

# I Inhaltsverzeichnis

	Seite	
II	Abbildungs-und Tabellenverzeichnis	IV
III	Abkürzungsverzeichnis	VII
1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Zelllinie und Primärkultur	13
2.1.2	Geräte	13
2.1.3	Chemikalien	14
2.1.4	Zellkulturmedien	16
2.1.5	Allgemeine Lösungen und Puffer	16
2.1.6	Lösungen und Puffer der einzelnen Methoden	17
2.2	Methoden	20
2.2.1	Kultivierung der Zellen	20
2.2.1.1	Menschliche Fibroblastenkultur	20
2.2.1.2	Primäre Astrozyten aus dem Rattenhirn	21
2.2.2	Inkubation der Zellen mit den Schadstoffen	21
2.2.3	Zellvitalität (MTT-Assay)	22
2.2.4	Koloniebildungsfähigkeit	23
2.2.5	Zellwachstum	23
2.2.6	DNA-schädigende Wirkung (Kometen-Assay)	24
2.2.7	Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der Zellkerne (DAPI)	25
2.2.8	DNA-Fragmentierung („DNA-Leiter“)	26
2.2.9	Lipidperoxidation (TBA-Test)	28
2.2.10	Untersuchungen mit PM2 DNA	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Wirkung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bzw. S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf humane Fibroblasten	32
3.1.1	Zellvitalität (MTT-Assay)	32
3.1.1.1	Toxizität der Substanzen direkt nach Schadstoffeinwirkung (akute Toxizität)	32
3.1.1.2	Toxizität der Substanzen nach einer <i>recovery phase</i>	33
3.1.2	Koloniebildungsfähigkeit	34
3.1.3	Zellwachstum	35

---

3.1.4	Induktion von Lipidperoxidation (TBA-Test)	38
3.1.5	Induktion von DNA-Schäden (Kometen-Assay)	40
3.1.6	Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	45
3.1.6.1	Veränderung der Zellmorphologie, Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der Zellkerne (DAPI)	46
3.1.6.2	Induktion einer „DNA-Leiter“ durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bzw. S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	49
3.2	Einfluß von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bzw. S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf Astrozyten	52
3.2.1	Zytotoxizitätstest (MTT-Assay)	52
3.2.1.1	Toxizität der Substanzen direkt nach Schadstoffeinwirkung (akute Toxizität)	52
3.2.1.2	Toxizität der Substanzen nach einer Erholungsphase	54
3.2.2	Induktion von Lipidperoxidation (TBA-Test)	55
3.2.3	Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	56
3.2.3.1	Veränderung der Zellmorphologie, Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der Zellkerne (DAPI)	56
3.2.3.2	Induktion einer „DNA-Leiter“ durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bzw. S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	62
3.3	DNA-Strangbruchbildung durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bzw. Pyrethrine/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in nativer PM2 DNA	63
3.3.1	Strangbruchinduktion durch variable H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen bei konstanter S-Bioallethrin-Konzentration	64
3.3.2	Strangbruchinduktion durch variable S-Bioallethrin-Konzentrationen bei konstanter H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration	65
3.3.3	Strangbruchinduktion durch Pyrethrine/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> im Vergleich zu S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	66
4	Diskussion	69
4.1.	Einzelwirkung von S-Bioallethrin	69
4.1.1	Wirkung auf Fibroblasten	69
4.1.2	Wirkung von S-Bioallethrin auf Astrozyten im Vergleich zu Fibroblasten	72
4.2.	Einzelwirkung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	73
4.2.1	Einfluß von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf Fibroblasten	73
4.2.2	Einfluß von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf Astrozyten im Vergleich zu Fibroblasten	76
4.3.	Kombinationswirkung von S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	78
4.3.1	Einfluß von S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf Fibroblasten	79

---

4.3.2	Einfluß von S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf Astrozyten im Vergleich zu Fibroblasten	86
4.3.3	<i>In vitro</i> -Untersuchungen und mechanistische Aspekte	90
5	Ausblick	93
6	Zusammenfassung	95
7	Literaturverzeichnis	97

## II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### IIa Abblidungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Strukturformeln der Hauptwirkstoffe des Pyrethrum-Extraktes (Pyrethrine) und Strukturformel von Allethrin	8
Abb. 2: Zellvitalität menschlicher Fibroblasten nach Behandlung mit variablen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen allein und in Kombination mit S-Bioallethrin	33
Abb. 3: Zellvitalität von Fibroblasten nach Behandlung mit variablen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen allein und in Kombination mit S-Bioallethrin mit anschließender <i>recovery phase</i>	34
Abb. 4: Koloniebildungsfähigkeit von Fibroblasten nach Behandlung mit unterschiedlichen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen allein und in Kombination mit S-Bioallethrin	35
Abb. 5: Wachstumshemmung menschlicher Fibroblasten nach Inkubation mit variablen S-Bioallethrin-Konzentrationen	36
Abb. 6: Wachstum von Fibroblasten nach Behandlung mit unterschiedlichen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen	37
Abb. 7: Wachstumshemmung von Fibroblasten durch S-Bioallethrin allein und in Kombination mit variablen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen	37
Abb. 8: Wachstum menschlicher Fibroblasten durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> allein und in Kombination mit S-Bioallethrin in unterschiedlichen Konzentrationen	38
Abb. 9: TBARS in menschlichen Fibroblasten nach Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> allein und in Kombination mit S-Bioallethrin bzw. S-Bioallethrin allein. Direkte Messung oder nach anschließender Nachinkubation in Saline A	39
Abb. 10: TBARS in menschlichen Fibroblasten nach Behandlung mit S-Bioallethrin mit und ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bzw. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> allein. Nachinkubation in Saline A und Messung der TBARS nach einer <i>recovery phase</i>	40
Abb. 11: Gelelektrophoretische Auftrennung von humaner DNA (Fibroblasten) im Kometen-Assay. Darstellung unterschiedlich starker DNA-Schäden über das <i>tailmoment</i>	41
Abb. 12: Gelelektrophoretische Auftrennung von menschlicher DNA (Fibroblasten) im Kometen-Assay. Stark geschädigte und ungeschädigte DNA durch Behandlung mit S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und anschließender <i>recovery phase</i>	42
Abb. 13: DNA-Kometenbildung in Fibroblasten nach Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne S-Bioallethrin. Messung direkt nach Befügung oder nach einer <i>recovery phase</i>	43

- 
- Abb. 14: DNA-Schäden in Fibroblasten nach Behandlung mit S-Bioallethrin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Messung direkt nach Schadstoffbehandlung oder nach unterschiedlichen Nachinkubationszeiten bis maximal eine Stunde in serumhaltigem Medium 44
- Abb. 15: Histogramm individueller DNA-Schäden in Fibroblasten nach Inkubation mit S-Bioallethrin mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein. Messung sofort oder nach einer *recovery phase* 45
- Abb. 16: Phasenkontrast- bzw. Fluoreszenzaufnahmen: Zell- und Zellkern-Morphologie von Fibroblasten nach Behandlung mit S-Bioallethrin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit anschließender *recovery phase*. Einfluß von Staurosporin nach einer 21-stündigen Inkubation 48
- Abb. 17: Prozentuale Darstellung der ausgezählten Zellkerntypen in Fibroblasten nach Inkubation mit S-Bioallethrin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und anschließender *recovery phase* 49
- Abb. 18: Einfluß von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, S-Bioallethrin und S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Bildung einer DNA-Fragmentierung in Fibroblasten nach Behandlung mit den Schadstoffen und einer *recovery phase*. Einfluß von Staurosporin nach 21-stündiger Inkubation 50
- Abb. 19: Zellvitalität von Astrozyten nach Behandlung mit S-Bioallethrin bzw. Lösungsvermittler 52
- Abb. 20: Zellvitalität von Astrozyten nach Behandlung mit variablen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen allein bzw. in Kombination mit 500 µmol/l S-Bioallethrin 53
- Abb. 21: Zellvitalität von Astrozyten nach Behandlung mit variablen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen allein bzw. in Kombination mit 1 mmol/l S-Bioallethrin 54
- Abb. 22: Zellvitalität von Astrozyten nach Behandlung mit variablen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen allein bzw. in Kombination mit S-Bioallethrin und anschließender *recovery phase* 55
- Abb. 23: TBARS in Astrozyten nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein und in Kombination mit S-Bioallethrin bzw. S-Bioallethrin allein. Direkte Messung oder nach anschließender Nachinkubation in Saline A 56
- Abb. 24: Phasenkontrast- bzw. Fluoreszenzaufnahmen: Zell- und Zellkern-Morphologie von Astrozyten nach Behandlung mit S-Bioallethrin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit anschließender *recovery phase* von 21 Stunden 57
- Abb. 25: Phasenkontrast- bzw. Fluoreszenzaufnahmen: Zell- und Zellkern-Morphologie von Astrozyten nach Behandlung mit S-Bioallethrin, Lösungsvermittler, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit anschließender *recovery phase* von 48 Stunden 59

Abb. 26: Prozentuale Darstellung der ausgezählten Zellkerntypen in Astrozyten nach Inkubation mit S-Bioallethrin, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und anschließender <i>recovery phase</i> (21 und 48 Stunden)	61
Abb. 27: Einfluß von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , S-Bioallethrin und S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die Bildung einer DNA-Fragmentierung („DNA-Leiter“) in Astrozyten nach Behandlung mit den Schadstoffen und einer <i>recovery phase</i> . Einfluß von Staurosporin nach 21 Stunden Inkubation	63
Abb. 28: Verschiedene PM2 DNA Konformationen im Agarosegel	64
Abb. 29: Einzelstrangbrüche in PM2 DNA durch variable H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen mit und ohne 1 mmol/l S-Bioallethrin	64
Abb. 30: Einzelstrangbrüche in PM2 DNA durch variable H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen mit und ohne 100 µmol/l S-Bioallethrin	65
Abb. 31: Einzelstrangbrüche in PM2 DNA durch variable S-Bioallethrin-Konzentrationen mit und ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bzw. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> allein	66
Abb.32: Einzelstrangbrüche in PM2 DNA durch variable H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen mit S-Bioallethrin bzw. Pyrethrine (absolute Effekte)	67
Abb. 33: Einzelstrangbrüche in PM2 DNA durch variable Konzentrationen an S-Bioallethrin bzw. Pyrethrine in Kombination mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (absolute Effekte)	68

## IIb Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenstellung des Einflusses von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf Fibroblasten und Astrozyten in unterschiedlichen Toxizitätstests	76
Tab. 2: EC <sub>50</sub> -Werte für H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in verschiedenen Testsystemen in Fibroblasten und Astrozyten mit und ohne einer untoxischen S-Bioallethrin-Konzentration	86
Tab. 3: Genotoxische Effekte durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> allein und in Kombination mit einer untoxischen S-Bioallethrin-Konzentration in Fibroblasten und Astrozyten	88
Tab. 4: Strangbrüche in PM2 DNA durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mit und ohne DMSO/Cremophor (Lösungsvermittler)	90
Tab. 5: Hemmfaktor: Hemmung der Strangbrüche in PM2 DNA durch verschiedene Anteile des Lösungsvermittlers bezogen auf H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in NaPO <sub>4</sub> -Puffer	91
Tab. 6: Strangbrüche in PM2 DNA durch S-Bioallethrin, Pyrethrine in zwei unterschiedlichen Konzentrationen und mit und ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in zwei unterschiedlichen Konzentrationen	91

### III Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
ALS	amyotrophic lateral sclerosis
ASA	Aspirin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bichinonin acid</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BHT	butyliertes Hydroxytoluol
bidest.	bidestilliert
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bp	Basenpaare
Cat	<i>catalase</i>
Ca	Calcium
-CH <sub>3</sub>	Methylgruppe
-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Ethylgruppe
-CH=CH <sub>2</sub>	Ethengruppe
Cl	Chlorid
-COOCH <sub>3</sub>	Methylestergruppe
Cu	Kupfer
Cu(II)	Kupfer-(II)-chlorid-2-hydrat
Cu-NTA	Kupfer-Nitriloacetat
DAPI	4',6-Diamindin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2-2-2)-Octan
DDT	Chlorphenotan
dest.	destilliert
DMEM	<i>dulbeccos modified eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
EC	<i>effective concentration</i>
EC <sub>50</sub>	Konzentration, die 50 % Effekt hervorruft
EDTA	<i>ethylen-diaminetetraacetic acid</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fe	Eisen
GABA	γ-Aminobuttersäure
GSH	Glutathion
h	<i>hour</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HO <sub>2</sub> ·	Hydroperoxid-Radikal
HL-60	menschliche myeloische Leukämie-Zellen
HPRT	Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HT-29-colon	Dickdarmkrebs-Zelllinie
ICE	<i>interleukin-1β converting enzyme</i>
K562	Erythroleukämia-Zellen
Konz.	Konzentration
LD <sub>50</sub>	Lethale Dosis bei der 50 % der Versuchstiere sterben
LMP	<i>low melting point</i>

LPO	Lipidperoxidation
MAO	Monoaminoxidase
MDA	Malondialdehyd
MEM	<i>minimum essential medium</i>
Mg	Magnesium
MMS	Methylmethansulfonat
MS	<i>multiple sclerosis</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N-57	primäre menschliche Hautfibroblasten
NAD(P)H	hydriertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NO <sup>·</sup>	Stickstoffmonoxid
NOEC	<i>no observed effect concentration</i>
NT-3	Neurotrophin-3
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Radikal-Anion
·OH	Hydroxyl-Radikal
OLN-93	<i>permanent oligodendroglia cell line</i>
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit-Anion
p53	Tumorsuppressor-Gen
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCP	Pentachlorphenol
PLL	Poly-L-Lysin
PG	Propylgallat
PM2 DNA	DNA des Phagen <i>Pseudomonas 2</i>
P <sub>ow</sub>	Oktanol/Wasserverteilungskoeffizient
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i>
NaPO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
RNA	<i>ribonuclein acid</i>
RNAse	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
SFM	Serumfreies Medium
SSB	<i>single strand break</i> (DNA-Einzelstrangbruch)
SOD	Superoxiddismutase
t <sub>0</sub>	direkte Messung nach Schadstoffbehandlung
t <sub>21</sub>	Messung nach einer <i>recovery phase</i> von 21 Stunden
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen
TCHQ	<i>tetrachlorhydroquinone</i>
TE	Tris-EDTA
TEP	1,1,3,3-Tetraethoxypropan
tm	<i>tail moment</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase <i>mediated</i> dUTP <i>nick end labeling</i>
UV	Ultraviolett
V-79	Permanente Hamster-Lungenzellen
ZNS	Zentrales Nervensystem



## 1 Einleitung

In unserer Umwelt befinden sich zahlreiche natürlich vorkommende oder künstlich erzeugte Verbindungen mit insektizider Wirkung, die (auch) den menschlichen Organismus belasten können. Im Idealfall sollen Insektizide ausschließlich zur Bekämpfung von Organismen, die den Menschen – direkt oder indirekt – schädigen, eingesetzt werden. Einst wurden dafür Pestizide wie Chlorphenotan (DDT), Lindan, Aldrin, Dieldrin oder Organophosphat-Verbindungen verwendet. Diese Verbindungen besitzen allerdings entweder den Nachteil einer hohen akuten Humantoxizität (organische Phosphorsäureester) oder wie im Falle des DDT einer langsamen Eliminierungshalbwertszeit aus dem Fettgewebe und der Bildung toxischer Metabolite (Woodard *et al.*, 1945; Treon und Cleveland, 1955). Pyrethroide hingegen sind Insektizide, die diese negativen Eigenschaften anscheinend nicht besitzen. Deshalb finden sie gegenwärtig in vielen Bereichen Verwendung (Stolz *et al.*, 1994). Die Unbedenklichkeit von Pyrethroiden für den Menschen wurde jedoch in den letzten Jahren kontrovers diskutiert (Haas, 1992; Appel und Michalak, 1994; Schütze 1996).

Es gibt Befunde, die Rückschlüsse auf chronische Pyrethroidvergiftungen beim Menschen zulassen (Müller-Mohnssen und Hahn, 1995). Die Ergebnisse sind allerdings unzureichend und wissenschaftlich umstritten, da der Nachweis einer Pyrethroidbelastung im Organismus schwer zu ermitteln ist. In Säugern werden Pyrethroide durch rasche Metabolisierung detoxifiziert und ohne Bioakkumulation ausgeschieden (Casida *et al.*, 1983; Aldridge, 1990; Miyamoto *et al.*, 1995). Als Hinweise einer Exposition gelten die im Hausstaub ermittelten Pyrethroidkonzentrationen Betroffener sowie der Nachweis von Metaboliten im Urin insofern dies nach einer zeitlichen Verzögerung noch möglich ist (Scherb und Weigelt, 1994). Als weitere Problematik kommt hinzu, daß die Symptome der Betroffenen oft in den Bereich der „Befindlichkeitsstörungen“, wie beständige Kopfschmerzen, Übelkeit, Vergeßlichkeit, depressive Verstimmungen etc., fallen, die als Krankheitsbild nicht anerkannt werden (Müller-Mohnssen und Hahn, 1995). Es stellt sich außerdem die Frage, warum einige Menschen sehr sensitiv und andere offenbar nicht empfindlich auf Pyrethroide reagieren. Aufgrund der geringen Datenlage besteht hinsichtlich der Erfassung und Beurteilung auch eventuell persistierender Veränderungen erheblicher Forschungsbedarf, gerade im Hinblick auf mögliche Kombinationseffekte mit anderen Noxen. Es wird zunehmend erkannt, daß die Wirkung von Xenobiotika nicht isoliert betrachtet werden kann. (Appel, 1990; Vainio *et al.*, 1990; Mumtaz *et al.*, 1994; Feron *et al.*, 1998). Folglich könnte eine mögliche Ursache der unterschiedlichen individuel-

len Empfindlichkeiten gegenüber Pyrethroiden auf Kombinationseffekte zurückgeführt werden.

Kombinationseffekte verschiedener Xenobiotika können einerseits aufgrund deren Lipophilitätsunterschiede entstehen. Pyrethroide besitzen eine hohe Lipophilität. Für stark lipophile Verbindungen konnte gezeigt werden, daß sie bereits in niedrigen Konzentrationen synergistische Effekte mit anderen Substanzen hervorrufen (Witte *et al.*, 1995; Witte *et al.*, 2000). Durch Kombination von Xenobiotika mit einer stark lipophilen Komponente können selbst dann Schäden an Zellen festgestellt werden, wenn die kombinierten Substanzen in Konzentrationen unterhalb ihrer eigenen NOEC (*no observed effect concentration*) eingesetzt wurden (Witte und Jacobi, 1995; Lüken, 2000; Stoßberg, 2000).

Andererseits zeigen Untersuchungen, daß Pyrethroide allein oder in Kombination mit Übergangsmetallen typische Radikalschäden, wie sie auch durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugt werden, hervorrufen (Kale *et al.*, 1999; Zenker, 1996). So induzierte S-Bioallethrin in Anwesenheit von Cu(II) Strangbrüche in isolierter DNA, die auf Bildung von Hydroxyl-Radikalen zurückgeführt wurden (Zenker, 1996). Eine Einzeldosis (0,001 % LD<sub>50</sub>) der Pyrethroide Cypermethrin und Fenvalerat verursachten in Erythrozyten von Ratten eine verstärkte Lipidperoxidation (LPO), wobei eine Zunahme von ROS angenommen wurde (Kale *et al.*, 1999).

Die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und der damit ausgelöste oxidative Streß wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht, da er als wesentlicher Faktor bei der Entstehung und Progression vieler Krankheiten gilt. Hierzu gehören u. a. Erkrankungen an Atherosklerose, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Krebs (Smith *et al.*, 1995; Simonian und Coyle, 1996; Feig *et al.*, 1994; Emerit, 1994). Unter reaktiven Sauerstoffspezies werden eine Vielzahl von Verbindungen zusammengefaßt, die sich vom molekularen Sauerstoff (O<sub>2</sub>) ableiten, aber im Vergleich zu O<sub>2</sub> sehr reaktionsfreudig sind. Die wesentlichen Vertreter sind Sauerstoffradikale wie Superoxid-Radikal-Anionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Hydroxyl-Radikale (<sup>•</sup>OH), Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>), Alkoxy-Radikale und Peroxy-Radikale. Relevant sind aber ebenfalls nichtradikalische Spezies wie Singulett-Sauerstoff, Peroxynitrit-Anionen (ONOO<sup>-</sup>), organische Peroxide und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Halliwell und Gutteridge, 1989; Radi *et al.*, 1991).

Zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) tragen sowohl physiologische Prozesse als auch Umweltschadstoffe bei. Die endogene, physiologische ROS-Bildung führt in der Regel nicht zu Schädigungen, da verschiedene protektive Schutzsysteme wie Antioxidantien (u. a. Tocopherole, Ascorbinsäure, Glutathion, Harnsäure), spezifische Enzyme (Superoxiddismutase (SOD), Katalase (Cat)) sowie Reparatursysteme zur Verfügung stehen (Halliwell und Gutteridge, 1989). Sind die antioxidativen Kapazitäten bzw. Schutzenzymfunktionen ausgeschöpft, so kann es zu oxidativem Streß kommen. Dies bedeutet eine Verschiebung des Verhältnisses - ROS-Produktion zu Abbau - zugunsten der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Sies, 1985). Als Folge können zyto- und genotoxische Schäden entstehen. Wird eine Zelle im Zustand des oxidativen Stresses zusätzlich mit ROS-bildenden Umweltchemikalien belastet, so kann postuliert werden, daß sich die Schädigung dieser Umweltchemikalie weit stärker auswirken wird, als auf eine Zelle ohne oxidativen Streß. Aus diesem Grunde muß durch die zelluläre Wechselwirkung zwischen ROS-Bildnern (z. B. Umweltchemikalien) und reaktiven Sauerstoffspezies mit Kombinationswirkungen gerechnet werden. In menschlichen Fibroblastenkulturen wurden synergistische genotoxische Kombinationswirkungen zwischen Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und einer Reihe von Umweltchemikalien beobachtet (Lüken, 2000).

In dieser Arbeit wurde das synthetische Pyrethroid S-Bioallethrin im Hinblick auf mögliche Toxizitätssteigernde Kombinationswirkungen mit ROS untersucht. Dabei wurde das toxische Potential von S-Bioallethrin allein und in Kombination mit oxidativem Streß ermittelt. Als Verursacher von oxidativem Streß wurde die Modellsubstanz Wasserstoffperoxid eingesetzt.

Im Organismus entsteht  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Reduktion von Sauerstoff über  $\text{O}_2^-$  in Anwesenheit von SOD oder bei nichtkatalysierten Reaktionen über Hydroperoxid-Radikale ( $\text{HO}_2^\cdot$ ). Das Superoxid-Radikal-Anion und Wasserstoffperoxid sind nur mäßig reaktiv gegenüber biologischen Molekülen. Im Gegensatz zum Superoxid-Radikal-Anion kann Wasserstoffperoxid durch die Zellmembran diffundieren und in der Zelle in Anwesenheit von reduzierenden Übergangsmetallen, hauptsächlich Eisen (II) und Kupfer (I), über die Fenton-Reaktion das hochreaktive Hydroxylradikal bilden (Halliwell und Gutteridge, 1989;1984; Dizdaroglu, 1992):



Hydroxylradikale können mit allen Bestandteilen der Zelle (Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und DNA) reagieren. Dabei verursachen sie in der DNA neben Einzel- und Doppelstrangbrü-

chen weitere Schädigungen (wie Depurinierungen, Depyrimidierungen und Modifikationen von Basen, Schädigungen der Desoxyribose (alkalilabile Stellen) und DNA-Protein-Vernetzungen), wenn keine zelleigenen Schutzmechanismen vorhanden sind (Fujimoto *et al.*, 1986; Halliwell und Aruoma, 1991; Dizdaroglu, 1992). Neben DNA-schädigenden Wirkungen haben  $\cdot\text{OH}$ -Radikale noch weitere Effekte auf zellulärer Ebene. Diese sind z. B. Enzyminaktivierung, Verminderung von Nikotinamidnucleotiden und Glutathion, Induktion und Propagation von Lipidperoxidation oder die Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels (Meneghini, 1988). Letztere können ihrerseits wieder über sekundäre Reaktionen die DNA schädigen.

Da  $\cdot\text{OH}$ -Radikale eine Vielzahl von DNA-Modifikationen erzeugen können, gelten sie als potentiell mutagen. Als promutagen zählen insbesondere 8-Hydroxyguanin, 5-Hydroxycytosin und DNA-Doppelstrangbrüche (Halliwell und Aruoma, 1991; Feig *et al.*, 1994a). 8-Hydroxyguanin kann zu Transversionen und 5-Hydroxycytosin zu Transitionen führen. Diese Punktmutationen besitzen ein kanzerogenes Potential (Halliwell und Aruma, 1991). Im HPRT-Test mit V79-Zellen wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Mutagenität von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beobachtet (Ziegler-Skylakakis und Andrae, 1987). ROS sind als Initiatoren und Progressoren von Krebserkrankungen (Feig *et al.*, 1994b; Emerit, 1994) und als Induktoren von Apoptose (programmierter Zelltod) beschrieben (Jacobson, 1996). Zelltod kann prinzipiell in zwei verschiedenen Formen auftreten, es wird zwischen Nekrose und Apoptose unterschieden (Kerr *et al.*, 1972; Thompson, 1995). Eine Behandlung mit geringen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen induziert z. B. in HL-60 Zellen (Leukämiezelllinie) Apoptose, wohingegen eine Behandlung mit höheren Konzentrationen Nekrose induziert (Slater *et al.*, 1995).

Über den Grund des Absterbens bzw. des Überlebens von Zellen wurde in den letzten Jahren, nicht zuletzt wegen der Ursachenforschung von Krankheiten und deren Behandlungsmöglichkeiten gearbeitet (Arends *et al.*, 1990; Indap und Rao, 1995; Kuo *et al.*, 1999; Wyllie *et al.*, 1999). Nekrose wird beispielsweise durch lytische Infektion oder extreme Streßsituationen (z. B. im Verlauf entzündlicher Prozesse, Hitzeschock, mangelnde Sauerstoffversorgung nach einem Schlaganfall oder hohe Dosen chemischer Stressoren wie Ethanol) ausgelöst (Hetts, 1998). Der Vorgang der Nekrose unterscheidet sich in grundlegender Weise vom geregelten aktiven Prozeß der Apoptose (programmierter Zelltod), ohne den höhere Lebensformen nicht existieren könnten.

Während der Embryonal-Entwicklung ist der programmierte Zelltod an den komplexen Umbau- und Differenzierungsvorgängen im Organismus beteiligt. Zellen, Gewebe oder Strukturen, die nicht mehr gebraucht werden, sterben ab. Der apoptotische Zelltod ist auch elementar bei der Entwicklung und Funktion des Immunsystems. Autoreaktive B- und T-Lymphozyten sterben durch Apoptose (Cohen, 1992). In transformierten Zellen kann unter Einwirkung bestimmter Faktoren (z. B. Tumor-Nekrose-Faktor) Apoptose induziert werden (Bellomo *et al.*, 1992). Im Nervensystem sterben Neuronen ab, die keinen korrekten interzellulären Kontakt zu anderen Nervenzellen aufgebaut haben (Kimura und Truman, 1990). Sie erhalten dabei keine für ihr Überleben benötigten neurotrophen Faktoren (z. B. NGF, BDNF, NT-3).

Die Bedeutung des programmierten Zelltodes für den gesamten Organismus wird besonders deutlich, wenn der Prozeß fehlreguliert wird. Eine Verstärkung sowie eine Inhibierung der Apoptose kann die Ursache von Krankheiten sein bzw. zu ihrer Verschlimmerung beitragen. Bei AIDS-Patientinnen und Patienten sterben beispielsweise in überhöhtem Maße T-Helferzellen apoptotisch ab (Raff, 1998). In einigen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, ALS (*amyotrophic lateral sclerosis*) und MS (*multiple sclerosis*) tritt ein verstärkter programmierter Zelltod auf (Isacson, 1993; Thompson, 1995). Durch Inhibierung der Expression des Tumorsuppressor-Gens p53 kann Apoptose verhindert werden bzw. es kann zu einer verstärkten Zellvermehrung kommen (Wyllie *et al.* 1999). Verschiedene Tumoviren sowie chemische Kanzerogene verhindern auf diese Weise die Einleitung des programmierten Zelltodes.

Beim Vorgang der Apoptose werden charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen durchlaufen, die sich klar vom nekrotischen Zelltod unterscheiden lassen (Kerr, 1971; McConkey *et al.*, 1990; Eastman *et al.*, 1994). Bei der Nekrose kommt es zu einer veränderten Membranpermeabilität. Dies führt zum Einströmen und einer intrazellulären Neuverteilung von Wasser. Das Endoplasmatische Retikulum dehnt sich aus, die innere Mitochondrienmembran schrumpft und die Proteinsynthese nimmt ab. Die anschließende irreversible Phase ist durch extremes Anschwellen der Mitochondrien gekennzeichnet. Durch die Lyse der Organellen und schließlich der Zelle selbst werden denaturierte Proteine und DNA-Fragmente in den interzellulären Raum freigesetzt und rufen *in vivo* entzündliche Reaktionen hervor (Bredesen, 1995). Im Gegensatz dazu kommt es während der Apoptose zu einer Verringerung des Zellvolumens. Die Zelle rundet sich ab und schrumpft (Vaux, 1993). Das Endoplasmatische Retikulum weitet sich und bildet Vesikel, die mit den Membranen ver-

schmelzen (Bläschenbildung der Plasmamembran). Das Chromatin bildet entlang der Kernmembran dichte halbmondförmige Aggregate (Chromatinkondensation) (Wyllie *et al.*, 1984). Es entstehen Einschnürungen in der Kernmembran, die schließlich zur Segmentierung des Zellkerns führen. Intensives *membrane blebbing* - die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen - ist an der Zytoplasmamembran zu beobachten. Schließlich beginnen membranumschlossene Vesikel (*apoptotic bodies*), sich von der Zelle abzuschnüren (Cohen, 1993). *In vivo* werden diese apoptotischen Körper von Makrophagen und den umgebenden Zellen phagozytiert. Dadurch bleiben lokale Entzündungsreaktionen aus. In Zellkultur folgt zu einem spätern Zeitpunkt die Lyse der apoptotischen Körper, die auch als sekundäre Nekrose bezeichnet wird. Die Zytoplasmamembran bleibt bis zu diesem Zeitpunkt funktionell intakt.

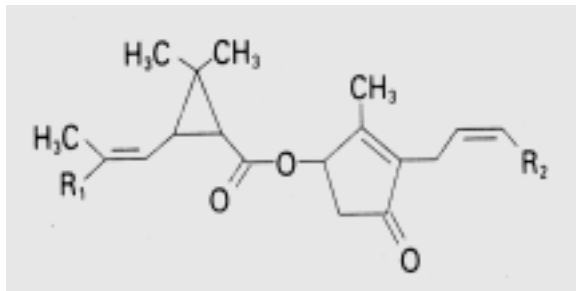
Biochemisch kommt es bereits zu Beginn der Apoptose zu charakteristischen Veränderungen. So wird in der Membran Phosphatidylserin, das normalerweise auf der zytoplasmatischen Membranseite lokalisiert ist, auf die extrazelluläre Seite verlagert (Martin *et al.*, 1995). Im Zellkern werden spezifische calcium- und magnesiumabhängige DNAsen aktiviert, welche die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke, von stets dem Vielfachen einer Einheit von ca. 180 Basenpaaren (bp), zerschneiden. Diese Fragmentlängen entstehen, da nur zwischen den Nucleosomen angegriffen werden kann. Diese Bruchstücke werden durch elektrophoretische Auftrennung im Agarose-Gel sichtbar und als apoptotische „DNA-Leiter“ bezeichnet (Walker und Sikorska, 1994).

Der apoptotische Prozeß untergliedert sich in eine Induktionsphase, Effektorphase und Degradationsphase (Kroemer *et al.*, 1995). In jeder dieser Phasen werden bestimmte Proteine aktiviert bzw. deaktiviert. In der Induktionsphase wird in der Zelle durch physiologische Signale (z. B. Mangel an trophischen Faktoren) oder Streßinduktion (z. B. durch Staurosporin oder Wasserstoffperoxid) der programmierte Zelltod eingeleitet. Wie stark die Signale bzw. der Streß sein müssen, um Apoptose zu induzieren, hängt von dem physiologischen Zustand der Zelle und dem Zelltyp ab. In der Effektorphase konvergieren die Apoptose-induzierenden-Signalwege und es wird der Punkt überschritten, ab dem sich das Apoptose-Programm nicht mehr aufhalten läßt (*point of no return*) (Kroemer *et al.*, 1995). Während der Degradationsphase, die vom Zelltyp am vergleichsweise unabhängigsten abläuft, werden lebenswichtige Strukturen und Funktionen der Zelle gestört. Dabei treten die morphologischen Charakteristika der Apoptose auf.

Bei toxikologischen Untersuchungen von Chemikalien werden zunehmend die charakteristischen Merkmale von Apoptose in Zellkulturen nachgewiesen, da sie einen wichtigen Endpunkt bei der Beurteilung ihres Gefahrenpotential darstellen (Turco *et al.*, 2000). Durch eine Reihe von zytotoxischen Chemikalien, Xenobiotika oder ionisierende Strahlen, ist die Induktion von Apoptose nachgewiesen (Meng *et al.*, 1998; Tebourbi *et al.*, 1998; Hiraku und Kawanishi, 1996). Bei der Ermittlung des toxischen Potentials von Pyrethroiden ist eine Induktion von Apoptose derzeit für Deltamethrin beschrieben (Enan *et al.*, 1996; El-Gohary *et al.*, 1999; Wu und Liu, 2000). Deltamethrin induzierte in *in vivo*-Experimenten eine apoptotische Thymus-Atrophie (Enan *et al.*, 1996). In Thymuszellkultur führte eine Inkubation mit Deltamethrin zum Absterben von Zellen, was mit den *in vivo* Befunden übereinstimmt (Enan *et al.*, 1996). In Ratten führte die Behandlung mit Deltamethrin zum apoptotischen Zelltod des Hodengewebes. Dabei wurde ein Anstieg von ROS, in diesem Fall von Stickstoffmonoxid (NO), für die Induktion der Apoptose verantwortlich gemacht (El-Gohary *et al.*, 1999).

Synthetische Pyrethroide wie Deltamethrin oder S-Bioallethrin leiten sich chemisch von den natürlich vorkommendem Pyrethrinen ab, die aus verschiedener Chrysanthemenarten als Pyrethrum-Extrakt gewonnen werden. Die insektizide Wirkung von solchen Extrakten ist bereits seit Jahrhunderten bekannt. Das aus den getrockneten Blütenköpfen gewonnene natürliche Pyrethrum-Konzentrat besteht im wesentlichen aus sechs optisch aktiven Estern, der (+)-trans-Chrysanthemumsäure, bzw. (+)-trans-Pyrethrinsäure mit den Ketoalkoholen (+)-Pyrethrolon, (+)-Cinerolon oder (+)-Jasmolon (Abb. 1 A).

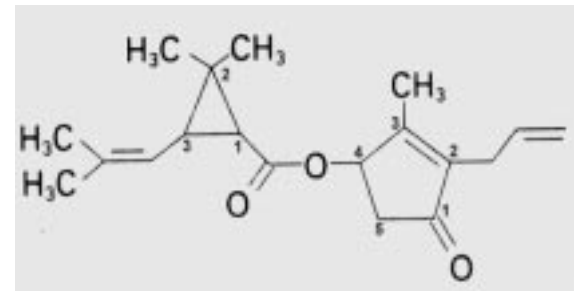
A) Pyrethrine im  
Pyrethrum-Extrakt  
(Struktur der Hauptwirkstoffe)

 $R_1$  $R_2$ 

Pyrethrin I:	-CH <sub>3</sub>	-CH = CH <sub>2</sub>
Pyrethrin II:	-COOCH <sub>3</sub>	-CH = CH <sub>2</sub>
Cinerin I:	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
Cinerin II:	-COOCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
Jasmolin I:	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Jasmolin II:	-COOCH <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

B) Allethrin

(acht unterschiedliche Stereoisomere)



z. B.

S-Bioallethrin = 1R trans, 4'S

**Abb. 1:** Strukturformeln der Hauptwirkstoffe des natürlichen Pyrethrum-Extraktes und Strukturformel des synthetischen Pyrethroids Allethrin.

Alle sechs Verbindungen sind lipophil, leicht oxidierbar, verlieren ihre Aktivität rasch in Gegenwart von Licht und Sauerstoff und sind gegen Feuchtigkeit und Alkalien empfindlich. Pyrethrum führt bei Insekten häufig zu einer reversiblen Bewegungslosigkeit („*knock down*“-Effekt) (Casida *et al.*, 1983). Eine tödliche Wirkung („*knock out*“-Effekt) wird erst durch synergistisch wirkende Substanzen, wie Piperonylbutoxid oder Organophosphate, erreicht (Gaughan *et al.*, 1980).

Mit der Aufklärung der chemischen Strukturen der Hauptwirkstoffe des Pyrethrums 1912 durch Ruzicka und Staudinger (Staudinger und Ruzicka, 1924) begann die Synthese strukturell ähnlicher und persistenterer Verbindungen, den sogenannten Pyrethroiden. Allethrin, das erste synthetische Pyrethroid, wurde 1949 durch Schechter *et al.* (1949) synthetisiert und entspricht annähernd dem Allyl-Homologen des natürlichen Cinerin I. (Abb. 1 B). Allethrin ist eine Mischung aus acht unterschiedlichen Stereoisomeren (drei chirale Zentren), wobei S-Bioallethrin (1 R trans, 4'S-Konfiguration) eines dieser Isomere darstellt. Die Bezeichnung Bioallethrin beruht allein auf der Tatsache, daß die 1 R trans-Konfiguration eine höhere insektizide Wirkung als das 1 R cis-Analogon besitzt und damit die biologisch aktivere Verbindung darstellt. S-Bioallethrin ist photolabil und wird häufig in Innenräumen zur Bekämpfung von Fliegen, Moskitos, Ameisen u. a. Hygieneschädlingen eingesetzt (Casida *et al.*, 1983). Dagegen sind Pyrethroide mit halogeniertem Alkylcyclopropan-säure-3-phenoxy-benzylester



(z. B. Cypermethrin oder Deltamethrin) persistent genug, um in der Land- und Forstwirtschaft gegen Pflanzen- und Holzschädlinge eingesetzt zu werden (Mestres und Mestres, 1992).

Synthetische Pyrethroide unterscheiden sich bezüglich ihrer funktionellen Gruppen zum Teil erheblich voneinander. Trotz der molekularen Unterschiede zeigen Untersuchungen, daß bei allen Verbindungen hauptsächlich der spannungsabhängige Natrium-Kanal in der neuronalen Zellmembran den Wirkort von Pyrethroiden darstellt. Dabei kommt es zu einer reversiblen stereospezifischen Interaktion mit Rezeptormakromolekülen (Narahashi, 1992). Dies führt zu einer Verlängerung des physiologischen Natrium-Influsses während der Erregungsphase. Es kommt zu repetitiven Entladungen, die zu wiederholten Nervenimpulsen von kurzer Dauer und damit zu einer erhöhten Aktivität in sensiblen Rezeptoren, sensorischen afferenten Nervenfasern und motorischen Endplatten führen (Vijverberg und van der Bercken, 1982; 1990).

Bei tierexperimentell erzeugten akuten Vergiftungen führen Typ-I-Pyrethroide (ohne Cyano-Gruppe) und Pyrethrum zum sogenannten T-Syndrom mit Tremor, Ataxie, erhöhter Erregbarkeit und Überempfindlichkeit gegenüber äußeren Reizen. Typ II-Pyrethroide (mit Cyano-Gruppe) bewirken das sogenannte CS-Syndrom mit Choreoathetose (neuromuskuläre Funktionsstörung), Salivation (erhöhter Speichelfluß), Tremor und Krämpfen (Verschoyle und Aldridge, 1980). Akute Pyrethroidvergiftungen bei hohen Pyrethroidkonzentrationen führen beim Menschen zu einer ähnlichen Symptomatik wie im Tierexperiment (Poulos *et al.*, 1982; He *et al.*, 1989; Wax und Hoffman, 1994). Häufiger treten jedoch Belastungen durch geringe Pyrethroidkonzentrationen auf, wobei Gesundheitsstörungen wie Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit, Schwäche usw. beobachtet wurden. Chronische Schäden scheinen dabei nicht aufzutreten (Le Quesne, 1980; Fusia *et al.*, 1987; Kalter *et al.*, 1987). Es wurden jedoch Befürchtungen geäußert, daß die durch Pyrethroide erzeugten peripheren sensorischen Störungen möglicherweise zu klinischer Neurophathie führen könnten, demzufolge als frühe Zeichen der Neurotoxizität und daher als Frühwarnung interpretiert werden sollten (Vijverberg und van der Bercken, 1990; Maroni und Fait, 1993).

Zur Problematik einer möglichen irreversiblen Schädigung von Nervengewebe sind eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden. Diese zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Toxikologische Untersuchungen an adulten Ratten ergaben keine Hinweise auf irreversible morphologische Veränderungen des peripheren Nervensystems (Aldridge, 1990). Lediglich Pyrethroidintoxikationen hoher subletaler Dosen führten zu morphologisch sichtbarer axona-

ler Degeneration (Appel und Michalak, 1994). Niedrigere chronische Dosen wurden von adulten Versuchstieren ohne morphologische Nervenschäden toleriert (Vijverberg und van der Bercken, 1982; Bradbury und Coats, 1989). Wiederholte orale Gaben subletaler Dosen von Permethrin, Cypermethrin und Deltamethrin führen bei Ratten in gleicher Weise wie die einmalige Applikation zu einem Anstieg der  $\beta$ -Glucuronidase und  $\beta$ -Galaktosidase im *nervus ischiadicus* und *nervus tibialis*. Eine vermutete ursächliche Beziehung zwischen dem Anstieg der Enzymaktivitäten und der Induktion funktioneller Störungen konnte dabei nicht festgestellt werden (Appel und Gericke, 1993). Bei neonataler Intoxikation wurden irreversible Schäden im ZNS durch die Pyrethroide Bioallethrin und Deltamethrin nachgewiesen (Eriksson und Fredriksson, 1991; Eriksson *et al.*, 1993; Johansson, 1995). Die Schäden wurden an adulten Mäusen festgestellt, wenn die Stoffe neonatal appliziert wurden, oder wenn bei den Versuchstieren eine neonatale Vorschädigung durch andere Noxen bereits gesetzt war und den erwachsenen Tieren subtoxische Pyrethroiddosen verabreicht wurden. Somit könnte bei Neugeborenen und Kleinkindern, die sich in einer Phase schnellen Gehirnwachstums befinden, eine Pyrethroidexposition möglicherweise zu irreversiblen Schäden führen.

Pyrethroide beeinflussen nicht nur die Natriumkanäle im Nervensystem, es werden auch GABA-Rezeptoren und die Calcineurin-Wirkung inhibiert, was wiederum zu Störungen im ZNS führt (Narahashi *et al.*, 1995; Fakata *et al.*, 1998). Neben den beschriebenen neurotoxischen Effekten induzieren einige Pyrethroide (Cypermethrin, Permethrin und Fenvalerat) mikrosomale Leberenzyme (Abernathy *et al.*, 1973). Pyrethroide wirken auf membrangebundene Enzyme wie ATPasen und auf die Monoaminoxidase A (MAO-A) (Jones und Lee, 1986; Rao und Rao 1993). Immunsuppressive Wirkungen durch Pyrethroide wurden ebenfalls gefunden (Madsen *et al.*, 1996).

Das mutagene Potential von Pyrethroiden wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Basierend auf genotoxischen Studien kann bis heute keine eindeutige Aussage getroffen werden. Es gibt auf der einen Seite negative Befunde in Mutagenitätstests in Bakterienkulturen und Säugern (Pluijmen *et al.*, 1994). Auf der anderen Seite induzieren Pyrethroide Chromosomen-Aberrationen, Schwesterchromatid-Austausch und Mikrokerne in Säugerzellkulturen und menschlichen Zellkulturen (Puig *et al.*, 1989; Surrallés *et al.*, 1990; Barrueco *et al.*, 1992, 1994; Surrallés *et al.*, 1995). Im Tierversuch verursachte Deltamethrin nach oraler oder intravenöser Gabe Mikrokerne im Knochenmark von Ratten und Mäusen (Agarwal *et al.*, 1994; Gandhi *et al.*, 1995). Bioallethrin wirkte ohne metabolische Aktivität gering mutagen in TA

100 und TA 98 Stämmen von *S. typhimurium*. (Sumer *et al.*, 1990). Aufgrund der vorliegenden Mutagenitätsergebnisse kann kein kanzerogenes Potential von Pyrethroiden abgeleitet werden.

Pyrethroide werden durch Carboxyl-Esterasen hydrolytisch und zu einem geringen Teil durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen metabolisiert. Als wesentliche Metaboliten entstehen Cyclopropan-carbonsäureverbindungen, 3-Phenoxybenzylalkohol, 3-Phenoxybenzylaldehyd und 3-Phenoxybenzoesäure (Elliotte *et al.*, 1972; Yamamoto und Casida, 1966). Mit Ausnahme des im Fenvalerat-Metabolismus entstehenden Chlorphenyl-methyl-Buttersäure-Cholesterinesters konnte für die genannten Metaboliten keine toxische Wirkung nachgewiesen werden (Morisseau *et al.*, 1999). Die Eliminierung der Metaboliten erfolgt nach Konjugation (als Glucuronid-, Glycin-, Taurin-, Sulfat- und Glutamat-Konjugate) zum Teil über Urin und die Faeces. Geringe Mengen werden als CO<sub>2</sub> über die Lungen abgeatmet (Appel und Gericke, 1993). Trans-Isomere werden dabei im allgemeinen schneller abgebaut als cis-Isomere (Eadsforth und Baldwin, 1989). Die Metabolisierung von Pyrethroiden kann jedoch bei sich entwickelnden Organismen (z. B. Säuglingen) unvollständig verlaufen, da das enzymatische Entgiftungssystem (z. B. Esteraseaktivität) noch nicht vollständig entwickelt ist (Bickmeyer *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 1995). Bei adulten Ratten betrug die biologische Halbwertszeit aus Plasma, Leber und Gehirn zwischen 7 und 55 Stunden (Appel und Michalak, 1994). Im Fettgewebe verweilen Pyrethroide jedoch bedeutend länger. Hier konnten Halbwertszeiten von mehr als 20 Tagen beobachtet werden (Appel und Michalak, 1994). Das könnte auch bei der Eliminierung aus lipophilen Teilen des Gehirns, insbesondere des lipidreichen Myelins, bedeutend sein. Da es sich bei den vorliegenden Versuchen um einmalige Applikationen handelt, könnte eine mehrmonatige oder wiederholte Exposition gegenüber Pyrethroiden zu einer Anreicherung in diesen Teilen des Gehirns führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht inwieweit oxidativer Streß die toxische Wirkung von S-Bioallethrin erhöht. Zur Erzeugung von oxidativem Streß wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingesetzt. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen wurden variiert und die Umweltchemikalie in Konzentrationen eingesetzt, die noch keine sichtbaren Schäden hervorriefen (NOEC). Dabei wurden folgende Toxizitätsparameter untersucht:

a) Zytotoxizität (der Einzel- und Kombinationswirkung):

- Bestimmung der akuten Toxizität (Zellvitalität)
- Bestimmung der Toxizität nach 21 Stunden Erholungsphase (Zellvitalität)

- Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit
- Bestimmung des Zellwachstums
- Induktion von Lipidperoxidation

b) Genotoxizität (der Einzel- und Kombinationswirkung):

- Induktion von DNA-Schäden und Bestimmung von deren Persistenz

c) Zelltodbestimmung:

- Untersuchungen zur Induktion von Apoptose

c) Nachweis und Charakterisierung von DNA-Schäden *in vitro*:

- Untersuchungen direkter Wechselwirkungen zwischen S-Bioallethrin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an isolierter PM2 DNA

Zur Untersuchung von Zell-Schäden wurde eine nicht spezialisierte Zelllinie menschlicher Fibroblasten mit spezialisierten Gliazellen (Astrozyten) verglichen. Letztere sollten Aufschluß über die neurotoxische Wirkung von S-Bioallethrin in Abhängigkeit von oxidativem Streß geben. Die Bedeutung von Astrozyten im ZNS ist vielfältig, so hat ein möglicher Schaden von Astrozyten unmittelbaren Einfluß auf das Überleben von Neuronen. Astrozyten produzieren u. a. neutrophile Faktoren (Labourdette und Sensenbrenner, 1995) und können direkt mit Neuronen wechselwirken (Nedergaard, 1994). Darüber hinaus induzieren Gliazellen, wie Astrozyten und Mikroglia, nicht aber Neuronen, die Expression von Häm-Oxygenase-1, welches Biliverin produziert. Es gilt als endogenes Antioxidans nach neurodegenerativen *insults* (Kitamura *et al.*, 1998) oder von Kainatsäure (Matsuoka *et al.*, 1998). Gliazellen sind im Vergleich zu Neuronen relativ widerstandsfähig gegenüber oxidativem Streß. Extensiver oxidativer Streß in Gliazellen führt jedoch auch zum apoptotischen Zelltod (Kitamura *et al.*, 1999). In Oligodendrozytenkulturen des Rattenhirns konnte eine durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Apoptose nachgewiesen werden (Richter-Landsberg und Vollgraf, 1998; Vollgraf *et al.*, 1999).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinie und Primärkultur

##### *Zelllinie:*

GM 05757: Primäre menschliche Hautfibroblasten (Abkürzung N57), NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, N. J., USA.

Die Zellen wurden entsprechend den Vorschriften von Hessling *et al.* (1980) regelmäßig auf Mycoplasmenkontaminationen untersucht.

##### *Primärkultur:*

Gliazellen: Astrozyten gewonnen durch Präparation der cerebralen Hemisphäre von ein bis zwei Tage alten Ratten (Wistar) und anschließender Aufbereitung nach Richter-Landsberg und Heinrich (1995), mit freundlicher Überlassung von Prof. Dr. Richter-Landsberg.

#### 2.1.2 Geräte

Brutschrank: Heraeus Typ B5060 EK-CO<sub>2</sub>

Cleanbench: Heraeus Lamin Air HLBC 2472 GS

Coulter-Counter: Coulter Electronics LTD. Luton, BEDS, London

Kamera: Polaroid MP-4 Land Camera mit Film Polaroid Typ 667

Elektrophoresegeräte: LKB Bromma 2197 Power Supply; Pharmacia EPS 500; Consort E 835; LTF Labortechnik

Elektrophoresekammern: Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-200 Pharmacia Fine Chemicals; Biorad DNA Sub Cell™

Eliser-Scanner: Bio-Rad Modell 450 Microplate Reader

Gewebekulturflaschen: Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Gewebekulturschalen: Nunc, Wiesbaden

Gelauswertesystem: Bio Image, Intelligent Quantifier™, Version 2.5

Mikrowelle: MMoulinex 1100 W, Micro-Chef FM B535

Spektralphotometer: Fluoreszenzphotometer: Shimadzu Spectrofluorometer RF-540, Kyoto, Japan; Hitachi 220 Spektralphotometer; Spectralphotometer Pharmacia Biotech Gene Quant 2

Transilluminator: Biometra TFL-20 M, 312 nm, Biometra, Göttingen

Ultraschallbad: Sonorex RX 255 Transistor, Brandelin, Berlin

Ultraschallgerät: Branson Sonifier® Cell Disrupter B-15p, Branson, Genf  
Zellkultur-4-Kammer-Objekträger aus Glas: Lab-Tek, Nunc, Wiesbaden  
Zentrifugen: Tischzentrifuge, Eppendorf, Modell 5414; Tischzentrifuge, Hettich

### 2.1.3 Chemikalien

Alle eingesetzten Chemikalien hatten den kommerziell höchst erhältlichen Reinheitsgrad. S-Bioallethrin und Pyrethrine wurden unter Sauerstoffausschluß (unter Argonatmosphäre) bei 4 °C gelagert.

Agarose: SeaKem® LE Agarose: FMC Bio Products, Rockland, USA; LMP-Agarose: Sea  
Plaque® GTG Agarose: FMC Bio Products, Rockland, USA

Aminosäuren: Seromed® Biochrom, Berlin

Ampuwa-Wasser: Steril und phyrogenfrei, Fresenius AG, Bad Homburg

BCA-Na<sub>2</sub>: Dinatriumsalz der 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Bichinoninsäure), >99 %,  
Fluka, Buchs, Schweiz

BHT: 2,6-Di-tert-butyl-p-kresol, >99 %, Fuka, Buchs, Schweiz

Borsäure: Fluka, Buchs

n-Butanol, p. a.: >99 %, VEB Laborchemie, Apolda

Bromphenolblau: Sigma, Deisenhofen

Calciumchlorid: Merck, Darmstadt

Chlorophorm: Merck, Darmstadt

Cremophor EL: Ein Derivat des Rizinusöls und Ethylen-oxid, Sigma Chemicals Company,  
USA

N,N-Dimethylformamid: Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

DABCO (1,4-Diazabicyclo(2-2-2)-Octan: Sigma, Deisenhofen

DAPI (4',6-Diamindin-2'-phenylindol-dihydrochlorid: Boehringer, Mannheim

„DNA-Leiter“: 1 kb-Ladder: Gibco BRL

Dimethylsulfoxid (DMSO): Sigma, Deisenhofen

Dinatriumhydrogenphosphat: Merck, Darmstadt

Dulbeccos modified eagles medium (DMEM, Gibco)

Essigsäure 80 %ig: Scharlau, Barcelona

Ethanol p. a.: Riedel de Haën AG, Seelze

Ethidiumbromid: Sigma, Deisenhofen

Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz (EDTA): Sigma, Deisenhofen

Fötale Kälberserum: Boehringer, Mannheim

Ficoll: Sigma, Deisenhofen

Formaldehyd: J. T. Baker, Deventer, Niederlande

Glucose-1-hydrat: Merck, Darmstadt  
Glycerin: Sigma, Deisenhofen  
8-Hydroxy-Chinolin: Sigma, Deisenhofen  
Isoamylalkohol: Sigma, Deisenhofen  
Kaliumdihydrogenphosphat: Merck, Darmstadt  
Kristallviolett: Merck, Darmstadt  
Kupfer-(II)-sulfat-pentahydrat: 99 %, Sigma, Deisenhofen  
Magnesiumchlorid: J. T. Baker, Deventer, Niederlande  
Magnesiumsulfat: J. T. Baker, Deventer, Niederlande  
Minimum Essential Medium (MEM): Seromed® Biochrom, Berlin  
Natriumcarbonat: Sigma, Deisenhofen  
Natriumdihydrogenphosphat: Merck, Darmstadt  
Natriumdodecylsulfat (SDS): Riedel de Haën AG, Seelze  
Natriumhydrogencarbonat: Riedel de Haën AG, Seelze  
Natriumhydroxid: Riedel de Haën AG, Seelze  
Natriumlaurylsarkosinat: Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA  
Natriumtartrat: Sigma, Deisenhofen  
Penicillin/Streptomycin: Seromed® Biochrom, Berlin  
PM2 DNA: Eigenherstellung in Anlehnung an Espejo *et al.* (1969)  
Poly-L-Lysin Hydrobromid: Sigma, Deisenhofen  
Pyrethrine: Pestanal®, technisches Gemisch, 49 %, Riedel de Haën AG, Seelze  
Rinderserumalbumin (BSA): Boehringer, Mannheim  
RNase Typ I-AS: Sigma, Deisenhofen  
Roti-Phenol: Roth, Karlsruhe  
Salzsäure 37 %ig: Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz  
S-Bioallethrin: Pestanal®, >98 %, Riedel de Haën AG, Seelze  
Staurosporin: Boehringer, Mannheim  
TEP (1,1,3,3-Tetraethoxypropan) oder (Malonaldehydbis[diethylacetal]), >97 %, Sigma, St. Louis, USA  
Tetrazoliumbromid (MTT): Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA  
2-Thiobarbitursäure (TBA): (4,6-Dihydroxypyrimidin-2-thiol), >98 %, Sigma, St. Louis, USA  
6-Thioguanin (TG): Sigma, Deisenhofen  
Trichloressigsäure (TCA) p. a.: Sigma, Deisenhofen  
Tritiplex III (EDTA): Merck, Darmstadt  
Tris ((Tris-hydroxymethyl)-aminomethan): Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg  
Triton X-100: Serva, Heidelberg  
Trypsin: Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco, Cat. No. 043-05400), Serva, Heidelberg  
Vitamine: Seromed® Biochrom, Berlin  
Wasserstoffperoxid, 35 wt %, Acros Organics, New Jersey, USA

### 2.1.4 Zellkulturmedien

Die Kultivierung der menschlichen Fibroblasten erfolgte in Ampuwa-Wasser gelösten *minimum essential medium* (MEM). Dieses Medium wurde mit 1,05 % Vitaminlösung, 7,5 %ige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren angereichert und steril filtriert. Dann erfolgte die Zugabe von 100 E/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin sowie 12 % (Fibroblasten) oder 5 % (V79) fötalem Kälberserum. Das Medium wurde bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Serumfreies Medium wurde wie das serumhaltige Medium, aber ohne Zusatz von fötalem Kälberserum und Antibiotika angesetzt.

Die Kultivierung der Astrozyten erfolgte in DMEM, mit der freundlichen Überlassung von Prof. Dr. Richter-Landsberg. Dazu wurden 70 g DMEM und 18,5 g  $\text{NaHCO}_3$  auf 5 Liter Aqua bidest. gelöst und anschließend steril filtriert. Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) sowie das hitzeinaktivierte FCS (10 % FCS als Wachstumsmedium, 0,5 % als Differenzierungsmedium) wurden dem Medium erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

### 2.1.5 Allgemeine Lösungen und Puffer

Natriumphosphatpuffer:

100 mmol/l/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

100 mmol/l/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

PBS (phosphate buffered saline), ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei), pH 8,4:

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1,44 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Poly-L-Lysinlösung:

1 mg Poly-L-Lysin in 1 mL Aqua bidest. (Stammlösung)

50  $\mu\text{g/ml}$  (Gebrauchslösung)

Saline A, pH 7,2:

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1 g/l Glucose-1-hydrat

0,35 g/l  $\text{NaHCO}_3$

Trypsinlösung (0,125 %):

8 g/l NaCl



0,2 g/l KCl  
0,2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1,15 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
1,25 g/l Tritriplex III  
1,25 g/l Trypsin  
0,1 g/l  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
0,2 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

### 2.1.6 Lösungen und Puffer der einzelnen Methoden

#### *DNA-Fragmentierung („DNA-Leiter“)*

Agarosegel:

1,5 %iges Agarose in TBE-Puffer

Auftrags-Puffer:

15 mmol/l EDTA

2 % SDS

0,5 % Bromphenolblau

50 % Glycerin

Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung:

48 ml Chloroform wurden mit 2 ml Isoamylalkohol versetzt (24:1).

1kb-DNA-Ladder:

Die DNA-Ladder wurde mit Auftrags-Puffer (ohne SDS) auf 40 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt.

EDTA-Puffer, pH 7:

0,5 mol/l in Aqua bidest.

NaCl-Lösung:

5 mol/l in Aqua bidest.

Lysis-Puffer:

100  $\mu\text{l}$  1 mol/l Tris

600  $\mu\text{l}$  20 % SDS

400  $\mu\text{l}$  0,5 mol/l EDTA

8,9 ml Aqua bidest.

PBS-Puffer:

siehe Puffer allgemein

Phenol-Lösung:

In 50 ml TE-gesättigtes Phenol wurde 40 mg 8-Hydroxy-Chinolin gelöst.

RNAse-Lösung:

10 mg RNase wurden in 1 ml Tris-NaCl gelöst. Diese Lösung wurde zur DNase-Inaktivierung 15 min gekocht. Anschließend wurde die Lösung langsam bei Raumtemperatur abgekühlt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 20 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20 °C gelagert. Vor der Verwendung der RNase wurde das 20 µl Aliquot mit Tris-NaCl auf 1 ml aufgefüllt.

SDS-Lösung, 20 %:

10 g SDS in 50 ml Aqua bidest.

10 x TBE-Puffer (Trisborat EDTA-Elektrophorese-Puffer), pH 8,2:

890 mmol/l Tris

890 mmol/l Borsäure

20 mmol/l EDTA

TBE-Gebrauchspuffer, pH 8,2:

1:10-Verdünnung des 10 x TBE-Puffers mit Aqua bidest.

TE-Puffer, pH 8:

10 mmol/l Tris, in Aqua bidest., pH 8

1 mmol/l EDTA, in Aqua bidest., pH 8

Tris-NaCl-Lösung:

10 mmol/l Tris in Aqua bidest., pH 7,5

15 mmol/l NaCl in Aqua bidest.

Tris-Puffer, pH 8:

1 mol/l in Aqua bidest., pH-Einstellung mit HCl

### *Koloniebildungsfähigkeit*

Formaldehydlösung:

4 % (w/v) in Aqua dest.

Kristallviolettlösung:

5 g/l Kristallviolett in Aqua dest.

Saline A, pH 7,2:

siehe Lösungen allgemein

### *Kometen-Assay*

Elektrophoresepuffer-Stammlösung:

10 mol/l NaOH (80 g NaOH/200 ml Aqua dest.)

0,2 mol/l EDTA (14,89 g EDTA/200 ml Aqua dest.)

Elektrophorese-Gebrauchspuffer, pro Liter:

30 ml 10 mol/l Natronlauge

5 ml EDTA-Lösung

Ethidiumbromid-Stammlösung:

2 mg/ml in Aqua dest.

Ethidiumbromid-Gebrauchslösung:

2 µg/ml in Aqua dest.

Lyse-Stammlösung, pH 10:

146,1 g NaCl

37,2 g EDTA, pH-Einstellung mit NaOH-Plätzchen

1,2 g Tris

10 g Na-Laurylsarkosinat (1 %)

mit Millipore®-Wasser auf 890 ml aufgefüllt

Lyse-Gebrauchslösung, 100 ml:

1 ml Triton X-100

10 ml DMSO

89 ml Lyse-Stammlösung

Neutralisationspuffer, pH 7,5:

48,5 g/l Tris, ph-Einstellung mit rauchender HCl

PBS-Puffer:

siehe Puffer allgemein

### *Lipidperoxidation*

BHT-Lösung:

2 % (w/v) in Ethanol, p. a.

BCA-Reagenz A, pH 11,25:

10 g/l BCA-Na<sub>2</sub>

20 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> x H<sub>2</sub>O

1,6 g/l Na<sub>2</sub>-tatarat

4 g/l NaOH

9,5 g/l NaHCO<sub>3</sub>

BCA-Reagenz B:

40 g/l CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O

BCA-Arbeitsreagenz:

100 + 2 BCA-Reagenz A + BCA-Reagenz B

BSA-Stammlösung:

20 mg/ml in 3 % SDS

Malondialdehyd-Stammlösung (aus TEP, 1,1,3,3-Tetraethoxypropan):

10 mmol/l in 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Malondialdehyd-Standardlösung:

2 µmol/l in Millipore®-Wasser

Saline A:

siehe unter Lösungen allgemein

Thiobarbitursäure-Reagenz (TBA-Reagenz):

0,67 % (w/v) in 10 % Trichloressigsäure (TCA)

#### *MTT-Assay*

MTT-Lösungen:

5 mg MTT/ml PBS-Puffer (Stammlösung)

1:5 Verdünnung der MTT-Stammlösung in serumhaltigen Medium

SDS-Lysepuffer, pH 4,7:

pH-Einstellung mit:

20g SDS in

25 ml Essigsäure (80 %)

500 ml N,N-Dimethylformamid

25 ml HCl (1 mol/l)

500 ml Ampuwa

Solubilisierungslösung: (für Astrozyten)

10 % SDS in 0,1 mol/l HCl

#### *PM2 DNA*

Agarosegel:

0,5 % iges Agarose in Elektrophoresepuffer

Abstopperlösung:

10 % Ficoll

0,02 % Bromphenolblau

25 % DMSO in Aqua dest.

Elektrophorese-Puffer (10fach konzentriert), pH 8,4:

890 mmol/l Tris-HCl

890 mmol/l Borsäure

31,9 mmol/l EDTA

Entfärbelösung:

1 mmol/l MgCl<sub>2</sub> in Aqua dest.

Gel-Färbelösung:

2 mg/l Ethidiumbromid in Aqua dest.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Zellen

#### 2.2.1.1 Menschliche Fibroblastenkultur

Die Kultivierung der primären menschlichen Fibroblasten der Zelllinie N57 erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 95 %iger Luftfeuchtigkeit. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in MEM (*minimum essential medium*), das bei den N75-Zellen mit

12 % (v/v) fötalem Kälberserum angereichert wurde. Zur Weiterkultivierung wurde das serumhaltige Medium abgesogen und die Zellen mit 0,125 %iger Trypsinlösung behandelt. Das Absaugen der Trypsinlösung erfolgte nach 20-30 Sekunden. Nach 3-5 Minuten bei 37 °C nahmen die N57-Zellen eine kugelige Gestalt an, lösten sich vom Flaschenboden und konnten in serumhaltigen Medium aufgenommen werden. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden je nach Bedarf weiterkultiviert oder für die Experimente ausgesät. Es wurden primäre Hautfibroblasten aus der 9.-16. Passage verwendet.

#### 2.2.1.2 Primäre Astrozyten aus dem Rattenhirn

Es wurden Astrozyten verwendet, die aus einer gemischten Glia-Vorkultur durch mechanische Abschüttlung weitgehend frei von Oligodendrozyten waren. Dabei wurden Kulturen der zweiten bis vierten Abschüttlung verwendet. Die Kultivierung der Astrozyten erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 95 %iger Luftfeuchtigkeit. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (*dulbecco's modified eagels medium*), das mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum angereichert wurde. Zur Weiterkultivierung der Zellen wurde alle drei bis vier Tage ein Mediumwechsel vorgenommen. An den Versuchstagen wurden die Zellen mit Trypsin überschichtet und ca. drei Minuten inkubiert. Dann wurden die Zellen in ein Röhrchen mit DMEM/10% FCS überführt und fünf Minuten bei 1000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und für die Versuche ausplattiert. Vor Schadstoffbehandlung wurden die Zellen zur weiteren Differenzierung für 3 Tage in DMEM/0,5% FCS kultiviert.

#### 2.2.2 Inkubation der Zellen mit den Schadstoffen

Die S-Bioallethrin-Stammlösung (100 mmol/l) wurde immer frisch und zu gleichen Teilen in DMSO und Cremophor gelöst. Zur Herstellung der Inkubationslösungen wurde die Stammlösung mit serumfreiem Medium verdünnt. Der Lösungsvermittler-Anteil betrug bei 1 mmol/l S-Bioallethrin insgesamt 1 %. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stammlösung (200 mmol/l) wurde in eiskaltem 100 mmol/l NaPO<sub>4</sub>-Puffer frisch angesetzt. Es wurde eine Zwischenverdünnung von 5 oder 10 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Puffer vorgenommen, bevor daraus die entsprechenden Mengen in die S-Bioallethrin-Inkubationslösungen pipettiert und direkt auf die Zellen gegeben wurden.

Vor der Schadstoffbehandlung wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und danach für eine Stunde mit den Schadstoffen behandelt. Anschließend wurden die Zellen nochmals zweimal gespült und entsprechend der unterschiedlichen experimentellen Endpunkte weiterbehandelt.

### 2.2.3 Zellvitalität (MTT-Assay)

Der MTT-Assay, modifiziert nach Hansen *et al.* (1989), erfaßt die Zellvitalität nach Schadstoffbehandlung anhand der Succinat-Dehydrogenaseaktivität in den Mitochondrienmembranen. Die Toxizität wird über die verminderte Aktivität des Enzyms gemessen. Das Tetrazoliumbromid (MTT) wird von intakten Zellen aufgenommen und dort von den Dehydrogenasen gespalten. Es entsteht das alkohollösliche dunkelblaue Formazan, das nach der Zelllyse freigesetzt und im Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden kann. Es wurde sowohl die toxische Wirkung direkt nach der Schadstoffinkubation ( $t_0$  = akute Toxizität), als auch nach einer Regenerationsphase in serumhaltigem Medium ( $t_{21}$  = *recovery phase*) gemessen.

#### *Fibroblasten*

Es wurden 8000 Zellen in 200  $\mu$ l serumhaltigem Medium pro *well* einer 96er Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz (3-4 Tage) kultiviert, und danach erfolgte die Behandlung mit den Substanzen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen vor Schadstoffbehandlung zweimal mit SFM gespült. Die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen erfolgte für eine Stunde bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit SFM gespült und entweder direkt oder nach einer Nachinkubation mit serumhaltigem Medium mit je 100  $\mu$ l/*well* einer frisch angesetzten MTT-Lösung für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß daran wurden 100  $\mu$ l/*well* SDS-Lysepuffer pipettiert. Die vollständige Lyse und das Lösen der Formazankristalle erfolgte über Nacht auf einem Schüttler (im Dunkeln, 37 °C). Am nächsten Tag wurde die photometrische Messung mit einem BioRad-Reader durchgeführt. Die Absorptionsmessung wurde bei 595 nm, mit einer Referenzwellenlänge von 655 nm, vorgenommen. Die Werte der Kontrollen entsprachen dabei 100 %. Der prozentuale Anteil der Stoffwechselaktivität der übrigen Proben wurde auf die Kontrollwerte bezogen. Für jede Konzentration wurden vier bis acht Parallelproben angesetzt.

#### *Astrozyten*

Die 96er Mikrotiterplatten wurden mit 50  $\mu$ l/*well* PLL ca. 30 Minuten beschichtet und anschließend zweimal mit 100  $\mu$ l PBS gespült. Danach wurden 50  $\mu$ l DMEM/10 % FCS in jedes *well* pipettiert und die Mikrotiterplatten für ca. eine halbe Stunde im Brutschrank vorinkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen für die Ausplattierung vorbereitet. Es wurden 2000 Zellen/*well* in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l DMEM/10 % FCS ausplattiert und über Nacht bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde das serumhaltige Medium in Abhängigkeit von der Zelldichte gewechselt und die Zellen mit DMEM/0,5 % FCS überschichtet. Nach drei Tagen in diesem Medium wurden die Zellen mit den Schadstoffen behan-

delt. Das Medium wurde abgesaugt, und die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen erfolgte für eine Stunde bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Danach wurden die Zellen einmal mit SFM gespült und entweder direkt oder nach einer Nachinkubation mit serumhaltigem Medium (0,5 % FCS) mit je 10 µl/well einer frisch angesetzten MTT-Lösung für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß daran wurden 100 µl/well Solubilisierungslösung dazupipettiert. Die vollständige Lyse und das Lösen der Formazankristalle geschah über Nacht im Brutschrank. Am nächsten Tag wurde die photometrische Messung mit einem BioRad-Reader durchgeführt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm, mit einer Referenzwellenlänge von 655 nm. Die Werte der Kontrollen entsprechen dabei 100 %. Der prozentuale Anteil der Stoffwechselaktivität der übrigen Proben wurde auf die Kontrollwerte bezogen. Für jede Konzentration wurden acht Parallelproben angesetzt.

#### 2.2.4 Koloniebildungsfähigkeit

Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden konfluent gewachsene Fibroblasten verwendet, die ca. drei Tage vor Versuchsbeginn in Petrischalen (Ø 5 cm) ausgesät wurden.

Nach den Schadstoffinkubationen wurden die Zellen durch Trypsinieren vom Boden der Petrischale abgelöst und pro Konzentration fünfmal 2000 Zellen (N57) je Petrischale (Ø 5 cm) ausgesät. Nach ca. zwei Wochen konnten die Kolonien "geerntet" werden. Sie wurden einmal mit Saline A gewaschen, für zehn Minuten mit 3,5 % Formaldehydlösung fixiert und anschließend mit Kristallviolettlösung angefärbt und gezählt. Die Koloniebildungsfähigkeit wurde in Prozent der Kolonien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

#### 2.2.5 Zellwachstum

Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte nach einer modifizierten, von Jacobi *et al.* (1995) beschriebenen Methode. Es wurden zwei Tage vor Schadstoffinkubation 18000 Zellen/well der Zelllinie N57 in sechser-Multischalen ausgesät. Für jede Konzentration wurden sechs Parallelproben angesetzt. Nach Beendigung der Schadstoffinkubation wurden die Proben zweimal mit Saline A gespült. Die eine Hälfte der Proben wurde mit serumhaltigem Medium im Brutschrank weiterinkubiert, während die andere Hälfte zum Ablösen der Zellen mit 500 µl Trypsinlösung versetzt wurde. Nach Abkuglung der Zellen wurde eine Zellsuspension mit 7,5 ml Saline A erstellt und im Coulter Counter gezählt (Ausgangszellzahl). Die nachinkubierten Zellen wurden nach 48 Stunden zweimal mit Saline A gespült, trypsiniert, in 7,5 ml Saline A aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (Endzellzahl). Die Zellteilungsrate (Z/48 h) wurde für jede eingesetzte Schadstoffkonzentration wie folgt berechnet:

$$Z/48 \text{ h} = \ln \frac{\text{Endzellzahl}}{\text{Ausgangszellzahl}} : \ln 2$$

Die Zellteilungsrate in den Kontrollen wurde jeweils gleich 100 % gesetzt und die Wachstumshemmung der Proben in bezug auf diese Kontrollen prozentual ausgedrückt.

### 2.2.6 DNA-schädigende Wirkung (Kometen-Assay)

Der Kometen-Assay dient zur Bestimmung von DNA-Schäden in einzelnen Zellen (Östling und Johanson, 1984; Fairbrain *et al.*, 1995). Es werden DNA-Schäden erfaßt, die entweder direkt zu Strangbrüchen führen oder über eine Alkalibehandlung in Einzelstrangbrüche überführt werden bzw. reparaturbedingte Strangbrüche sind. Desweiteren besteht die Möglichkeit, die Persistenz von DNA-Schäden zu bestimmen.

Die mit Schadstoff behandelten Zellen werden dabei verdünnt in Agarose auf Objektträger eingebettet, lysiert, alkali-behandelt und eine Elektrophorese durchgeführt. Die Objektträger werden angefärbt; so kann jede Zelle individuell mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden (Singh *et al.*, 1988). Während unter dem Fluoreszenzmikroskop der angefärbte Zellkern von ungeschädigter DNA als rundlicher Fleck (Zellkern) erscheint, wird geschädigte DNA aufgrund der zahlreichen kleinen DNA-Fragmente mit einem mehr oder weniger ausgeprägten Schweif ("Komet") sichtbar. Die Intensität (Helligkeit) des Schweifes hängt von dem Maß der DNA-Migration aus dem Kernbereich ab. Der Schweif ist umso länger, je kleiner die gebildeten DNA-Fragmente sind. Als Kriterium für die DNA-Schäden wird das Produkt aus prozentualem Anteil an DNA im Schweif und der Schweiflänge, als *tail moment* bezeichnet, angegeben.

#### *Durchführung*

Zunächst wurden die Objektträger mit einer Agarosebasalschicht (1,5 %ige Agaroselösung) versehen. Dafür wurde die Agarose in PBS-Puffer angesetzt, zweimal aufgeköcht, auf 60 °C abgekühlt und in einem Wasserbad bei dieser Temperatur aufbewahrt. Die Objektträger wurden kurz in die Agaroselösung getaucht, die Unterseite abgewischt und horizontal über Nacht an der Luft getrocknet.

Die Zellen (N57) wurden in Petrischalen (Ø 5cm) ausgesät und wie unter Abschnitt 2.2.2 beschrieben mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Schadstofflösungen anschließend abgesaugt, zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gespült (bei den Versuchen zur Messung der Persistenz wurde an dieser Stelle zweimal mit SFM gespült sowie eine Weiterkultivierung in serumhalti-



gen Medium vorgenommen und im Anschluß daran wie beschrieben verfahren) und zum Ablösen der Zellen mit 3 ml Trypsin behandelt. Nach 10 Sekunden wurde das Trypsin abgesaugt und die Zellen nach 5 Minuten bei 37 °C in 350 µl eiskaltem PBS-Puffer aufgenommen und resuspendiert.

Anschließend wurden je 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl LMP-Agarose (37 °C) vermischt, auf einen beschichteten Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Zum Auspolymerisieren der Agarose wurden die Objektträger für ca. 5 Minuten kühl gelagert. Danach wurden die Deckgläser entfernt und die Präparate abgedunkelt in frisch hergestellte Lyselösung in den Kühlschrank (für eine Stunde) gestellt. Nachfolgende Arbeitsschritte wurden bei gedämpftem Licht durchgeführt, um bei der freiliegenden DNA keine zusätzlichen Strangbrüche zu erzeugen.

Die Objektträger wurden anschließend aus der Lyselösung entnommen und in eine mit Eis gekühlte horizontale Elektrophoresekammer überführt. Dann wurde eiskalter, frisch angesetzter Elektrophoresepuffer in die Kammer gefüllt, so daß die Objektträger vollständig bedeckt waren. Die Proben wurden 40 Minuten im alkalischen Elektrophoresepuffer belassen. Die Alkalibehandlung (*alkaline unwinding*) führt zu einer Auftrennung der Doppelstränge in Einzelstränge, und zu einer Überführung der alkalilabilen Stellen in Einzelstrangbrüche. Erst diese kleineren DNA-Fragmente können im elektrischen Feld wandern. Anschließend wurde eine 20-minütige Elektrophorese bei 25 V und 300 mA durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Kammer genommen und mit Neutralisationspuffer überschichtet. Der Puffer wurde nach jeweils fünf Minuten zweimal erneuert, bevor die Träger in destilliertes Wasser getaucht und über Nacht getrocknet wurden.

Zur Auswertung wurden auf die Objektträger 50 µl Ethidiumbromidlösung [20 µg/ml] pipettiert und mit einem Deckglas versehen. Nach ca. 15 Minuten wurde die angefärbte DNA am Fluoreszenzmikroskop, das mit einem Anregungsfilter von 515-560 nm, einem Barrierefilter von 590 nm, einer Kamera und der entsprechenden Software ausgerüstet war, ausgewertet.

### 2.2.7 Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der Zellkerne (DAPI)

Um Veränderungen der Kernmorphologie nach Behandlung mit den Schadstoffen im Vergleich zu den Kontrollen zu dokumentieren, wurden die Zellen (N57 und Astrozyten) mit DAPI angefärbt. DAPI bindet selektiv an die nukleäre DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe. Unter UV-Bestrahlung emittiert DAPI ein bläuliches Licht.

Bei Versuchen mit Astrozyten wurden die Vier-Kammer-Objektträger (*Chambersslides*) vor der Aussaat 30 Minuten mit Poly-L-Lysin beschichtet und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 18000 Zellen (Astrozyten) in DMEM/10 % FCS bzw. 8000 Zellen (N57) in MEM/12 % FCS pro Fach in die Vier-Kammer-Objektträger ausgesät. Das Volumen der Zellsuspension pro Kammer betrug 800  $\mu$ l. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.2 beschrieben. Nach einer Erholungsphase von 21 und 48 Stunden wurden die behandelten Zellen und Kontrollzellen zweimal mit PBS gewaschen. (Fibroblasten konnten lediglich nach 21 Stunden ausgewertet werden, da die Zellen sich nach 48 Stunden abgelöst hatten.) Es erfolgte die Fixierung mit 3 % Paraformaldehydlösung für 15 Minuten. Danach wurde einmal mit PBS gewaschen. Um eine Permeabilisierung der Zellmembran zu erreichen, wurden die Zellen 30 Minuten mit 0,1 % Triton (X) in PBS behandelt und dann noch einmal mit PBS gewaschen. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI [0,1  $\mu$ g/ml]. Hierbei wurden je 500  $\mu$ l der Lösung auf die Kammern verteilt und 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal für insgesamt 10 Minuten mit PBS gewaschen. Nach Demontage der Kammern von den Objektträgern wurden je 200  $\mu$ l einer Lösung von PBS-Glycerin-DABCO auf die Träger verteilt, mit einem Deckglas versehen und die Ränder mit Nagellack abgedichtet.

Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiphot) und wurde photographisch dokumentiert (Kodak Film Tmax 400, Ektachrome). Der prozentuale Anteil an geschädigten und nicht geschädigten Zellkernen wurde durch Auszählung ermittelt. Es wurden für jede Konzentration 2000 Zellen ausgezählt.

### 2.2.8 DNA-Fragmentierung („DNA-Leiter“)

Während des Apoptose-Prozesses wird eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Endonuclease aktiviert, welche die DNA zwischen den Nucleosomen spaltet. Dabei werden DNA-Bruchstücke gebildet, die einem Vielfachen der DNA-Länge eines Nucleosomens (ca. 180 bp) entsprechen. Zum Nachweis dieser Bruchstücke wurde DNA aus den Zellen (N57 und Astrozyten) isoliert, elektrophoretisch im Agarosegel getrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Apoptotische Zellen weisen eine charakteristische "DNA-Leiter" auf.

#### *Ernten der Zellen*

Die in 10 cm Schalen konfluent gewachsenen Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.2.2 behandelt. Mit einer Eppendorfpipette wurde der Überstand bis auf verbleibende 0,5 ml in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Der Zellrasen wurde mit Hilfe eines *Rubber-Policemans* gesammelt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Noch auf der Schale verbleibende Zellen wurden in 0,5 ml PBS gesammelt und ebenfalls in das Eppendorf-Reaktionsgefäß über-

führt. Der Überstand im Zentrifugenröhrchen wurde 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert, während die Zellsuspension im Eppendorf-Reaktionsgefäß eine Minute zentrifugiert wurde. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Das Pellet im Zentrifugenröhrchen wurde in 0,5 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurde auch das Pellet im Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und resuspendiert. Anschließend wurde nochmals eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

#### *DNA-Isolierung*

Das Zellpellet wurde in 250 µl TE-Puffer sorgfältig resuspendiert und im Anschluß daran mit 250 µl Lysis-Puffer versetzt. Zur Durchmischung wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß einige Male geschwenkt. Zu den lysierten Zellen wurde 25 µl RNase gegeben und nochmals gemischt. Dieser Ansatz wurde im Wasserbad (37 °C) für eine Stunde inkubiert (RNase-Verdau). Zur Fällung der Membranen und der hochmolekularen DNA (DNA der nicht-apoptotischen Zellen) wurde 131 µl NaCl-Lösung (5 M) zu dem Ansatz gegeben. Das Eppendorfcup wurde dann gründlich durch mehrmaliges Umschwenken gemischt (ca. 2 Minuten), zur Fällung mindestens eine Stunde kühl gestellt (4 °C) und anschließend 45 Minuten bei 11000 RPM und 4 °C zentrifugiert.

Um die Proteine aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierbei wurde der Überstand (ca. 600 µl) nach der Zentrifugation in ein neues Eppendorfcup überführt und mit Phenol-Lösung (ca. 600 µl) und Chloroform-Lösung (ca. 300 µl) versetzt. Anschließend wurde dieser Ansatz zwei Minuten durch wiederholtes Umschwenken gemischt und dann bei 14000 RPM 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Danach wurde die obere wäßrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfcup pipettiert. Zu dieser Lösung (ca. 750 µl) wurde das gleiche Volumen Chlorophorm-Lösung gegeben, um so noch überschüssiges Phenol aus dem Ansatz zu entfernen. Diese Lösung wurde wiederum zwei Minuten durch mehrmaliges Umschwenken extrahiert und anschließend bei 14000 RPM für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase (ca. 700 µl) wurde dann in ein neues 2 ml Eppendorfcup überführt. Zur Fällung der DNA erfolgte die Zugabe des doppelten Volumens eiskalten, absoluten Ethanol und eine Inkubation bei -20 °C über Nacht.

Der Ansatz wurde bei 14000 RPM für 15 Minuten bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war ein kleines Pellet sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ca. drei Stunden an der Luft getrocknet.

Auf das Pellet wurden 40 µl TE-Puffer gegeben und das Eppendorfcup für 5 Minuten auf einen Rüttler gestellt. Um das Pellet vollständig in Lösung zu bringen, erfolgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurde zu dem gleichen Zweck der Ansatz nochmals

für 5 Minuten auf den Schüttler gestellt. Der DNA-Gehalt wurde über eine Extinktionsmessung bei 260 nm im Photometer (Spektralphotometer Pharmacia Biotech Gene Quant 2) bestimmt. Der Anteil an Proteinen in der Probe wurde durch Messung des Verhältnisses  $E_{260}/E_{280}$  bestimmt. Liegt der Wert zwischen 1,8 und 2,0, so handelt es sich um eine reine DNA-Lösung, bei niedrigeren Werten ist die Lösung mit Proteinen verunreinigt. Für die Messungen wurden die Proben mit Ampuwa-Wasser verdünnt. Die DNA wurde bis zur weiteren Analyse bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert

### *Gelelektrophorese*

Die Gelelektrophorese ist eine Standard-Methode um DNA-Fragmente voneinander zu trennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente im Gel hängt von der Agarosekonzentration des Gels ab. Durch 1,5 %ige Agarose-Gele können z. B. DNA-Fragmente von 200 bis 4000 bp getrennt werden. Bromphenolblau wandert in gleicher Höhe mit DNA-Fragmenten einer Länge von 10-100 bp. Die DNA wird mit Ethidiumbromid angefärbt und der unter UV-Licht fluoreszierende DNA-Ethidiumbromid-Komplex photographisch dokumentiert.

Vor den Versuchen wurde zunächst ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 3,75 g Agarose in 250 ml 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Die Lösung wurde auf ca.  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und mit 7  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt. Anschließend wurde die Gellösung in die vorbereitete Gelapparatur (Pharmacia Biotech) gegossen und bis zur Auspolymerisation im Dunkeln aufbewahrt.

Aus den zu untersuchenden DNA-Lösungen wurden je 10-15  $\mu\text{g}$  DNA in Eppendorfcups überführt. Zu diesen DNA-Lösungen wurde jeweils ein halbes Volumen Auftragspuffer gegeben. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und 10 Minuten in einem  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad erhitzt. Dann erfolgte das Auftragen der Proben und einer 1kb „DNA-Ladder“ in die Geltaschen, die mit ca. 2 Liter 1x TBE-Puffer überschichtet waren. Es wurde eine Spannung von 125 V angelegt. Sobald die Bromphenolblau-Bande bis zur Hälfte des Gels gewandert war (ca. 3 Stunden), wurde die Elektrophorese beendet. Die DNA-Banden waren unter UV-Licht sichtbar und wurden entweder auf Poloroid-Film (667) (Belichtungszeit 6-7 Sekunden) oder mit dem Gelauswertegerät inklusive Kamera (QuickStore „plus“, MS Laborgeräte) aufgenommen.

## 2.2.9 Lipidperoxidation (TBA-Test)

Im TBA-Test werden TBA-reaktive Substanzen, wie Malondialdehyd und Malondialdehyd-Vorläufer als Produkte der Lipidperoxidation, erfaßt. Die Durchführung des Tests erfolgte

nach der von Weiß (1995) beschriebenen Methode, in Anlehnung an das Versuchsprotokoll von Hartwig *et al.* (1993).

Die in 10 cm Schalen - konfluent gewachsenen Fibroblasten bzw. Astrozyten - wurden wie unter Abschnitt 2.2.2 beschrieben mit den Schadstoffen behandelt, wobei sie entweder vor oder nach der Behandlung mit den Testsubstanzen mit Saline A inkubiert wurden. Eine zusätzliche Schale wurde zur späteren Zellzahlbestimmung angesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit (einschließlich aller Nachinkubationen) wurden die Lösungen entfernt und der Zellrasen je dreimal mit Saline A gewaschen. Die Spüllösung wurde abgesaugt und die Schalen bis zur weiteren Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die für die Zellzahlbestimmung vorgesehene Schale wurde dreimal mit Saline A gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden in Saline A aufgenommen und die Zellzahl mit einem elektronischen Teilchenzähler (*Coulter Counter*) bestimmt.

#### *Durchführung*

Zur Durchführung des TBA-Tests wurden die Zellen im gefrorenen Zustand in den Schalen zunächst mit je 1,05 ml 3 % SDS-Lösung versetzt. Das Zelllysat wurde homogenisiert und anschließend 1 ml des Lysats in ein Pyrex<sup>®</sup>-Röhrchen überführt. Für die Proteinbestimmung wurden von jeder Probe Aliquots von 50  $\mu\text{l}$  entnommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zu dem verbleibendem Zelllysat (1 ml) wurden 100  $\mu\text{l}$  40 mmol/l EDTA-Lösung und 100  $\mu\text{l}$  2% BHT-Lösung (in Ethanol) hinzugefügt. Für die Blindwerte und die MDA-Standardproben wurden jeweils zwei Röhrchen mit 1 ml 3% SDS statt Zelllysat angesetzt und wie oben beschrieben mit den Chemikalien versetzt. Den MDA-Standardproben wurden 100  $\mu\text{l}$  einer frisch hergestellten 2  $\mu\text{mol/l}$  MDA-Standardlösung zugegeben; den Blind- und Zellproben wurde zum Volumenausgleich 100  $\mu\text{l}$  Millipore<sup>®</sup>-Wasser statt Standard hinzugeführt. Anschließend wurde zu allen Proben 1 ml frisch hergestellter 0,67 % (w/v) Thiobarbitursäure (in 10 % (w/v) Trichloressigsäure) gegeben. Die mit Schraubverschluß und Teflondichtung verschlossenen Probenröhrchen wurden 20 Minuten bei  $90^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Im Anschluß wurden die Proben mit je 1,5 ml Butanol extrahiert; dazu wurden sie dreimal für 10 Sekunden intensiv mit dem *whirlmix* gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben ca. 10 Minuten stehen gelassen und anschließend 10 Minuten mit 2000 g zentrifugiert. Die Fluoreszenz der Butanolphase wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einer Anregungswellenlänge von 515 nm gemessen. Über die Fluoreszenzintensität des MDA-Standards wurde der MDA-Gehalt der Zellproben berechnet und als pmol MDA pro mg Protein angegeben.

#### *Erstellung der MDA-Standardlösung*

Die MDA-Standardlösung wurde, wie von Esterbauer und Cheeseman (1990) beschrieben, durch saure Hydrolyse aus 1,1,3,3-Tetraethoxypropan (TEP) hergestellt. Dabei wurde am Versuchstag eine 10 mmol/l TEP-Lösung in 1 % Schwefelsäure frisch angesetzt. Nach einer Hy-

drolysezeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde diese Stammlösung bis zur Versuchsdurchführung im Kühlschrank aufbewahrt. Die quantitative Hydrolyse wurde photometrisch über die Absorption von MDA bei einer Wellenlänge von 245 nm überprüft, wobei ein Extinktionskoeffizient von 13700 (Esterbauer und Cheeseman, 1990) zugrunde gelegt wurde. Durch Verdünnen der Stammlösung mit Millipore®-Wasser wurde direkt vor dem Gebrauch eine 2 µmol/l MDA-Standardlösung hergestellt. In einem Konzentrationsbereich bis zu 2 nmol/l MDA im Reaktionsansatz konnte eine lineare Beziehung zwischen eingesetzter MDA-Menge und resultierender MDA-(TBA)<sub>2</sub>-Fluoreszenz festgestellt werden. In den Experimenten wurden 200 pmol MDA (100 µl einer 2 [µmol/l] MDA-Standardlösung) als Standard eingesetzt.

### *Proteinbestimmung*

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von Smith *et al.* (1985) beschriebenen Methode mit Bicinchoninsäure (BCA). Diese Methode zeigt mit SDS in den hier eingesetzten Konzentrationen keine Interferenzen. Von den eingefrorenen Proben wurde jeweils 2 x 10 µl abgenommen, in Eppendorfcups überführt, mit PBS versetzt und bei 2800 g zentrifugiert. Die Pellets wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend ca. 2 Stunden an der Luft getrocknet. Danach wurden die Pellets mit je 30 µl 3 % SDS-Lösung behandelt. Die Erstellung der Protein-Eichreihe erfolgte mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard aus einer Stammlösung von 20 mg/ml BSA in 3 % SDS-Lösung in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1,0 mg Protein/ml. Zur Durchführung des Protein-Assays wurde je 1 Volumenanteil von den Proben, beziehungsweise des Proteinstandards, mit je 20 Volumenanteilen BCA-Arbeitsreagenz gemischt und anschließend 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in eine Mikrotiterplatte pipettiert und der Proteingehalt colorimetrisch mit einem Minireader über die Extinktion bei 590 nm ermittelt.

## 2.2.10 Untersuchungen mit PM2 DNA

Für die *in vitro*-Experimente wurde die DNA des Bakteriophagen PM2 verwendet. PM2 DNA besitzt ein Molekulargewicht von  $6,31 \times 10^6$  (Hewitt *et al.*, 1979). Sie liegt als ringförmiger Doppelstrang mit superhelikaler Struktur vor, die nach Einwirkung eines strangbrucherzeugenden Agens in die relaxierte Form überführt wird.

### *Behandlung von PM2 DNA mit den Schadstoffen*

PM2 DNA [100 µg/ml; 10 µl] wurde mit 38 µl S-Bioallethrin-Lösung bzw Pyrethrine-Lösung und 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert. Die S-Bioallethrin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen sind bei den Versuchen separat angegeben. Alle Verdünnungen und Stammlösungen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch angesetzt. Aus der S-Bioallethrin-Stammlösung [500 mmol/l] in

DMSO/Cremophor wurde eine Zwischenverdünnung [50 mmol/l] mit 100 mmol/l NaPO<sub>4</sub>-Puffer hergestellt. Daraus wurden die entsprechenden Gebrauchslösungen angesetzt. Der Lösungsvermittler-Anteil betrug bei 1 mmol/l S-Bioallethrin bzw. Pyrethrum insgesamt 0,1%. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stammlösung [250 mmol/l] wurde ebenfalls mit 100 mmol/l NaPO<sub>4</sub>-Puffer hergestellt und dann entsprechend mit diesem Puffer verdünnt. Der pH-Wert der Reaktionsgemische betrug immer 7,2. Die Reaktionsgemische wurden bei 0 °C im Eisbad pipettiert, durch Zentrifugation in einer Eppendorftischzentrifuge vereinigt und für eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Abstopperlösung beendet und die Proben sofort auf ein Agarosegel aufgetragen.

#### *Gelelektrophoretischer Nachweis und Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen*

Einzelstrangbrüche überführen die zirkuläre superhelikale DNA in die zirkuläre relaxierte Form, während Doppelstrangbrüche zu linearer PM2 DNA führen. Die Auftrennung von superhelikaler und relaxierter DNA-Form erfolgte in horizontalen Flachgelen (0,5 % Agarose) in Elektrophoresepuffer mit 4 bzw. 2,7 V/cm bei 80 Volt bei einer Laufzeit von 2,45 Stunden. Unter Lichtausschluß wurden die Gele anschließend eine Stunde mit Ethidiumbromid (2 mg/ml) angefärbt. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde mit einer 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>-Lösung entfernt (30 Minuten). Die Gele wurden mittels eines Transilluminators mit UV-Licht durchleuchtet, wobei die verschiedenen DNA-Banden sichtbar wurden. Diese wurden mit Hilfe einer Kamera, eines Auswertegerätes (QuickStore „plus“, MS Laborgeräte) und entsprechender Software (Bio Image<sup>®</sup> Intelligent Quantifier<sup>™</sup>, Version 2.5.0; B. I. Systems Corporation) ausgewertet.

Von den Peakflächen kann auf die durchschnittliche Anzahl von Einzelstrangbrüchen (SSB's) pro DNA-Molekül geschlossen werden. Bei der Annahme, daß die Häufigkeit der SSB's in der DNA einer Poissonverteilung entspricht, läßt sich die Anzahl nach der Formel  $N = -\ln \alpha$  (Vinograd *et al.*, 1965) berechnen. N ist die Anzahl der Einzelstrangbrüche pro PM2 DNA Molekül und  $\alpha$  der relative Anteil der superhelikalen DNA an der gesamten DNA. Da das sperrig-planare Ethidiumbromidmolekül schlechter in die superhelikale DNA-Form interkalieren kann, wurde der Anteil der relaxierten DNA mit dem Faktor 0,8 multipliziert ( $\alpha = \text{Fläche der superhelikalen DNA} / 0,8 \times \text{Fläche der relaxierten DNA} + \text{Fläche der superhelikalen DNA}$ ) (Hecht und Thielmann, 1978).

## 3 Ergebnisse

Bei allen Untersuchungen mit S-Bioallethrin mußte aufgrund der hohen Lipophilie der Substanz mit einem Lösungsvermittlergemisch, DMSO und Cremophor EL<sup>®</sup> zu gleichen Teilen, gearbeitet werden. In allen Kontrollen wurden entsprechende Lösungsvermittler-Konzentrationen eingesetzt (DMSO/Cremophor bzw. DMSO/Cremophor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Schreibweise „DMSO/Cremophor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>“ verzichtet und ausschließlich „H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>“ verwendet.

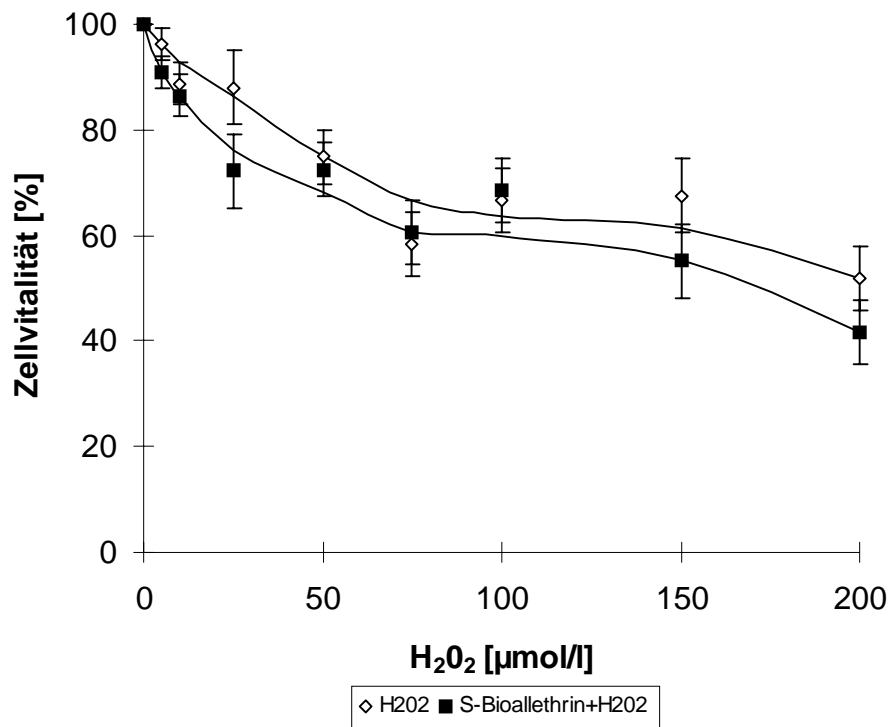
### 3.1 Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf humane Fibroblasten

#### 3.1.1 Zellvitalität (MTT-Assay)

##### 3.1.1.1 Toxizität der Substanzen direkt nach Schadstoffeinwirkung (akute Toxizität)

S-Bioallethrin erwies sich bei der Bestimmung zur akuten Toxizität bis 1 mmol/l als nicht zytotoxisch. Der Einsatz von höheren Schadstoffkonzentrationen war wegen des hohen (und damit toxischen) Lösungsvermittleranteils nicht sinnvoll. In Kombination mit 5 µmol/l bis 200 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte 1 mmol/l S-Bioallethrin keine Erhöhung der akuten Toxizität (Abb. 2). Die Zellvitalität in der Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lag in den Bereichen der Einzelwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wobei die EC<sub>50</sub> ca. 200 µmol/l betrug .

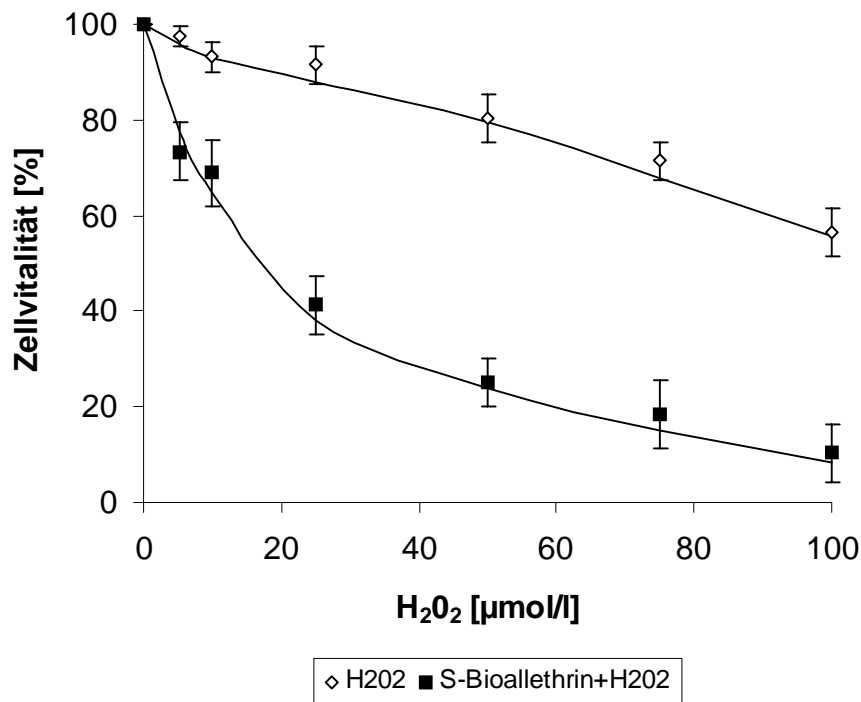




**Abb. 2:** Zellvitalität menschlicher Fibroblasten nach einstündiger Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-200 µmol/l] bzw. S-Bioallethrin [1mmol/l]/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-200 µmol/l] in SFM. S-Bioallethrin und DMSO/Cremophor allein reduzierten die Zellvitalität nicht.

### 3.1.1.2 Toxizität der Substanzen nach einer *recovery phase*

Die Zellvitalität durch 1 mmol/l S-Bioallethrin in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-100 µmol/l] wurde durch eine 21-stündige Nachinkubation in serumhaltigem Medium gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein deutlich vermindert (Abb. 3). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein bewirkte keine signifikante Toxizitätsverstärkung durch die Erholungsphase. Der EC<sub>50</sub>-Wert für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Einzelwirkung betrug 110 µmol/l (nicht dargestellt), in Kombination mit 1 mmol/l S-Bioallethrin ca. 15 µmol/l.



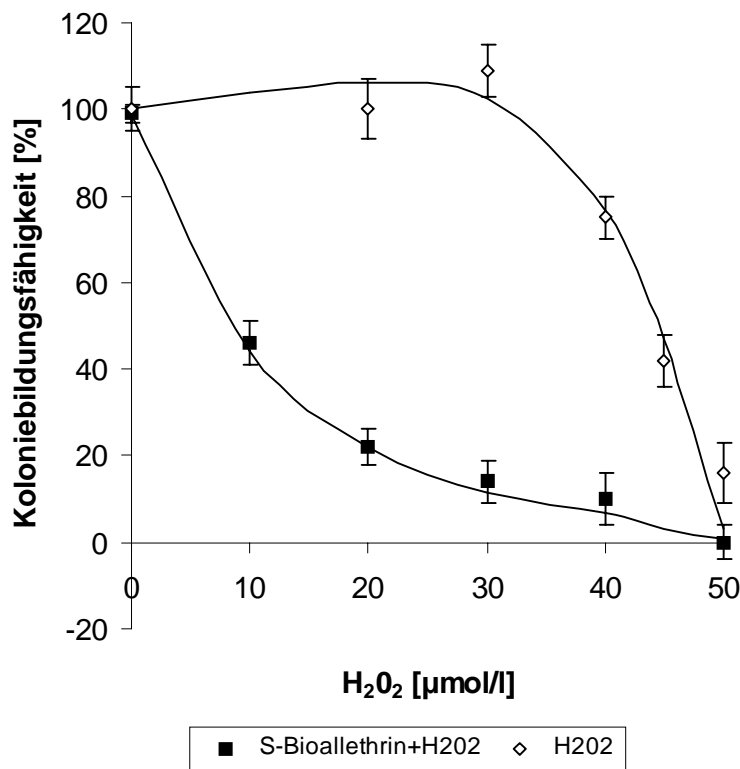
**Abb. 3:** Zellvitalität menschlicher Fibroblasten nach einstündiger Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-100 µmol/l] bzw. S-Bioallethrin [1 mmol/l]/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-100 µmol/l] in SFM. Die Zellen wurden anschließend für 21 h in 12 %-igem Medium weiterinkubiert. 1 mmol/l S-Bioallethrin reduzierte die Zellvitalität um 8 %, DMSO/Cremophor allein reduzierten die Zellvitalität nicht.

### 3.1.2 Koloniebildungsfähigkeit

Die Messung der Zellvitalität ergab eine deutliche Erhöhung des toxischen Potentials in der Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach einer 21-stündigen Nachinkubation. Durch die Bestimmung der Koloniebildung können durch die lange Kultivierung nach der Schadstoffbehandlung (7 Tage) einerseits mögliche Schäden repariert oder andererseits Schäden erfaßt werden, die sich erst im Laufe der Zeit manifestieren. Im letzteren Fall werden irreversible Schäden erfaßt, die zu einer Blockade der Zellteilungsrate führen.

Die Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit menschlicher Fibroblasten nach einstündiger Inkubation mit 1 mmol/l S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein ist in Abbildung 4 dargestellt. Analog zur Messung der Zellvitalität bewirkte 1 mmol/l S-Bioallethrin allein keine zytotoxischen Effekte auf die Koloniebildungsfähigkeit. Die Kurvenverläufe ähneln denen im Zellvitalitätstest (mit 21-stündiger *recovery phase*). Die Fähigkeit zur Koloniebildung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein war bei einer Konzentration von 40 µmol/l um ca. 20 % inhibiert und erwies sich bei

50  $\mu\text{mol/l}$  als fast vollständig gehemmt. In der Kombination S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigte sich in der NOEC von  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine ca. 90 %ige Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit.



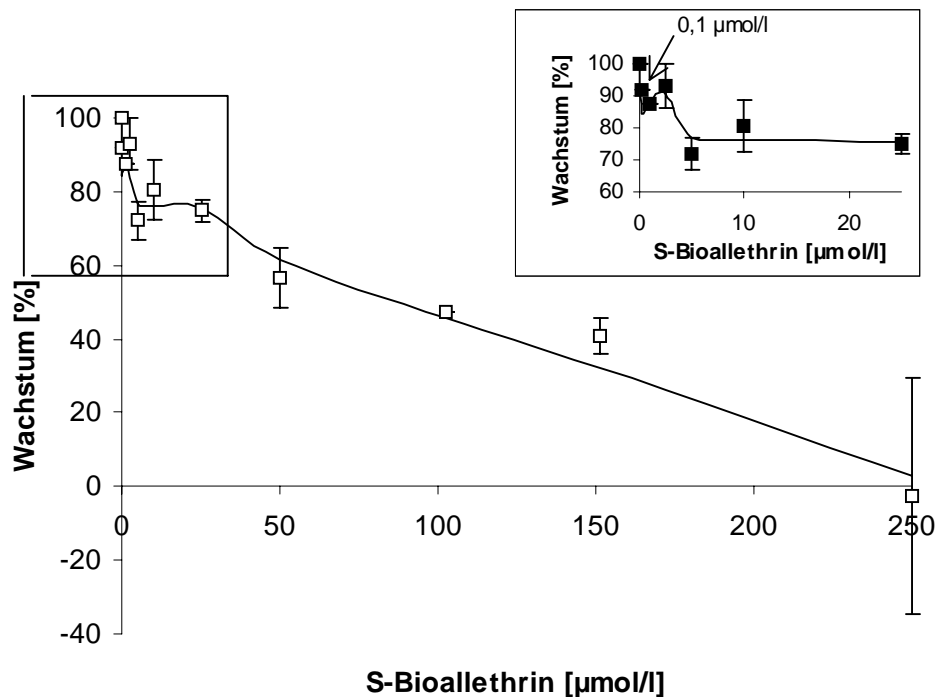
**Abb. 4:** Einfluß von  $\text{H}_2\text{O}_2$  [10-50  $\mu\text{mol/l}$ ] bzw. S-Bioallethrin [1mmol/l]/ $\text{H}_2\text{O}_2$  [10-50  $\mu\text{mol/l}$ ] auf die Koloniebildungsfähigkeit menschlicher Fibroblasten nach einstündiger Behandlung. S-Bioallethrin und DMSO/Cremophor allein beeinflussten die Koloniebildungsfähigkeit nicht.

### 3.1.3 Zellwachstum

Im Unterschied zur Koloniebildung, wo den Zellen Zeit zur Reparatur der gesetzten Schäden gegeben wird, also nur irreversible Schäden gemessen werden, erfaßt die Methode zur Bestimmung des Zellwachstums auch reversible Veränderungen in der logarithmischen Wachstumsphase der Fibroblasten. Durch die Bestimmung der Wachstumshemmung können somit weitere Informationen zur toxischen Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  gewonnen werden.

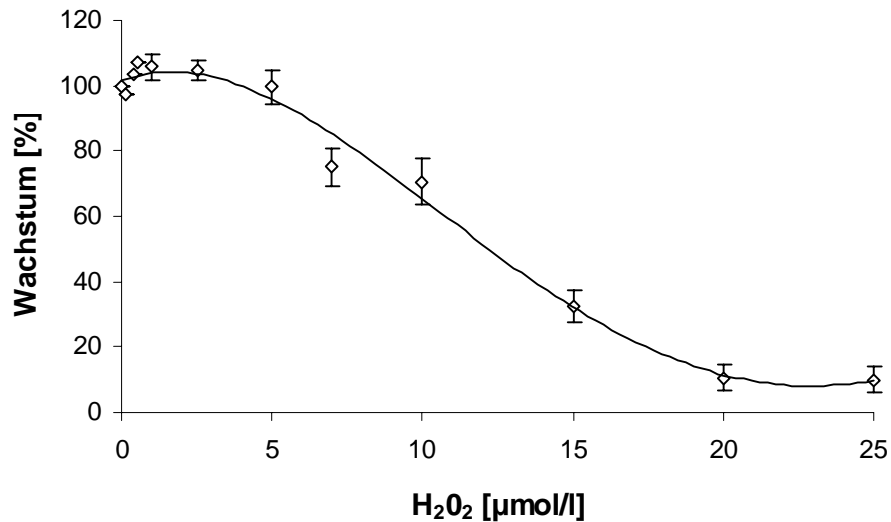
Im Gegensatz zum MTT-Assay und zur Koloniebildungsfähigkeit erwies sich S-Bioallethrin allein schon in niedrigen Konzentrationen als wachstumshemmend (Abb. 5). Die in Abbildung 5 dargestellte konzentrationsabhängige Wachstumshemmung humaner Fibroblasten durch S-Bioallethrin zeigt einen biphasischen Verlauf. Während geringe S-Bioallethrin-Kon-

zentrationen (bis 5  $\mu\text{mol/l}$ ) zu einer raschen Abnahme des Zellwachstums auf 75 % führten, zeigte die Erhöhung der S-Bioallethrin-Konzentration bis 25  $\mu\text{mol/l}$  keine weitere Erhöhung der Toxizität. Ab 25  $\mu\text{mol/l}$  S-Bioallethrin nahm das Zellwachstum nahezu linear ab. Eine Konzentration von 250  $\mu\text{mol/l}$  inhibierte die Teilungsfähigkeit vollständig. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert lag bei ca. 50  $\mu\text{mol/l}$ . Der Kurvenverlauf zeigt auch, daß schon bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  S-Bioallethrin (oben rechts im Bild) das Wachstum um 10 % gehemmt wird.



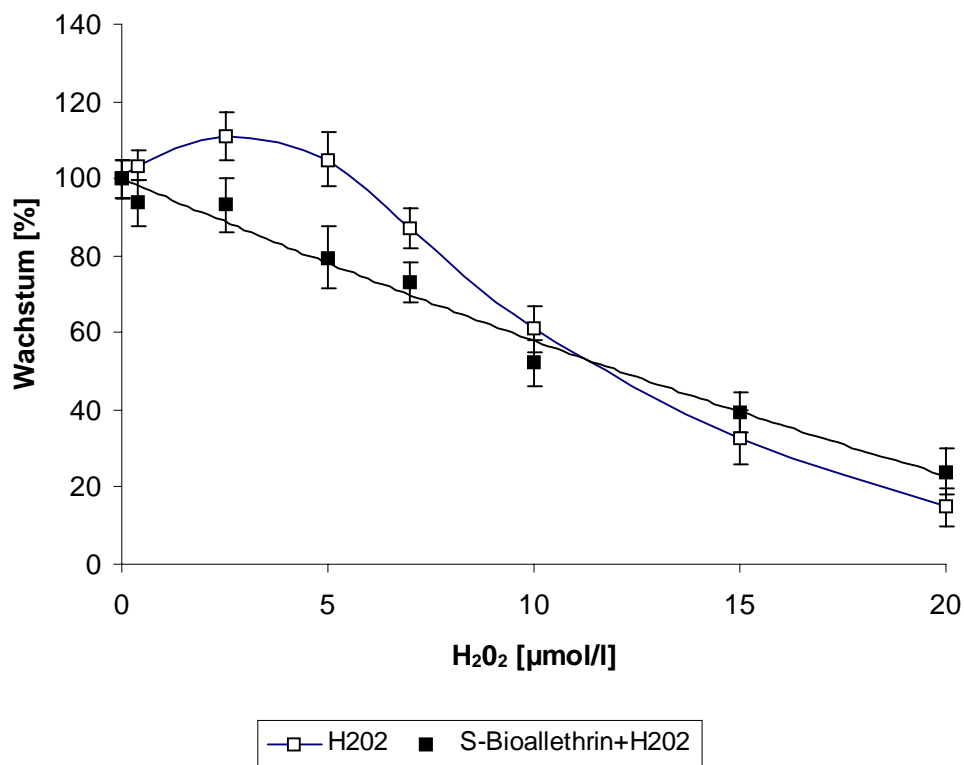
**Abb. 5:** Wachstumshemmung menschlicher Fibroblasten durch S-Bioallethrin [0,1-250  $\mu\text{mol/l}$ ] nach einstündiger Inkubation in SFM. Rechts oben ist ein vergrößerter Ausschnitt dargestellt.

Die konzentrationsabhängige Wachstumshemmung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ergab, daß bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  die Teilungsfähigkeit der Fibroblasten nach 48 Stunden zu 90 % inhibiert war (Abb. 6). Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert betrug 13  $\mu\text{mol/l}$ , die NOEC lag bei 5  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .



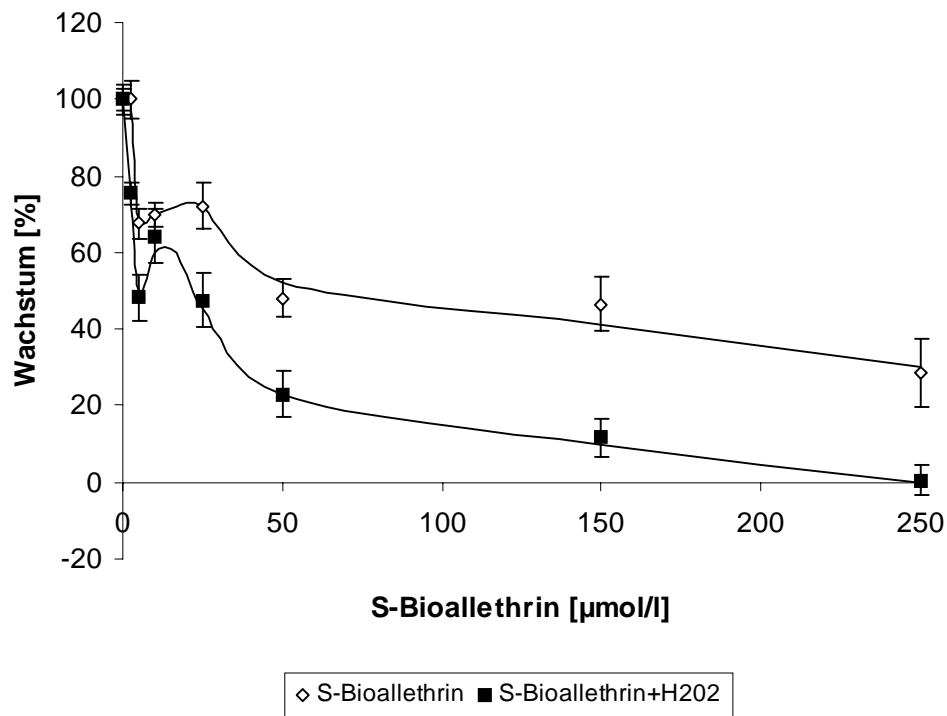
**Abb. 6:** Wachstum menschlicher Fibroblasten nach einstündiger Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [0,1-25 µmol/l] in SFM.

Die Kombination einer untoxischen S-Bioallethrin-Konzentration mit verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen [0,4-20 µmol/l] ist in Abbildung 7 dargestellt. Bei niedrigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen bis 10 µmol/l ergab die Kombination eine Erhöhung der Toxizität im Vergleich zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein. Ab einer Konzentration von 10 µmol/l zeigten sich keine Unterschiede der Zellteilungsrates zwischen der Kombinations- zur Einzelwirkung mehr.



**Abb. 7:** Wachstumshemmung menschlicher Fibroblasten durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [0,4-20 µmol/l] mit bzw. ohne S-Bioallethrin [2,5 µmol/l] nach einstündiger Inkubation in SFM. Lösungsvermittler und S-Bioallethrin allein reduzierten das Wachstum nicht.

Wurde eine gering toxische  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration mit verschiedenen S-Bioallethrin-Konzentrationen kombiniert, ergab sich ein anderes Bild. Abbildung 8 stellt die Kombinationswirkung verschiedener S-Bioallethrin-Konzentrationen mit  $7 \mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  im Vergleich zur Einzelwirkung von S-Bioallethrin dar. Dabei zeigte die Kombination S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  eine stärkere Wachstumshemmung als S-Bioallethrin allein. Die Graphen verlaufen annähernd parallel und beschreiben, wie bereits in Abbildung 5 deutlich wird, einen biphasischen Verlauf.

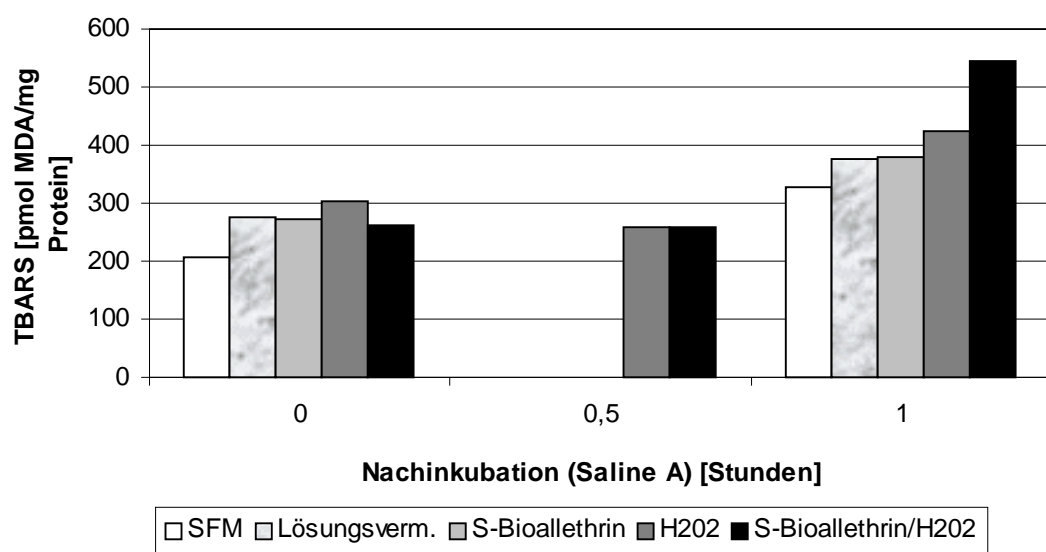


**Abb. 8:** Wachstum menschlicher Fibroblasten nach einstündiger Behandlung mit S-Bioallethrin [2,5-250  $\mu\text{mol/l}$ ] in Gegenwart und Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  [7  $\mu\text{mol/l}$ ] in SFM.  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein reduzierte das Wachstum um 10 %.

### 3.1.4 Induktion von Lipidperoxidation (TBA-Test)

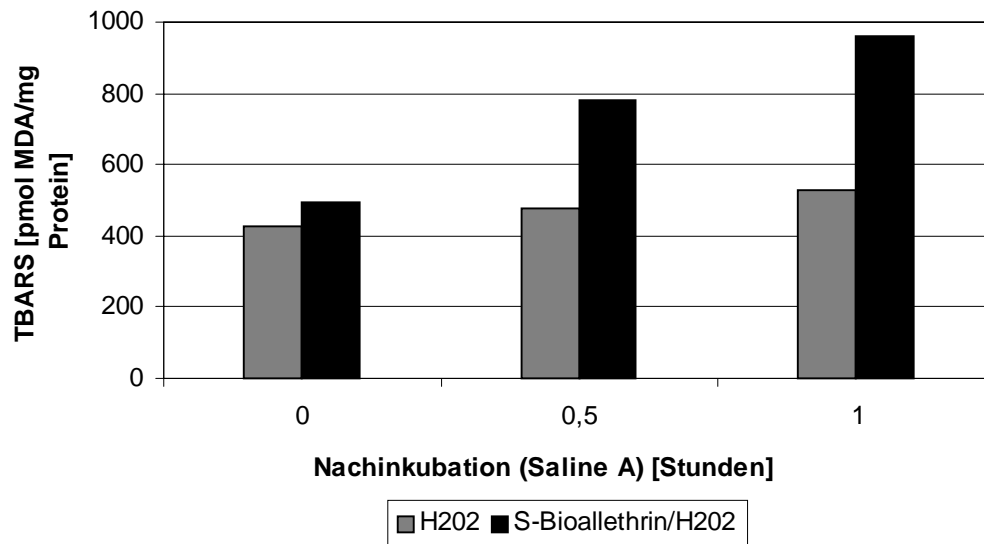
$\text{H}_2\text{O}_2$  und insbesondere S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  wirkten auf Fibroblasten schon in geringen Konzentrationen wachstumshemmend. Eine induzierte Lipidperoxidation (LPO) kann das Zellwachstum empfindlich hemmen (Dianzani, 1993; Poot und Joenje, 1993; Schaur *et al.*, 1991).  $\text{H}_2\text{O}_2$  gilt als Initiator der Lipidperoxidation (Halliwell und Gutteridge, 1989). Deshalb wurde untersucht, ob durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  eine LPO ausgelöst wurde und über ihre Reaktionsprodukte den Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) nachzuweisen war. Die Zellen wurden für eine Stunde mit 1 mmol/l S-Bioallethrin mit und ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  [100  $\mu\text{mol/l}$ ] behandelt. Anschließend wurden sie sofort, nach 0,5 und 1 Stunde Nachinkuba-

tion in Saline A geerntet und die TBARS - wie unter 2.2.9 beschrieben - bestimmt. Durch die Nachinkubation in Saline A wurde eine verstärkte Zunahme von TBARS erwartet. Dies ergaben Untersuchungen von Jacobi *et al.* (1999) zum besseren Nachweis von TBARS durch diese Methode. Die Konzentration der gebildeten TBA-reaktiven Substanzen war nach ein-stündiger Behandlung bei den Testsubstanzen annähernd gleich hoch (Abb. 9). Erst durch eine einstündige Nachinkubation in Saline A wurde eine Zunahme der TBARS gemessen. Die Kontrollen und  $H_2O_2$  allein zeigten im Verlauf einer Stunde Nachinkubation in Saline A einen Anstieg der TBARS um ca. 30 %. S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  verursachte in dieser Zeit eine Verdopplung von TBARS.



**Abb. 9:** TBA-reaktive Substanzen in menschlichen Fibroblasten nach einstündiger Behandlung mit S-Bioallethrin [1 mmol/l] mit und ohne  $H_2O_2$  [100  $\mu$ mol/l]. Die Werte wurden direkt oder nach 0,5 bzw. 1 Stunde Nachinkubation in Saline A gemessen. Unter den Versuchsbedingungen betrug der Fehler  $\pm$  10 %.

Wurde den Zellen nach Behandlung mit den Testsubstanzen und anschließender Nachinkubation in Saline A die Möglichkeit einer 21-stündigen *recovery phase* gegeben, so ergab sich folgendes Bild (Abb. 10): S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  induzierte im Gegensatz zu  $H_2O_2$  allein eine Verdopplung der TBARS von ca. 500 auf ca. 1000 mit steigender Nachinkubationszeit in Saline A.  $H_2O_2$  allein verursachte kaum einen Anstieg der TBARS und blieb mit Zunahme der Nachinkubationsdauer in Saline A auf einem Level um 400-500. S-Bioallethrin sowie die schadstofffreien Kontrollen lagen nach einer Stunde Nachinkubation in Saline A über diesem Level bei ca. 660 TBA-reaktive Substanzen.

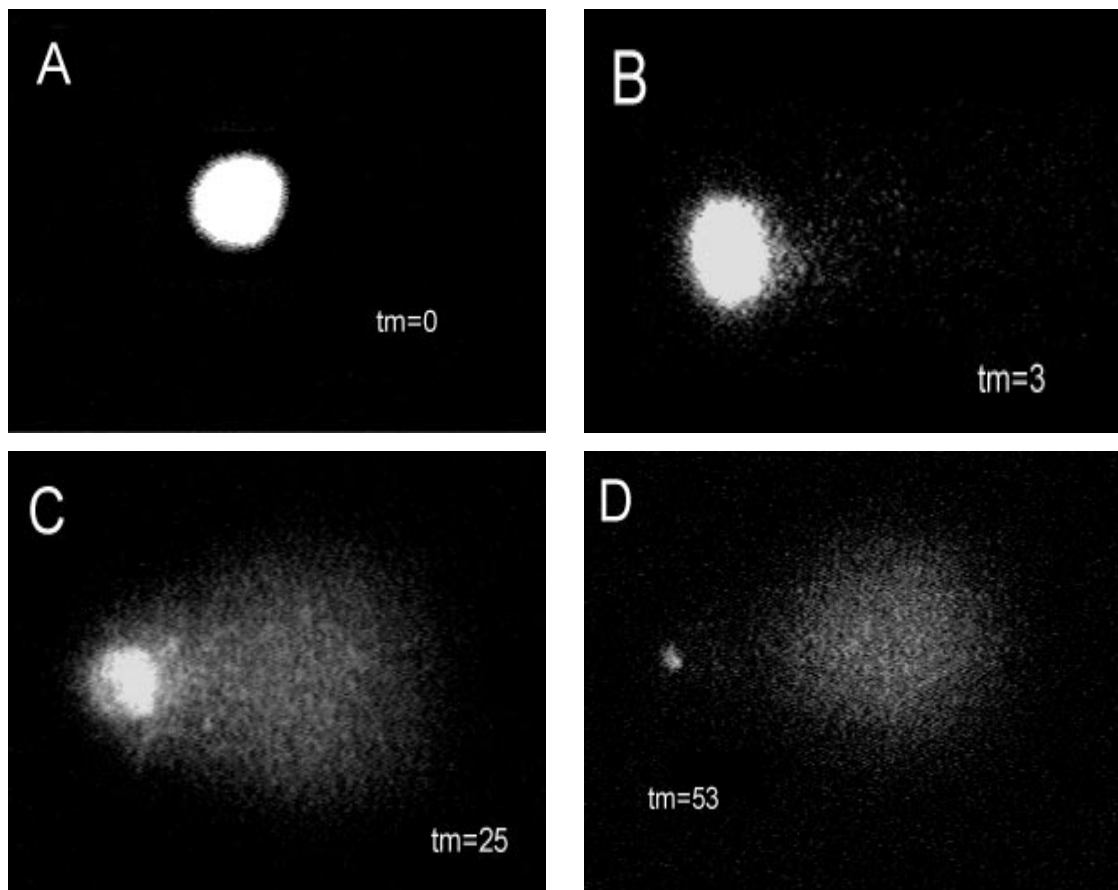


**Abb. 10:** TBA-reaktive Substanzen in menschlichen Fibroblasten nach Behandlung mit S-Bioallethrin [1 mmol/l] mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µmol/l]; Nachinkubation in Saline A und anschließender 21 stündiger Erholungsphase in serumhaltigem Medium. Die Kontrollen ergaben nach 1 Stunde um ca. 20 % höhere Werte als durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein. Unter den Versuchsbedingungen betrug der Fehler  $\pm 15\%$ .

### 3.1.5 Induktion von DNA-Schäden (Kometen-Assay)

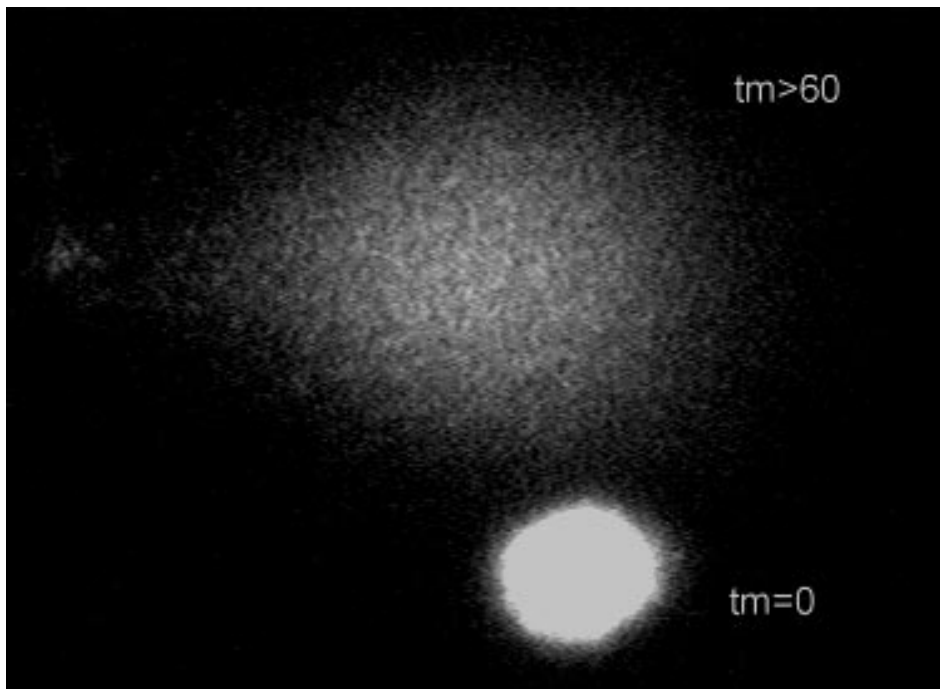
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkt über die Bildung von Hydroxylradikalen ( $\cdot\text{OH}$ ) genotoxisch. Mit Hilfe des Kometen-Assays wurde untersucht, ob vermehrt DNA-Schäden in der Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein auftreten. Abbildung 11 zeigt repräsentative Bilder von ungeschädigter- und durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geschädigter DNA im Kometen-Assay. Dabei ist die DNA-Schädigung um so stärker, je ausgeprägter der Kometenschweif erscheint. Das Produkt aus prozentualen Anteil an DNA im Schweif und der Schweiflänge wird als *tail moment* (*tm*) bezeichnet und als Maß für DNA-Schäden angegeben. Eine einstündige Behandlung humaner Fibroblasten mit SFM führte zu keiner Schädigung (Abb. 11 A), wohingegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Schäden in der DNA verursachten (Abb. 11 B bis D), die anhand des steigenden *tail moments* charakterisiert wurden.





**Abb. 11:** Kometen-Assay; Beispiele von unterschiedlich hohen DNA-Schäden mittels steigender *tail moments*: DNA in menschlichen Fibroblasten nach einstündiger Behandlung mit SFM (A), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25 µmol/l] (B), S-Bioallethrin [1 mmol/l]/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [60 µmol/l] (C), S-Bioallethrin [1 mmol/l]/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [80 µmol/l] (D).

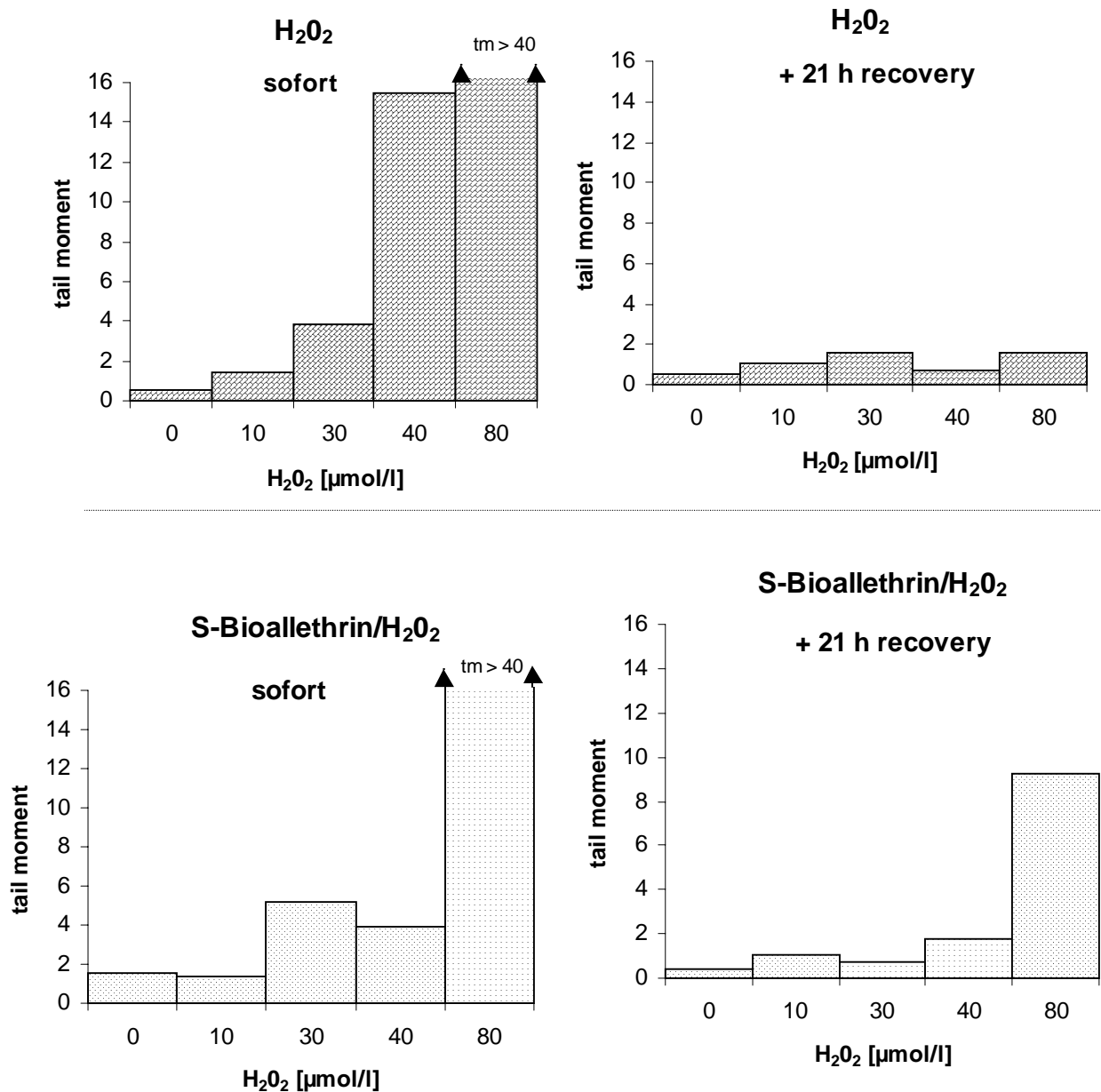
Auffällig bei den Experimenten war die breite Streuung der *tail moments* innerhalb der einzelnen ausgezählten Zellen der mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Proben. Die Festlegung der *tail moments* erfolgte über den Mittelwert der auswertbaren Kometen. Die für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stoffspezifische und charakteristische breite Streuung folgt keiner Gaußverteilung (Daten nicht gezeigt). Daher kann in diesem Fall keine Standardabweichung berechnet werden. Darüber hinaus traten verstärkt bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen > 40 µmol/l mit anschließender 21-stündiger Nachinkubation sowohl mit als auch ohne S-Bioallethrin neben ungeschädigten Zellen, sehr stark geschädigte Zellen auf ( $tm > 60$ ). Letztere können mit den herkömmlichen Auswertesystemen nicht mehr erfaßt werden, da die lokale Helligkeit im Schweif intensiver als im Kopfbereich des Kometen ist. Abbildung 13 zeigt ein typisches Bild beim Auswerten eines Objektträgers mit einer stark geschädigten - nicht mehr auswertbaren - neben einer ungeschädigten DNA im Kometen-Assay. Ausgelöst wurde dies durch 1 mmol/l S-Bioallethrin mit 80 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und anschließender Erholungsphase von 21 Stunden.



**Abb. 12:** Stark geschädigte und ungeschädigte DNA im Kometen-Assay. Dargestellt sind zwei Zellen einer Probe menschlicher Fibroblasten nach einstündiger Behandlung mit S-Bioallethrin [1 mmol/l]/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [80 µmol/l] und anschließender *recovery phase* von 21 Stunden.

Abbildung 13 zeigt die Darstellung der *tail moments* von humanen Fibroblasten nach einstündiger Behandlung mit steigenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen mit und ohne 1 mmol/l S-Bioallethrin in SFM. Die Messung erfolgte direkt nach Schadstoffbehandlung bzw. nach einer anschließenden 21-stündigen Nachinkubation in serumhaltigem Medium. S-Bioallethrin und DMSO/Cremophor allein erzeugte keine Kometenbildung weder direkt noch nach 21 Stunden. Die Behandlung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ergab einen konzentrationsabhängigen Anstieg der *tail moments* direkt nach der Schadstoffbehandlung. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration (80 µmol/l) war die DNA zum Teil so stark geschädigt, daß einige Zellen nicht auswertbar waren und somit das gemittelte *tail moment* der auswertbaren Zellen mit einem Betrag von 40 zu gering ist. Nach einer 21-stündigen Nachinkubation sind keine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedingten DNA-Schäden mehr nachweisbar, selbst in hohen Konzentrationen nicht. In der Kombination mit S-Bioallethrin zeigte sich direkt nach Schadstoffbehandlung ebenfalls eine Zunahme der DNA-Schäden mit steigender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration. Bei 40 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ergaben vielfach wiederholte Versuche ein geringeres *tail moment* in Kombination mit S-Bioallethrin als durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein. Bei der höchsten eingesetzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration war das *tm* in der Kombination mit S-Bioallethrin ebenso hoch wie durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein. Nach einer Erholungsphase von 21 Stunden waren die DNA-Schäden durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bis zu einer Konzentration von 40 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht mehr nachweisbar. Bei 80 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Kombination mit

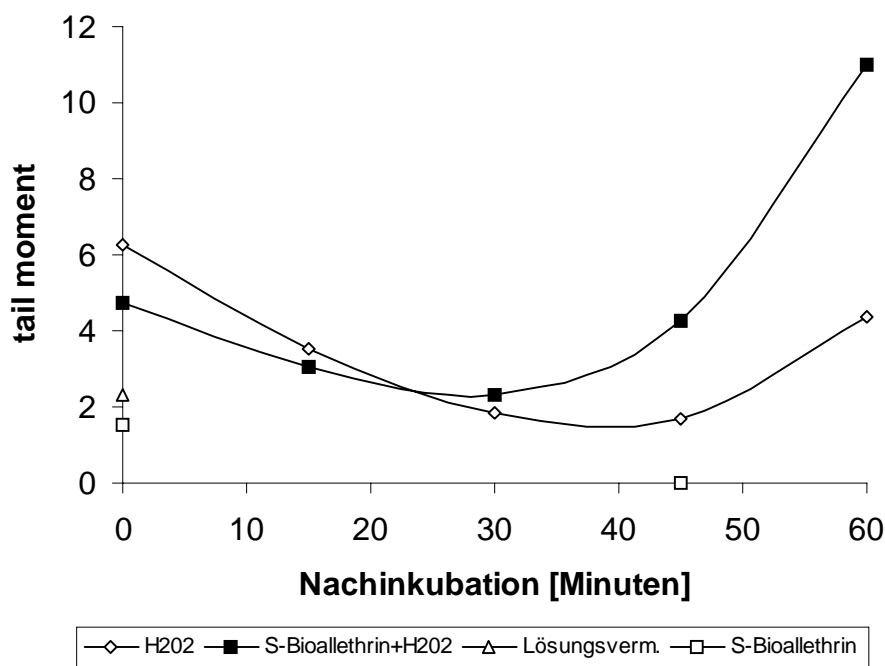
S-Bioallethrin blieben Schäden persistent, die Zellzahl nahm dabei um 50 % ab (Daten nicht gezeigt). Bei  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein waren keine Schäden mehr nachweisbar und es wurden keine Zellverluste festgestellt.



**Abb. 13:** DNA-Kometenbildung in menschlichen Fibroblasten nach einstündiger Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  [10-80  $\mu\text{mol/l}$ ] bzw. S-Bioallethrin [1 mmol/l]/ $\text{H}_2\text{O}_2$  [10-80  $\mu\text{mol/l}$ ] in SFM. Die Messung erfolgte entweder direkt nach der Begiftung oder nach einer 21-stündigen Nachinkubation in MEM/12 % FCS. S-Bioallethrin allein ergab das gleiche *tail moment* wie die Kontrolle.

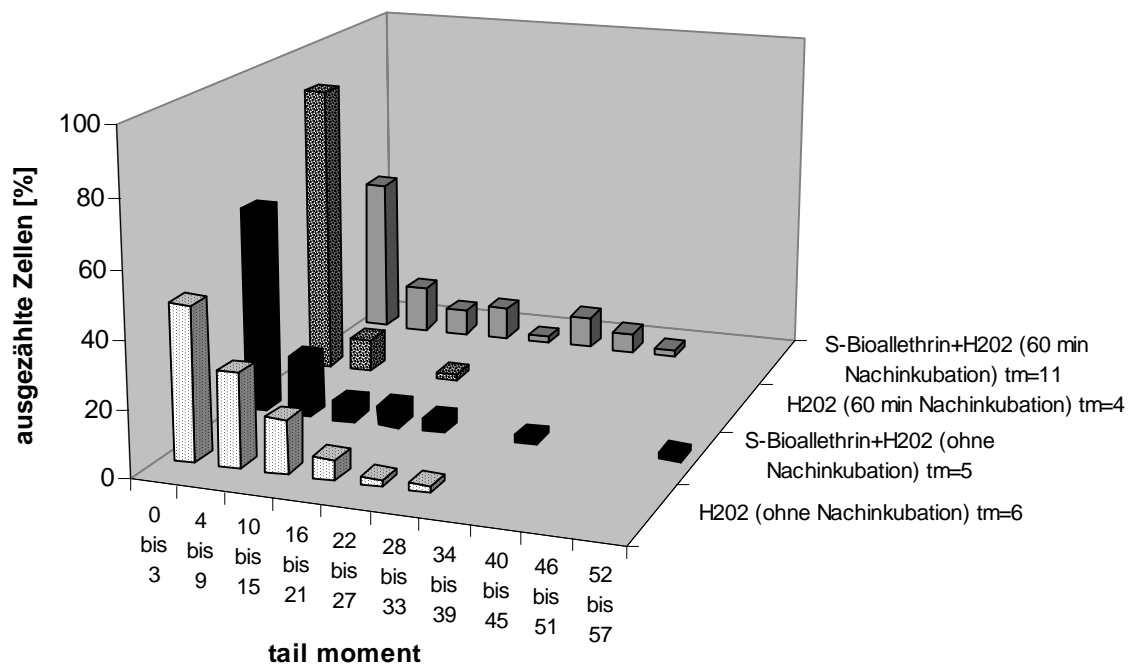
Die zeitliche Abnahme des *tail moments* nach erfolgter Schadstoffbehandlung gilt als indirekter Nachweis von DNA-Reparatur. Es wurden Versuche mit einer Erholungsphase bis zu

60 Minuten durchgeführt, um Erkenntnisse über die Kinetik der persistenten bzw. reparablen Schäden von S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu erlangen. Dabei wurde mit 25 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Konzentration gewählt, die in der Kombination mit 1 mmol/l S-Bioallethrin nach einstündiger Behandlung und sofortiger Messung ein ähnlich großes *tail moment* besitzt, wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein. Die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedingten Schäden wurden innerhalb von 60 Minuten um ca. 40 % reduziert (Abb. 14). Die Schäden durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden in den ersten 30 Minuten kaum geringer und nahmen dann im weiteren Verlauf der Nachinkubation zu.



**Abb. 14:** DNA-Schäden in menschlichen Fibroblasten nach einstündiger Behandlung mit S-Bioallethrin [1 mmol/l] mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25 µmol/l] in SFM. Im Anschluß wurde zu unterschiedlichen Zeiten (0-60 Minuten) in serumhaltigem Medium nachinkubiert.

Abbildung 15 stellt die prozentuale Verteilung der gemessenen *tail moments* aus Abbildung 14 dar. Gegenübergestellt wurde die *tm* durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein und durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach sofortiger Messung und nach 60 Minuten Nachinkubation. Das Histogramm zeigt zwei charakteristische Unterschiede. Zum einen war bei fast gleich großem durchschnittlichen *tm* die Streuung in der Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> größer als durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein. Der Anteil von Zellen mit geringer Schädigung (*tm*=0 bis 3) war ohne Nachinkubation durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um 20 Prozentpunkte höher, aber es traten auch mehr stark geschädigte Zellen auf (bis zu einem *tm* > 50). Zum anderen ergab die Nachinkubation, daß der Anteil an gering geschädigten Zellen (*tm* 0 bis 3) bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein von 46 auf 88 % zunahm, nur wenig Zellen mit stärkeren Schäden auftraten und damit die Streuung insgesamt gering war.



**Abb. 15:** Individuelle DNA-Schäden in menschlichen Fibroblasten nach einstündiger Inkubation mit S-Bioallethrin [1 mmol/l] mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25 µmol/l]. Im Anschluß wurde zu unterschiedlichen Zeiten (0 und 60 Minuten) in serumhaltigem Medium nachinkubiert.

### 3.1.6 Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

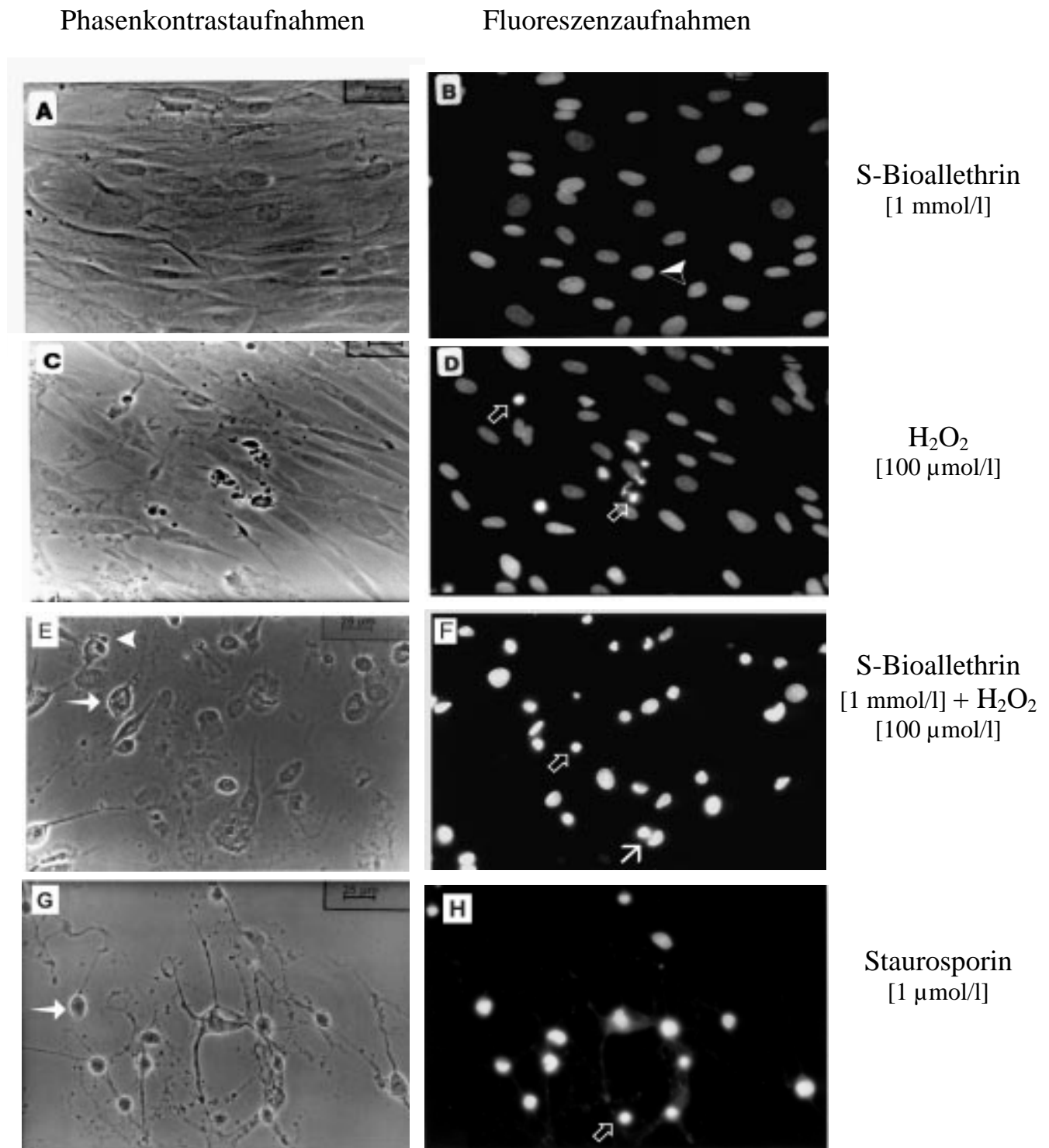
Die Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte im Gegensatz zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein ein genotoxisches Potential im Kometen-Assay, das erst 21 Stunden nach Behandlung beobachtet wurde und mit dem Verlust von Zellen verbunden war. Es wurde untersucht, ob ein apoptotischer oder nekrotischer Zelltod induziert wurde.

### 3.1.6.1 Veränderung der Zellmorphologie, Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der Zellkerne (DAPI)

Morphologische Merkmale von Apoptose sind mikroskopisch nachweisbar durch Veränderungen der Zellmembran (Abschnürung von Bläschen: *apoptotic bodies*), Schrumpfung des Zellkerns, Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung. Bei Nekrose wird mikroskopisch ein Anschwellen der Zellen und zytoplasmatischen Organellen beobachtet. Durch Lyse der Organellen und schließlich der Zelle selbst werden die Inhalte der Organellen freigesetzt.

Die Veränderung innerhalb der Zellkerne wurde durch einen DNA-bindenden Farbstoff (DAPI) beobachtet und die verschiedenen fluoreszierenden Zellkernformen ausgezählt. Parallel wurde die Veränderung der Zellmorphologie mit Phasenkontrastaufnahmen fotografisch dokumentiert. Wurden die Zellen für eine Stunde mit den Substanzen (ohne Nachinkubation in serumhaltigem Medium) inkubiert, ergaben sich ab Konzentrationen von 50  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  mit und ohne S-Bioallethrin geringe Abweichungen der Zellmorphologie im Vergleich zu den Kontrollen. Die Zellen zogen sich während der Begiftung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  leicht, mit S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  stärker zusammen (nicht dargestellt). Die DAPI-Färbung ergab keine Veränderung der Kerne durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Abbildung 16 stellt die Veränderung der Zellmorphologie und die dazugehörigen mit DAPI gefärbten Kerne von Fibroblasten nach einer Erholungsphase von 21 Stunden dar. Die Zellen wurden für eine Stunde mit S-Bioallethrin [1 mmol/l], 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt. Als positive Kontrolle wurden Zellen für 21 Stunden mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Staurosporin (in MEM/12 % FCS) behandelt. Staurosporin ist ein Proteinkinase C-Inhibitor und in vielen Zellen Apoptose auslösendes Agens (Fujita-Yamaguchi und Kathuria, 1988). Die Phasenkontrastaufnahmen ergaben, daß durch eine S-Bioallethrin-Behandlung allein keine Veränderungen in Zellmorphologie auftraten (Abb. 16 A). Durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Abb. 16 C) wurde eine geringe Veränderung beobachtet, die in Kombination mit S-Bioallethrin (Abb. 16 E ) stark zunahm. Nach der Behandlung mit S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  bildeten die Zellkörper Bläschen (gekennzeichnet mit  $\rightarrow$ ). Vereinzelt zeigten sich kleinere Bläschenbildungen an diesen Zellkörpern (gekennzeichnet mit  $\blacktriangleright$ ) und der Zellrasen zeigte zudem keine zusammenhängende Struktur mehr. Die Gesamtzellzahl nahm in der Kombination S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  im Vergleich zu den Einzelkomponenten um ca. 50 % ab. Ein ähnliches Bild der Zellmorphologie ergab die Behandlung mit Staurosporin wobei die Zellzahlabnahme noch größer war (Abb. 16 G). Auch hier kam es zu einer deutlichen Bläschenbildung ( $\rightarrow$ ), wobei die Bläschen, ausgelöst durch S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , volu-

minöser erschienen. Die dazugehörigen mit DAPI gefärbten Kerne zeigten im Fluoreszenzmikroskop drei verschiedene Formen. In Abbildung 16 sind diese gekennzeichnet mit, (▶) für normale, ungeschädigte Zellkerne (Abb. 16 B), (⌘) für kondensierte (stark fluoreszierende) Zellkerne (Abb. 16 D, F) und (↯) für fragmentierte Zellkerne (Abb. 16 F). Die Behandlung mit S-Bioallethrin allein veränderte die Zellkerne nicht (Abb. 16 B). Durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein konnten kondensierte, stark fluoreszierende Zellkerne beobachtet werden (Abb. 16 D), die in Kombination mit S-Bioallethrin stark zunahmen und daneben noch fragmentierte Zellkerne auftraten (Abb. 16 F). Staurosporin löste ebenfalls eine Kondensation der Zellkerne aus.



**Abb. 16:** Einfluß von S-Bioallethrin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. Staurosporin auf die Zell- und Zellkern-Morphologie von Fibroblasten. Die Staurosporin-Behandlung betrug 21 Stunden in MEM/12 % FCS. Die anderen Proben wurden für eine Stunde inkubiert mit anschließender 21-stündiger *recovery phase* in MEM/12 % FCS. (A), (C), (E) zeigen Phasenkontrastaufnahmen; (B), (D), (F) Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden mit DAPI gefärbten Kerne.

Phasenkontrastaufnahmen:

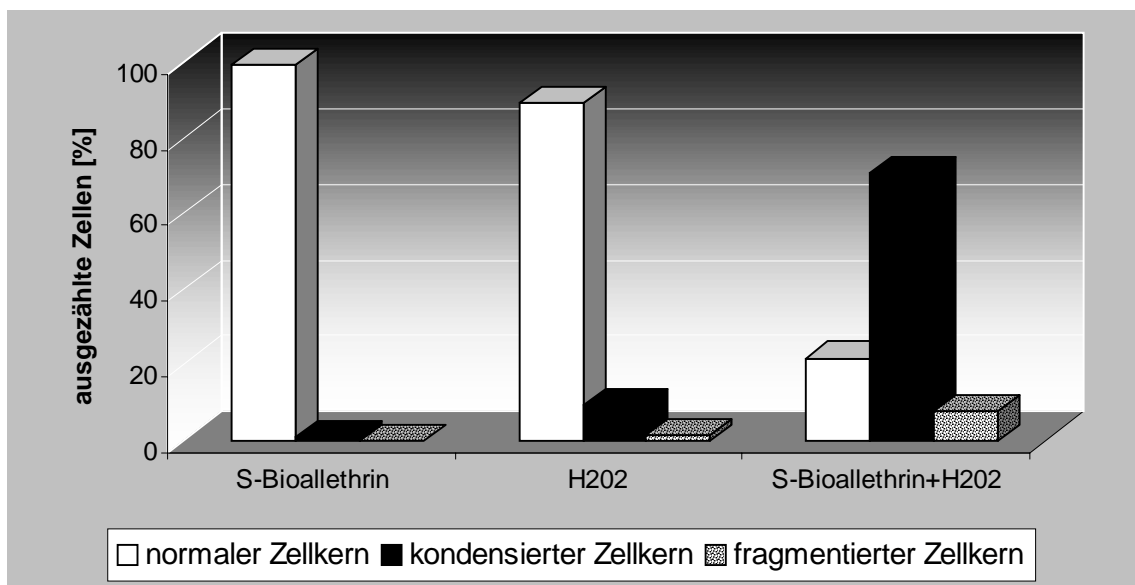
- Bläschenbildung
- ▶ Bläschenbildung am Zellkörper

Fluoreszenzaufnahmen:

- ▶ normaler Zellkern
- ↗ kondensierter Zellkern
- ↘ fragmentierter Zellkern



Bei der quantitativen Erfassung der drei Zellkernmorphologien ließ sich - im Vergleich zu S-Bioallethrin und  $H_2O_2$  allein - eine starke Abnahme von ungeschädigten Zellkernen in der Kombination S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  feststellen (Abb. 17). Während für S-Bioallethrin allein 1 %, für  $H_2O_2$  allein 9,5 % kondensierte Zellkerne ausgezählt wurden, lag der prozentuale Wert in der Kombination bei 70,6 %. Der Anteil an fragmentierten Zellkernen war in der Kombination S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  ebenfalls höher (7,6 %) als bei den Einzelkomponenten ( $H_2O_2$ : 1,3 %; S-Bioallethrin: 0 %).

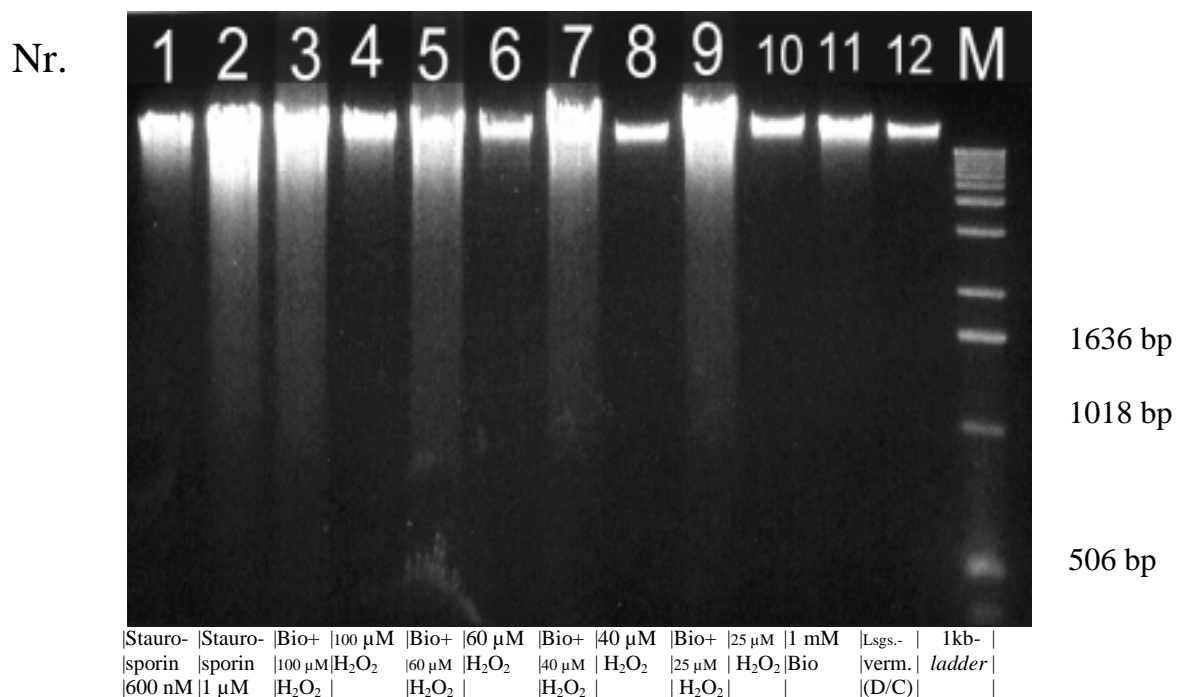


**Abb. 17:** Einfluß von S-Bioallethrin [1 mmol/l],  $H_2O_2$  [100  $\mu$ mol/l] und S-Bioallethrin [1 mmol/l]/ $H_2O_2$  [100  $\mu$ mol/l] auf die Zellkernmorphologie menschlicher Fibroblasten. Die Zellen wurden für eine Stunde inkubiert und anschließend für 21 Stunden in MEM/12 % FCS weiterkultiviert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und der Anteil an Zellkerntypen prozentual dargestellt. Lösungsvermittler allein veränderte die Zellmorphologie nicht.

### 3.1.6.2 Induktion einer „DNA-Leiter“ durch $H_2O_2$ bzw. S-Bioallethrin/ $H_2O_2$

Zur weiteren Charakterisierung von apoptotischen Prozessen wurde das Auftreten konkreter DNA-Fragmente („DNA-Leiter“) mittels Gelelektrophorese untersucht. Abbildung 18 dokumentiert die Auftrennung von genomischer DNA aus Fibroblasten im Agarosegel. Die Zellen wurden eine Stunde mit S-Bioallethrin [1 mmol/l],  $H_2O_2$  [25-100  $\mu$ mol/l] bzw. S-Bioallethrin [1 mmol/l]/ $H_2O_2$  [25-100  $\mu$ mol/l] behandelt und danach 21 Stunden in MEM/12 % FCS weiterkultiviert. Die Behandlungsdauer mit Staurosporin [600 und 1000 nmol/l] betrug standardmäßig 21 Stunden in MEM/ 12 % FCS. Es konnte bei keiner Probe eine „DNA-Leiter“ beobachtet werden, auch nicht durch Staurosporin. Der Lösungsvermittler allein verursachte

ebenfalls keine DNA-Fragmentierung, d. h. die DNA war in einer einzigen diskreten Bande lokalisiert (Nr. 12). S-Bioallethrin (Nr. 11) führte zu einer geringen DNA-Fragmentierung, erkennbar durch die Bildung eines „DNA-Schmiers“ aus den Geltaschen heraus. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein führte ebenfalls zu einer geringen DNA-Fragmentierung, die konzentrationsabhängig zunahm (Nr.10, 8, 6, 4). Alle Proben, die mit S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden, zeigten einen deutlichen „DNA-Schmier“ auf (Nr. 3, 5, 7, 9), der ebenfalls mit steigenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen zunahm. Dieser „Schmier“ trat auch bei einer Staurosporin-Konzentration von 1 µmol/l (Nr.2) und weniger ausgeprägt bei 600 nmol/l (Nr. 1) auf.



**Abb. 18:** Einfluß von Staurosporin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin auf die Auslösung einer DNA-Fragmentierung. Fibroblasten wurden eine Stunde mit S-Bioallethrin [1 mmol/l] mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25-100 µmol/l] in serumfreiem Medium inkubiert (Staurosporinbehandlung 21 Stunden in MEM/12 % FCS). Anschließend wurde 21 Stunden in MEM/12% FCS weiterkultiviert und danach die DNA isoliert.

Es wurde untersucht, ob durch Veränderungen der Versuchsbedingungen eine DNA-Leiter nachweisbar war. Dabei wurden folgende Variationen vorgenommen:

- Nachinkubationszeit in serumhaltigem Medium:
  - a) 4, 5, 21 Stunden: variable H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (25-100 µmol/l) mit und ohne 1 mmol/l S-Bioallethrin
  - b) 24, 48, 68, 72, 105 Stunden: 100 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit und ohne 1 mmol/l S-Bioallethrin
- Konzentrationsvariation:

- a)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in höheren Konzentrationen: 100-800  $\mu\text{mol/l}$  (21 Stunden Nachinkubation)
- b) Staurosporin in höheren Konzentrationen: 0,6-2  $\mu\text{mol/l}$  (21 Stunden Begiftung)
- Modifikation der Methode:

Es wurde untersucht, ob eine Trennung von apoptotischen, nekrotischen und nicht geschädigten Zellen möglich ist um eine Aufkonzentrierung von apoptotischen Zellen zu erreichen. Dazu wurden drei Fraktionen aus einer Petrischale hergestellt bestehend aus:

  - a) Zellen, die abgelöst waren und sich im Überstand des serumhaltigen Mediums befanden.
  - b) Zellen, die nur ca. eine Sekunde trypsinisiert wurden und nach dem Absaugen des Trypsins kurz mit Medium überschichtet und aufgenommen wurden.
  - c) Dem verbleibenden Zellrasen, der mit einem Schaber aufgenommen wurde.

Diese Auftrennung erfolgte nach einstündiger Behandlung mit S-Bioallethrin [1 mmol/l] mit und ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  [100  $\mu\text{mol/l}$ ] und anschließender *recovery phase* von 72 Stunden. Die Staurosporin-Behandlung [1,5  $\mu\text{mol/l}$ ] dauerte 21 Stunden. Die Aufbereitung der Zellfraktionen erfolgte dann wie unter 2.2.8 beschrieben.

In keinem Fall der durchgeführten Variationen war eine DNA-Leiter nachweisbar, weder für Staurosporin noch für  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zusammenfassend konnte festgestellt werden:

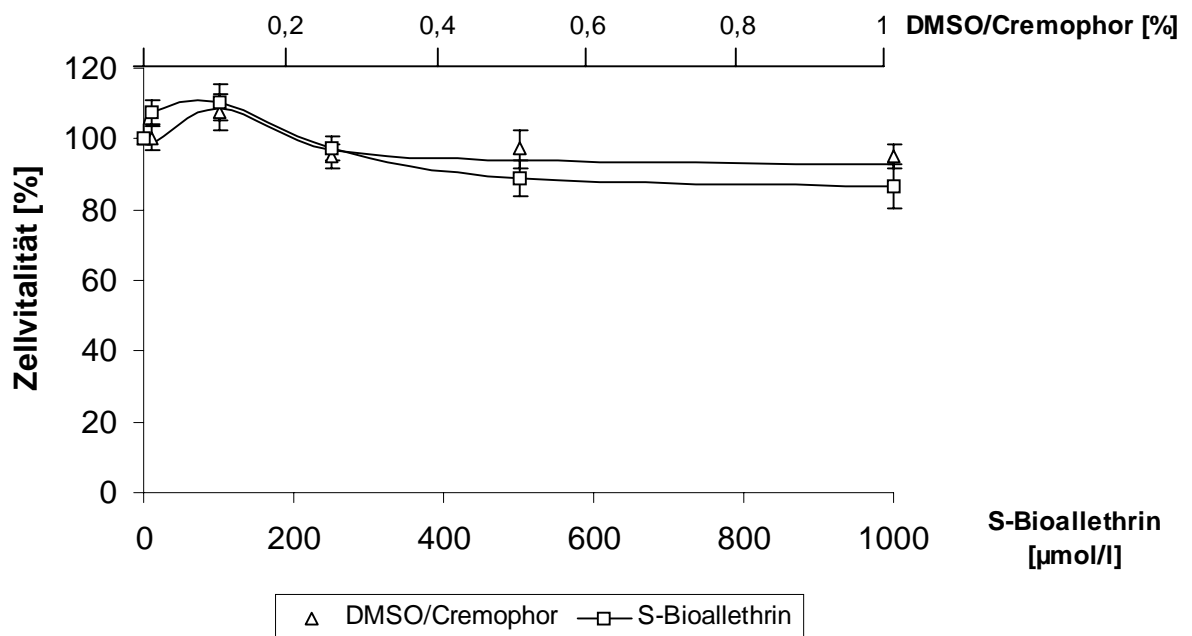
- In der Kombination S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  war bis zu einer Nachinkubationsphase von 5 Stunden kein „DNA-Schmier“ zu beobachten. Erst nach 21 Stunden zeigte sich dieser Effekt.
- Staurosporin als *trigger* für Apoptose erzeugte keine charakteristische „DNA-Leiter“. Untersuchungen mit Staurosporin bis 2  $\mu\text{mol/l}$  ergaben eine konzentrationsabhängige Zunahme des „DNA-Schmiers“ bei 21-stündiger Schadstoffbehandlung.
- Eine konzentrationsabhängige Zunahme des „DNA-Schmiers“ konnte auch bei höheren  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bis 800  $\mu\text{mol/l}$  festgestellt werden.
- Eine Verlängerung der Nachinkubationsdauer auf 48, 68, 105 Stunden brachte keine Verstärkung der beobachteten Effekte.
- Die Auftrennung der Zellen in drei Fraktionen ergab, daß sich der „DNA-Schmier“ in zwei Fraktionen befand: einmal in dem Überstand des Zellmediums und zum zweiten in einer Fraktion von Zellen, die sich sehr schnell ablösten (sehr kurze Trypsinierdauer) (Daten nicht gezeigt).

## 3.2 Einfluß von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Astrozyten

### 3.2.1 Zytotoxizitätstest (MTT-Assay)

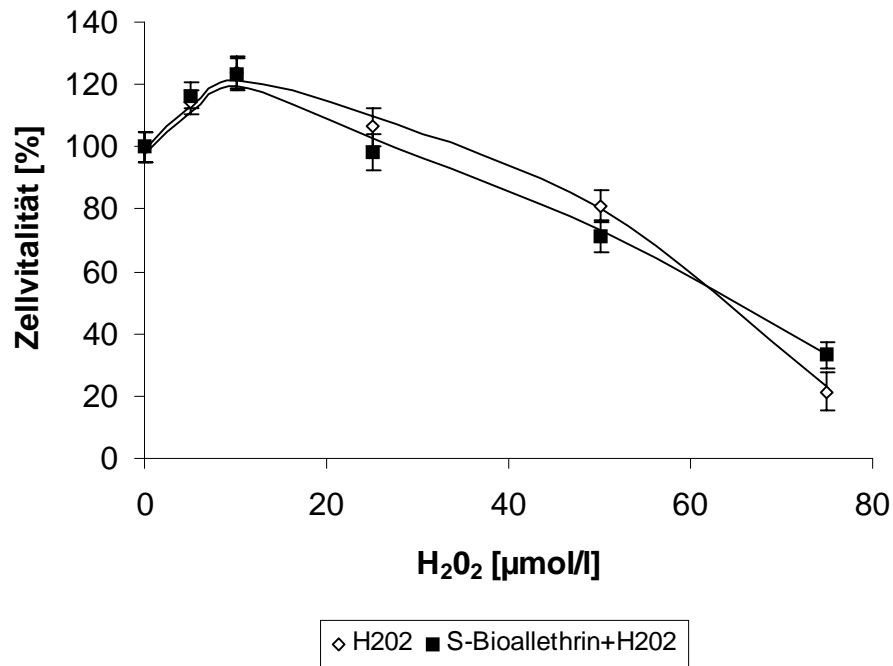
#### 3.2.1.1 Toxizität der Substanzen direkt nach Schadstoffeinwirkung (akute Toxizität)

Abbildung 19 zeigt die Vitalität von Astrozyten nach einstündiger Behandlung mit S-Bioallethrin [10-1000 µmol/l] und der dazugehörigen Kontrolle (Lösungsvermittler). Der Lösungsvermittler allein reduzierte die Zellvitalität, selbst bis zum höchsten eingesetzten Anteil von 1 %, nicht. S-Bioallethrin wirkte geringfügig toxisch. Es ergaben sich bei 1 mmol/l S-Bioallethrin Zellvitalitätsverluste um 10 %.



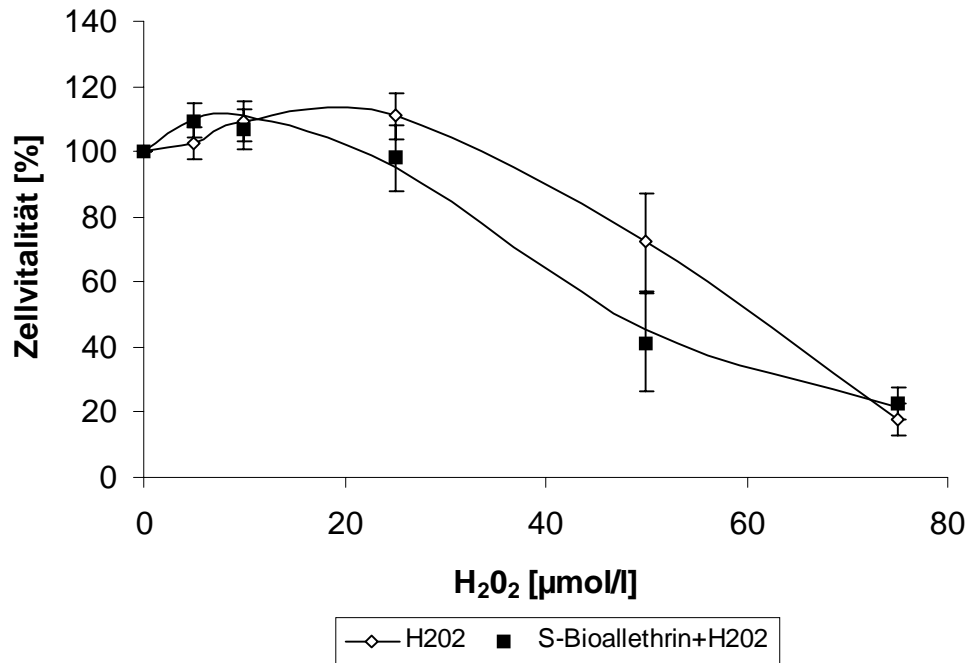
**Abb. 19:** Zellvitalität von Astrozyten nach einstündiger Inkubation mit S-Bioallethrin [10-1000 µmol/l] und Lösungsvermittler in DMEM/0,5 % FCS. S-Bioallethrin [1 mmol/l] enthielt 0,5 % DMSO und 0,5 % Cremophor. Bei geringeren S-Bioallethrin-Konzentrationen entsprechend weniger.

Der Zellvitalitätsverlust durch die Kombination von 500 µmol/l S-Bioallethrin mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [0-75 µmol/l] nach einer Stunde Inkubation ergab keinen Unterschied zu der Wirkung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein (Abb. 20). In einem Konzentrationsbereich von 75 bis 200 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blieb die Reduzierung der Zellvitalität konstant bei 80 % und zeigte keine weiter Abnahme (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 20:** Zellvitalität von Astrozyten nach einstündiger Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-75 µmol/l] mit bzw. ohne S-Bioallethrin [500 µmol/l] in DMEM/0,5 % FCS. S-Bioallethrin allein reduzierte die Zellvitalität um 14 %.

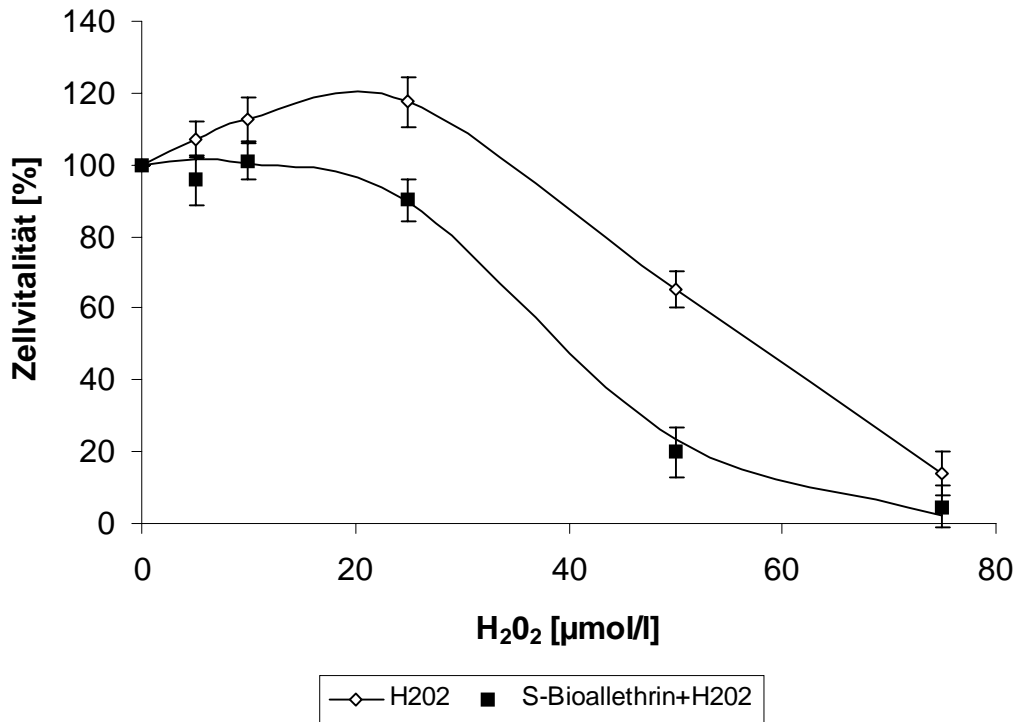
Es wurde untersucht, welchen Einfluß eine höhere S-Bioallethrin-Konzentration von 1 mmol/l in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellvitalität von Astrozyten ausübt. Abbildung 21 zeigt die Vitalität von Astrozyten nach einstündiger Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-75 µmol/l] mit und ohne 1 mmol/l S-Bioallethrin. Es konnte eine geringe Zunahme der akuten Toxizität durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein festgestellt werden.



**Abb. 21:** Zellvitalität von Astrozyten nach einstündiger Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-75 µmol/l] mit bzw. ohne S-Bioallethrin [1 mmol/l] in DMEM/0,5 % FCS. Die Schädigung durch S-Bioallethrin allein betrug 8 %.

### 3.2.1.2 Toxizität der Substanzen nach einer Erholungsphase

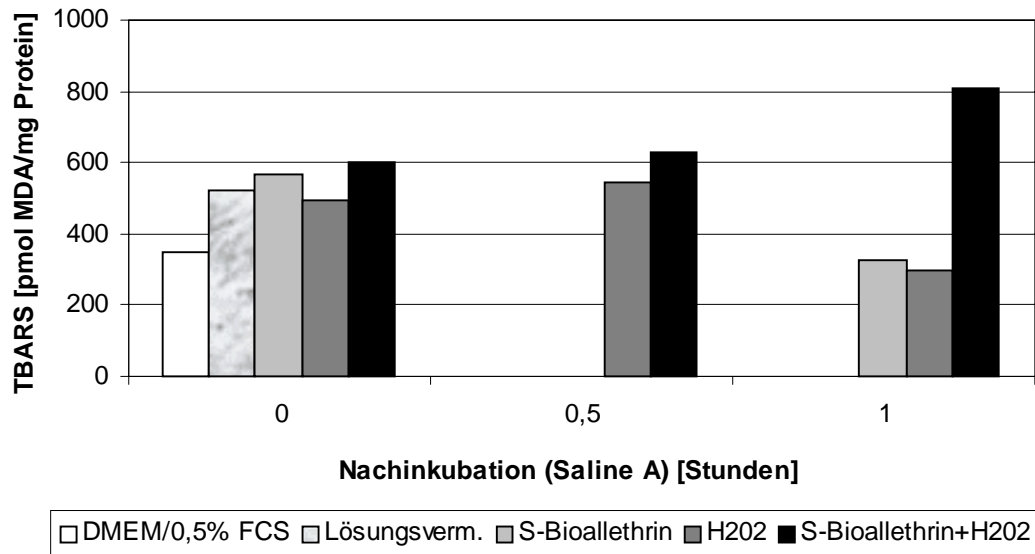
Durch eine 21-stündige Nachinkubation in serumhaltigem Medium wurde bei Experimenten mit Fibroblasten eine starke Zunahme der Toxizität von S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Einzelwirkung gemessen. Der Einfluß einer *recovery phase* auf die Toxizität bei Astrozyten ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Zellen wurden eine Stunde mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-75 µmol/l] mit bzw. ohne S-Bioallethrin [1 mmol/l] behandelt und für 21 Stunden in DMEM/10 % FCS nachinkubiert. Der toxische Effekt durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verstärkte sich signifikant in der Kombination mit S-Bioallethrin. Die NOEC von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkte in der Kombination mit S-Bioallethrin eine Abnahme der Vitalität um 40 %.



**Abb. 22** : Zellvitalität von Astrozyten nach einstündiger Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-75 µmol/l] in Abwesenheit und Kombination von S-Bioallethrin [1 mmol/l] in DMEM/0,5 % FCS. Die Zellen wurden anschließend für 21 Stunden in DMEM/10 % FCS weiterkultiviert. S-Bioallethrin allein verursachte keinen Vitalitätsverlust.

### 3.2.2 Induktion von Lipidperoxidation (TBA-Test)

Zur Untersuchung der Lipidperoxidation in Astrozyten wurden Zellen für eine Stunde mit 1 mmol/l S-Bioallethrin mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µmol/l] behandelt. Anschließend wurden die TBARS direkt oder im Anschluß an eine Nachinkubation von 0,5 und 1 Stunde in Saline A bestimmt. Die Konzentration der TBARS war direkt nach einstündiger Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> annähernd so hoch, wie in der Lösungsvermittler-Kontrolle (Abb. 23). Das gleiche galt auch, wenn im Anschluß an die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 0,5 Stunden in Saline A nachinkubiert wurde. Im Falle einer Nachinkubation in Saline A bis zu einer Stunde wurden die TBARS um 30 % erhöht und zwar nur in der Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie S-Bioallethrin allein zeigten im Laufe der Nachinkubation in Saline A hingegen eine 40 %-ige Abnahme von TBARS. Eine weitere Nachinkubation in Medium, analog zu den Versuchsbedingungen bei Fibroblasten, erwies sich als zu toxisch auf Astrozyten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 23:** TBA-reaktive Substanzen in Astrozyten nach einstündiger Behandlung mit S-Bioallethrin [1 mmol/l] mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µmol/l] in DMEM/0,5 % FCS. Die Werte wurden direkt oder nach 0,5 und 1 Stunde Nachinkubation in Saline A gemessen. Unter den Versuchsbedingungen betrug der Fehler ± 10 %.

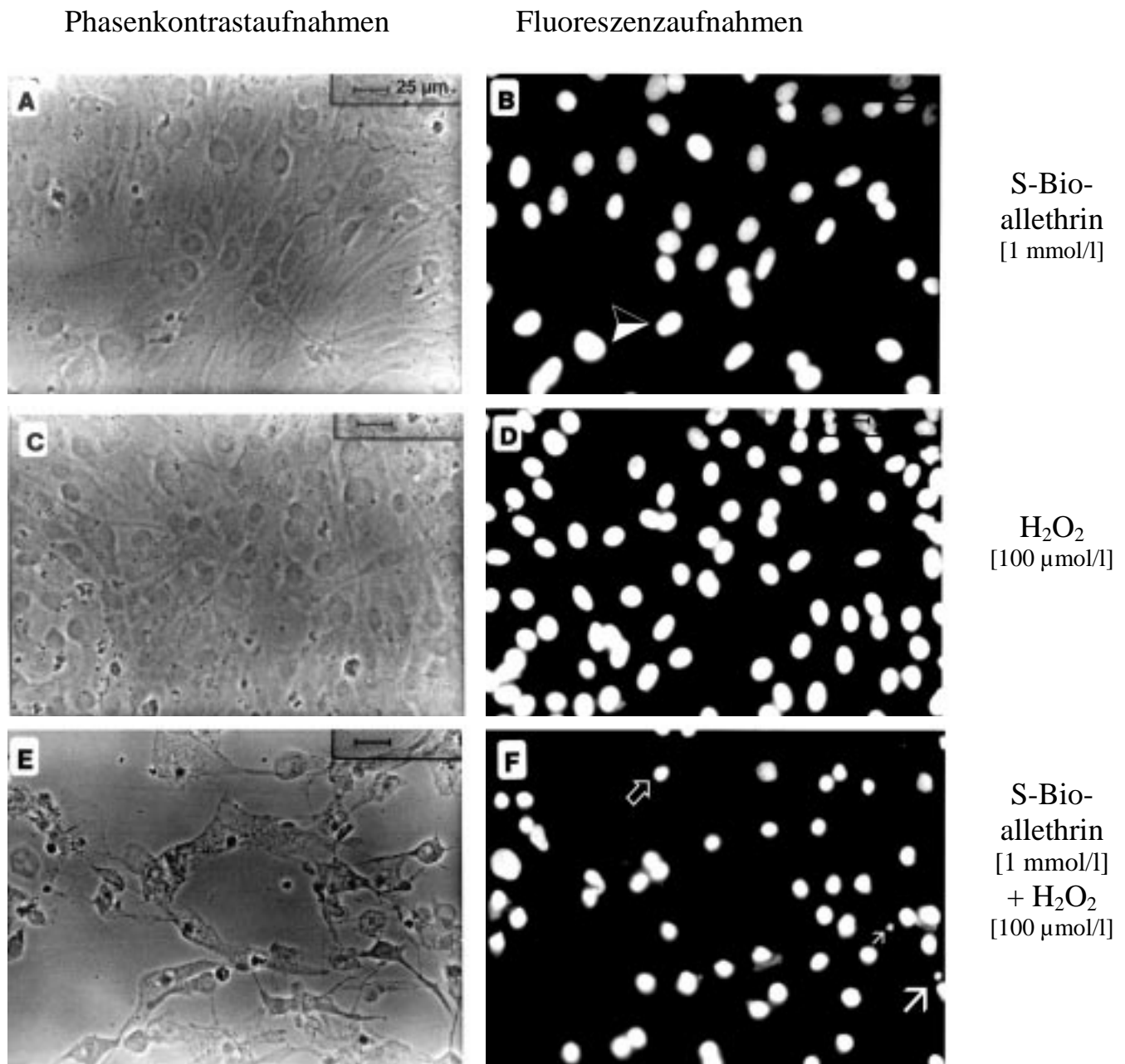
### 3.2.3 Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 3.2.3.1 Veränderung der Zellmorphologie, Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der Zellkerne (DAPI)

Die Veränderung der Zellmorphologie durch einstündige Schadstoffbehandlung und einer anschließenden 21-stündigen *recovery phase* ist in Abbildung 24 dargestellt. Dabei wurden Phasenkontrastaufnahmen und die dazugehörigen Fluoreszenzaufnahmen mit DAPI gefärbten Kernen dokumentiert. Durch eine Behandlung mit 1 mmol/l S-Bioallethrin (Abb. 24 A und B) alleine bzw. durch die eingesetzte Lösungsvermittler-Konzentration (nicht dargestellt) wurden keine Veränderungen der Zellmorphologie, auch nicht der mit DAPI gefärbten Kerne (Abb. 24 B ►), festgestellt. Die Behandlung mit 100 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 24 C und D) ergab bei einigen Zellen eine geringe Abweichung in der Gestalt der mit DAPI gefärbten Kerne im Vergleich zu der Kontrolle. Die Gesamtzellzahl verringerte sich dabei nicht. In Kombination von 100 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit 1 mmol/l S-Bioallethrin kam es zu einer starken Veränderung der Zellmorphologie durch Bläschenbildung (Abb. 24 E) sowie zu einer starken Abnahme der Gesamtzellzahl. Die DAPI- gefärbten Zellkerne (Abb. 24 F) zeigten im Vergleich zu den



Kontrollen ebenfalls deutliche Abweichungen in ihrer Form. Es traten sowohl kondensierte (Abb. 24 F ↗) als auch fragmentierte (Abb. 24 F ↘) Zellkerne auf.

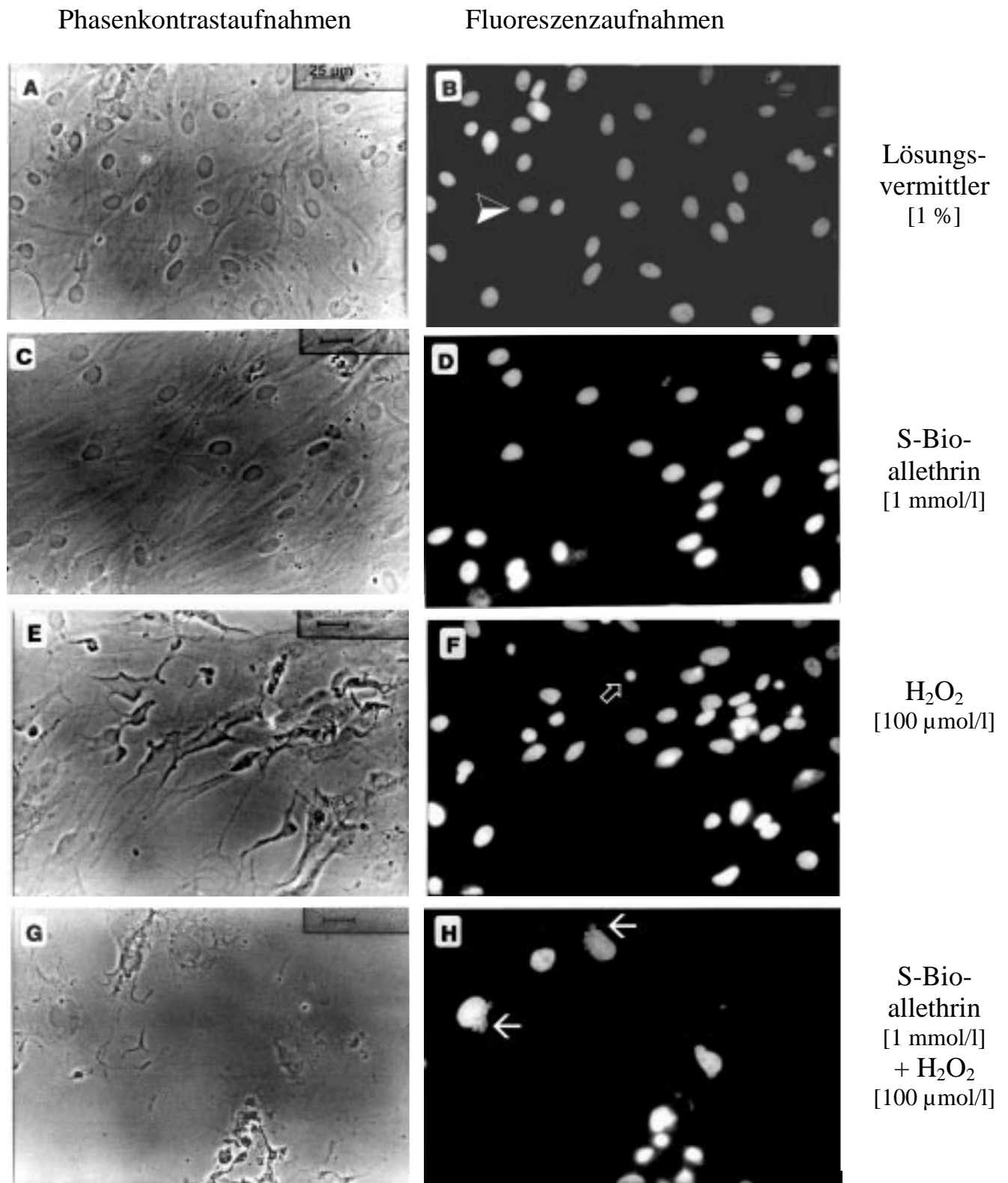


**Abb. 24:** Zell- und Zellkern-Morphologie von Astrozyten nach Behandlung mit S-Bioallethin allein,  $H_2O_2$  oder S-Bioallethin/ $H_2O_2$  für eine Stunde und anschließender Erholungsphase von 21 Stunden. (A), (C), (E), zeigen Phasenkontrastaufnahmen; (B), (D), (F) Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden mit DAPI gefärbten Kerne.

Fluoreszenzaufnahmen:

- ▶ normaler Zellkern
- ↗ kondensierter Zellkern
- ↘ fragmentierter Zellkern

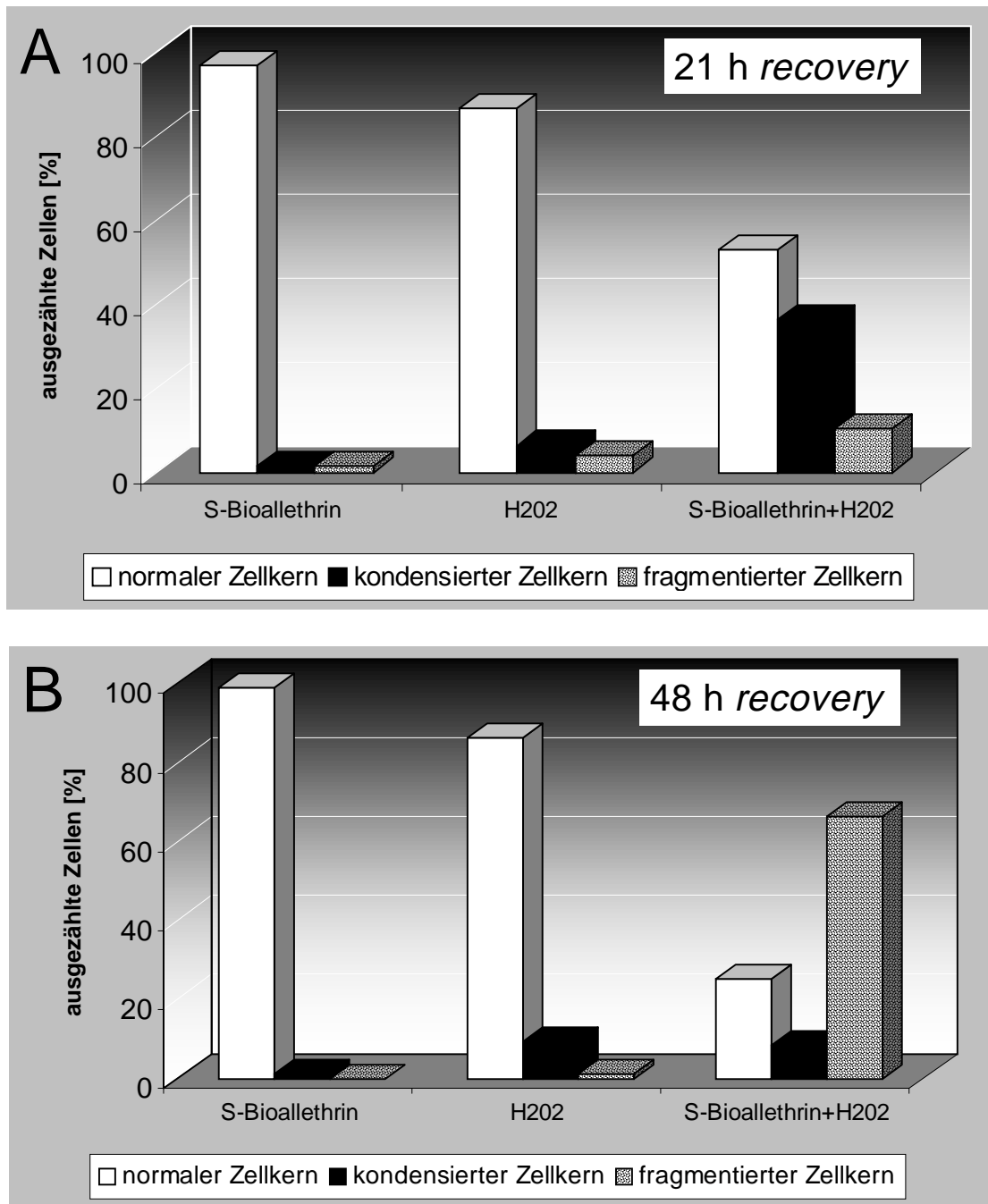
Eine Verlängerung der *recovery phase* auf 48 Stunden ergab eine Veränderung der Zell- und Zellkernmorphologie, die in Abbildung 25 durch Phasenkontrastaufnahmen und den dazugehörigen Fluoreszenzaufnahmen mit DAPI gefärbten Kernen dargestellt ist. Die behandelten Zellen mit S-Bioallethrin und Lösungsvermittler allein (Abb. 25 A und C) wiesen keine Veränderung in der Zellmorphologie sowie der mit DAPI gefärbten Kerne (Abb. 25 B und D) auf. Die Behandlung mit 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  allein ergab eine deutliche Veränderung in Zellmorphologie (Abb. 25 E), mit ausgefranstem Zellkörpern und Zellverlusten. Die gefärbten Zellkerne (Abb. 25 F) zeigten ebenfalls Abweichungen in ihrer Form. Es traten kondensierte Kerne auf (Abb. 25 F ↗). In Kombination mit S-Bioallethrin zeigten sich noch drastischere Schäden sowohl in der Zellmorphologie (Abb. 25 G) als auch bei den gefärbten Kernen (Abb. 25 H). Der sonst konfluente Zellrasen wies große Löcher auf. An den Zellkörpern bildeten sich Bläschen, die auch vereinzelt zwischen den Zellen vorkamen. Die gefärbten Kerne zeigten deutliche Abschnürungen an den Membranen (Abb. 25 H →) sowie kondensierte und fragmentierte Zellkerne.



**Abb. 25:** Zell- und Zellkern-Morphologie von Astrozyten nach Behandlung mit S-Bioallethin allein,  $H_2O_2$  oder S-Bioallethin/ $H_2O_2$  für eine Stunde und anschließender Erholungsphase von 48 Stunden. (A), (C), (E),(G) zeigen Phasenkontrastaufnahmen; (B), (D), (F), (H) Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden mit DAPI gefärbten Kerne. Fluoreszenzaufnahmen:

- ▶ normaler Zellkern
- ↗ kondensierter Zellkern
- ← Abschnürungen am Zellkern

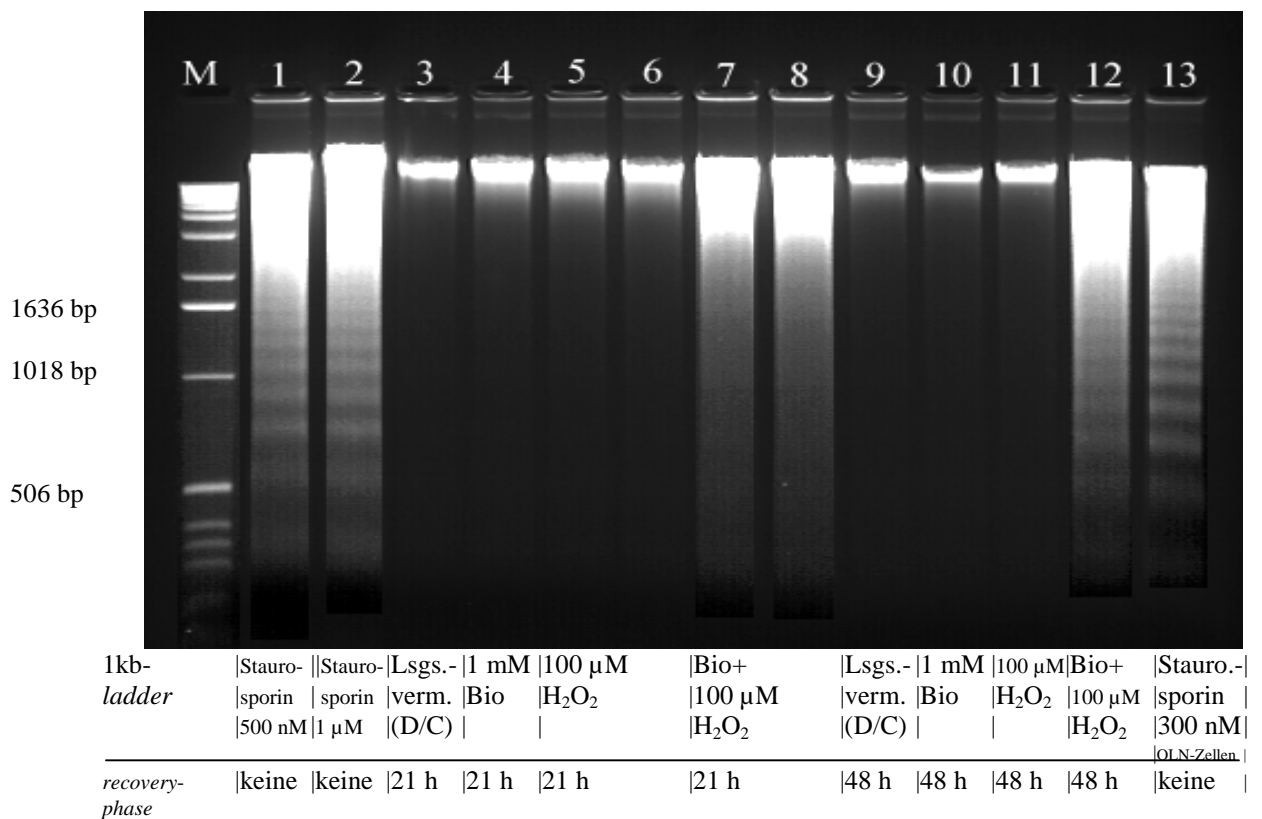
Nach 21 Stunden *recovery phase* ergab die quantitative Auswertung der drei unterschiedlichen Zellkerntypen eine deutliche Abnahme von ungeschädigten Zellkernen durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich zu S-Bioallethrin bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein (Abb. 26 A). Während für S-Bioallethrin allein 1,56 % und für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein 6,4 % kondensierte Zellkerne ausgezählt wurden, lag der prozentuale Wert in der Kombination bei 36,5 %. Der Anteil an fragmentierten Kernen war in der Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ebenfalls höher (10,5 %) als bei den Einzelsubstanzen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 4 % und S-Bioallethrin: 1,59 %). Wurde die *recovery phase* auf 48 Stunden erhöht, ergab die Quantifizierung der Zellkernmorphologie eine starke Abnahme von ungeschädigten Kernen in der Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowohl im Vergleich zu den Einzelkomponenten (Abb. 26 B) als auch im Vergleich zu der kürzeren *recovery phase* von 21 Stunden. (Abb. 26 A). Der Anteil kondensierter Zellkerne induziert durch S-Bioallethrin allein lag bei 1 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein bei 9,5 % und in der Kombination leicht unter dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Wert bei 8,37 %. Der Anteil an fragmentierten Zellkernen war in der Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sehr hoch (auch gegenüber der 21-stündigen Nachinkubation) und lag bei ca. 66 %, im Vergleich zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein mit 1,3 %. S-Bioallethrin allein führte zu keiner Fragmentierung der Zellkerne.



**Abb. 26:** Einfluß von S-Bioallethrin [1 mmol/l], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µmol/l] und S-Bioallethrin [1 mmol/l]/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µmol/l] auf die Zellkernmorphologie von Astrozyten. Die Zellen wurden für eine Stunde inkubiert und anschließend für 21 (A) oder 48 (B) Stunden in DMEM/10 % FCS weiterkultiviