W, Christ B. 2002. DNA damage during cryopreservation of hepatocytes. *Hepatology*, Vol. 36, No. 4, Pt. 2: 425A (1050)

Müller P, Aurich H, Wenkel R, Fleig W, Christ B. 2003. Verminderung der Vitalität kryokonservierter Hepatozyten durch DNA -Schädigungen. *Z Gastroenterol XLI*: 122 (P3711)

Müller P, Aurich H, Schäffner I, Wenkel R, Fleig W, Christ B. Viability and functionality of serum-free cryopreserved hepatocytes in culture. First International Joint Symposium of the "Research Center Immunology Magdeburg/Halle (Sachsen-Anhalt)". 08.11.-10.11.2003. Weimar.

Müller P, Aurich H, Schäffner I, Wenkel R, Fleig W, Christ B. 2004. Erhalt leberspezifischer Eigenschaften in serumfrei kultivierten kryokonservierten Hepatozyten. *Z Gastroenterol XLII*: 86 (P3127)

Müller P and Monga D, Micsenyi A, Loizos N, Monga SPS. 2004. PDGFR α : A novel therapeutic target in human hepatocellular cancer. *Science* 2004. 06.10.-8.10.2004. Pittsburgh, PA, USA.

Müller P, Tan X, Monga SPS. 2005. β -Catenin is required for normal liver growth & regeneration. McGowan Institut for Regenerative Medicine Scientific Retreat. 07.03.-08.03.2005. Nemaquin, PA, USA.

Poster Award

Vortrag

Müller P and Monga D, Micsenyi A, Loizos N, Monga SPS. 2005. PDGFR α : A novel therapeutic target in human hepatocellular cancer. Akzeptiert. *EXPERIMENTAL BIOLOGY* 2005. 02.04.-06.04.2005. San Diego, CA, USA.

Andere Veröffentlichungen:

Meister G, Kriese U, Müller P, Richter N, Stöck M, Vogel A, Zimmer R. 1998. Die Reide im halleschen Osten. Herausgeber: Stadt Halle, Der Oberbürgermeister

Lebenslauf

Name: Peggy Müller

Geburtsdatum: 21.05.1976

Geburtsort: Halle/S.

Familienstand: ledig

09/1982 – 08/1990 Polytechnische Oberschule in Halle/S.

09/1990 – 06/1994 Thomas Müntzer Gymnasium in Halle/S.

06/1994 Allgemeine Hochschulreife

10/1994 – 12/1999 Biologie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

11/1998 – 12/1998 Diplomprüfung in den Fächern: Genetik, Mikrobiologie, Biochemie und Immunologie

01/1999 – 02/2000 Diplomarbeit zum Thema: „Charakterisierung gentoxischer Wirkungen von komplexen Abproduktgemischen aus Plasmaätzprozessen in unterschiedlichen Säugerzellsystemen“ im Institut für Umwelttoxikologie der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg

29.02.2000 Verteidigung (Prädikat: „Sehr Gut“)

03/2000 – 02/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am DFG-Projekt: „Untersuchungen zu toxischen und gentoxischen Wirkungen von komplexen Stoffgemischen aus Plasmaprozessen unter Berücksichtigung möglicher Interaktionen“, BA 1697 / 1-1 im Zentrum für angewandte medizinische und humanbiologische Forschung (ZAMED) der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg

03/2002 – 05/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG „Molekulare Hepatologie“ der Klinik für Innere Medizin I der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg

seit 06/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Department of Pathology an der University of Pittsburgh

gez. P. Müller

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben und aus benutzten Werken entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Halle/S.,

gez. P. Müller

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass ich nur diesen Antrag auf Zulassung zum Promotionsverfahren eingereicht habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle/S.,

gez. P. Müller

Thesen

1. In Natur und Umwelt erfolgt eine Exposition des Menschen meist gegenüber komplex zusammengesetzten chemischen Gemischen. In der Toxikologie werden aber zumeist nur Einzelsubstanzen in ihren Wirkungen verifiziert. Aus diesem Grund ist es von Bedeutung Verfahren zu entwickeln, die es ermöglichen, toxikologische Leitsubstanzen aus einem chemischen Gemisch zu identifizieren.
2. Das in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des alkalischen Comet Assays untersuchte komplexe Stoffgemisch aus ca. 80 halogenierten Kohlenwasserstoffen löste konzentrationsabhängig in primären humanen Lymphozyten, normalen humanen Bronchialepithelzellen und Rattenhepatozyten signifikant erhöhte DNA-Schäden in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen und AP-Stellen im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen aus. Die Ergebnisse der Untersuchungen unter Zusatz des extrametabolisierenden Systems S9-Mix bestätigten die direkte genotoxische Wirkung des komplexen Gemisches.
3. Die Resultate der Untersuchungen des durch Gaschromatographie fraktionierten Gemisches verdeutlichten, dass alle drei Fraktionen des komplexen Stoffgemisches im alkalischen Comet Assay signifikant erhöhte DNA-Schäden im Vergleich zu den Kontrollen auslösten. Dabei verursachten die Komponenten der Fraktion #3 im Vergleich zu den Fraktionen #1 und #2 signifikant höhere DNA-Schädigungen in primären humanen Lymphozyten.
4. Die chemisch-analytische Bestimmung der Zusammensetzung der Fraktion #3 bestätigt, dass die relativen Konzentrationen der Inhaltsstoffe mit früheren Untersuchungen übereinstimmten, es konnten keine zusätzlichen Substanzen identifiziert werden.
5. Die Analyse der verfügbaren Einzelsubstanzen der Fraktion #3 im alkalischen Comet Assay zeigte, dass alle Substanzen in der getesteten Konzentration signifikant erhöhte DNA-Schädigungen in primären humanen Lymphozyten auslösten. Die Substanzen Hexachlorbutadien, Octachlorcyclopenten und Pentachlorbenzol bewirkten die höchsten DNA-Schädigungen ohne den Zusatz von S9-Mix. Die Substanzen Pentachlorpyridin und Hexachlorcyclopentadien verursachten nach Zusatz des S9-Mix erhöhte DNA-Schädigung.
6. Die Kombinationswirkungen der Inhaltsstoffe des komplexen Stoffgemisches wurden durch die Herstellung und Testung von 2-Komponenten-Modellgemischen aus den verfügbaren Einzelsubstanzen erfasst. Diese lösten im alkalischen Comet Assay signifikant erhöhte DNA-Schädigungen in primären humanen Lymphozyten im Vergleich zu den Kontrollen aus.
7. Die Modellgemische, die die Komponenten Octachlorcyclopenten, Pentachlorpyridin und / oder Trichlortriazin enthielten, verursachten häufiger Schäden DNA als Modellgemische ohne diese Substanzen.

8. Die gaschromatographische Überprüfung der hergestellten Modellgemische ergab, dass die gemessenen Konzentrationen mit den Zielkonzentrationen überein stimmten.
9. Im neutralen Comet Assay wurde gezeigt, dass das komplexe Stoffgemisch in primären humanen Lymphozyten und TK6-Zellen konzentrationsabhängig DNA-Doppelstrangbrüche induzierte. Dieses Ergebnis weist auf das erhebliche mutagene Potential des komplexen Stoffgemisches hin, da diese Schäden einem komplizierten Reparaturvorgang unterliegen und deshalb die Wahrscheinlichkeit bleibender DNA-Schäden höher ist.
10. Der Mikrokerntest erfasst Chromosomenmutationen als einen weiteren genetischen Endpunkt. Es konnte nachgewiesen werden, dass das komplexe Stoffgemisch konzentrationsabhängig signifikant erhöhte chromosomale Aberrationen in primären humanen Lymphozyten auslöste.
11. Die einzelnen Fraktionen des komplexen Stoffgemisches bewirkten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Raten an Chromosomenaberrationen in primären humanen Lymphozyten, wobei die Inhaltsstoffe der Fraktion #3 die höchsten Schäden verursachten.
12. Die verfügbaren Einzelsubstanzen der Fraktion #3 lösten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Raten an chromosomalen Aberrationen in primären humanen Lymphozyten aus, wobei die Komponenten Hexachlorbutadien und Pentachlorbenzol die höchsten Schäden verursachten.
13. Die Ergebnisse des alkalischen und neutralen Comet Assays und des Mikrokerntests waren sehr gut reproduzierbar. Daher können diese Tests zu Untersuchungen der Wirkungen komplexer Stoffgemische eingesetzt werden. Insbesondere der alkalische Comet Assay kann als Test zur Identifikation der toxikologischen Leitsubstanz eines chemisch komplex zusammengesetzten Gemisches eingesetzt werden.
14. Durch die Untersuchungen zur Reparatur von DNA-Strangbrüchen wurde gezeigt, dass nach 24stündiger Behandlung im Vergleich zu einer einstündigen Behandlung mit der gleichen Konzentration an komplexem Stoffgemisch nach 2 h Reparaturzeit noch signifikant erhöhte Werte an DNA-Schädigungen nachzuweisen waren. Diese unreparierten DNA-Schädigungen können zur Manifestation von Mutationen führen.
15. Die Analyse der DNA-Reparatur in primären humanen Lymphozyten nach der Behandlung mit den drei Fraktionen des komplexen Stoffgemisches bestätigte, dass die Fraktion # 3 die bioaktiven Substanzen enthielt.
16. Die Berechnung der Reparaturkapazität erbrachte keine eindeutigen Hinweise auf ein unterschiedliches Ausmaß der Schädigung der Reparatursysteme der Zellen durch das komplexe Stoffgemisch oder seine Fraktionen.

17. Die Erfassung von Mutationsereignissen in der DNA und somit die weitere Charakterisierung des mutagenen Potentials des komplexen Stoffgemisches erfolgte durch Genmutationstests. Die Ergebnisse im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Tests (HPRT-Tests) waren nicht reproduzierbar. Daher war dieser Test an primären humanen Lymphozyten und TK6-Zellen nicht für die Untersuchungen zu gentoxischen Wirkungen des komplexen Stoffgemisches geeignet.
18. Der Maus-Lymphoma-TK^{+/-}-Assay (MLA), der neben Genmutationen auch Chromosomenmutationen erfasst, bestätigte das erhebliche mutagene Potential des komplexen Stoffgemisches. Es löste mit ansteigenden Konzentrationen signifikant höhere Mutantenfrequenzen im Vergleich zu den Kontrollen aus. Die Ergebnisse zur direkten mutagenen Wirkung wurden bestätigt.
19. Für Gen- und Chromosomenmutationen wurde im MLA ein signifikanter Anstieg nach Behandlung mit dem komplexen Stoffgemisch verzeichnet. Eine geringere Frequenz an Genmutationen wurde bei den Untersuchungen mit S9-Mix beobachtet. Es konnte bestätigt werden, dass das komplexe Stoffgemisch insgesamt häufiger Chromosomen- als Genmutationen auslöste.
20. Die molekulargenetische Analyse zeigte, dass fast ein Fünftel der durch komplexes Stoffgemisch induzierten TFT-resistenten Kolonien durch Genmutationen entstanden waren. Dies ist ein Anstieg gegenüber den spontan entstandenen TFT-resistenten Kolonien um den Faktor 1,4. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass ein Viertel der Mutationen auf kleine Deletionen oder Rekombinationen und über 50 % der induzierten TFT-resistenten Kolonien durch größere Deletionen oder Rekombinationen oder auf den Totalverlust des Chromosoms 11 zurückzuführen waren.
21. Die Koloniebildungsfähigkeit von TK6-Zellen nahm mit ansteigenden Konzentrationen des komplexen Stoffgemisches kontinuierlich ab. Damit wurde die eindeutige Dosis-Wirkungsabhängigkeit zytotoxischer Effekte des komplexen Stoffgemisches bestätigt.
22. Hepatozyten stellen ein ideales Testsystem zur Untersuchung toxikologischer Eigenschaften neuer oder unbekannter Substanzen dar. Um Hepatozyten permanent verfügbar zu haben, ist die Etablierung von Hepatozytenbanken durch Kryokonservierung der Zellen unabdingbar.
23. Durch den Zusatz von Glyzin zum Einfrier- und Auftaumedium wurde die durch die Kryokonservierung auftretende DNA-Schädigung in Schweine- nicht aber in Rattenhepatozyten verhindert. Der Einsatz von Glyzin resultierte in einer 6-fach höheren Zellausbeute an Schweinehepatozyten nicht jedoch an Rattenhepatozyten nach der Kryokonservierung.

24. Für toxikologische Untersuchungen mit kryokonservierten Hepatozyten müssen leberspezifische Eigenschaften in einer anschließenden Kultur erhalten bleiben. Die Anheftungsrate und die Erhaltung der typischen Poliferationsfähigkeit von kryokonservierten Schweinehepatozyten, aber nicht von kryokonservierten Rattenhepatozyten, konnte durch den Einsatz von konditioniertem Medium von Nichtparenchymzellen der Leber signifikant verbessert werden.
25. In kryokonservierten Schweinehepatozyten wurden leberspezifische Eigenschaften wie der Xenobiotikastoffwechsel über die Cytochrom P450- Subtypen CYP1A1 und CYP2B1 und die Entgiftung von Ammoniak über die Synthese von Harnstoff weitgehend erhalten. Diese waren denen in nicht-kryokonservierten Hepatozyten vergleichbar.
26. Durch RT-PCR konnte in verschiedenen Präparationen von 48h kultivierten kryokonservierten Schweinehepatozyten die mRNA des leberspezifisch exprimierten Albumin, Transferrin, CYP1A1, Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK) detektiert werden. Die fehlende Expression des embryonalen Markers α -Fetoprotein (AFP) zeigte den Erhalt des differenzierten Phänotyps an.
27. Die Expression der leberspezifischen Gene Transferrin, CYP1A1, CPS und PCK blieb über einen Zeitraum von 4 Tagen in der Kultur konstant. Mit der Zunahme der Proliferation der Zellen nahm die Expression des Albumingens im Laufe der 4-tägigen Kultur ab, die des AFP zu. Dies könnte auf die zunehmende De-Differenzierung der Zellen über den Kulturverlauf hinweisen.
28. Kryokonservierte Schweinehepatozyten behielten nach der hier eingesetzten Methode der serum-freien Kryokonservierung ihre leberspezifischen Eigenschaften. Durch ihre Metabolisierungsfähigkeit stellen sie ein ideales Testsystem für toxikologische Analysen dar. Ihre Einsatzfähigkeit in gentoxikologischen Analysen chemisch komplex zusammengesetzter Gemische konnte unter Verwendung des komplexen Stoffgemisches in einer Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden.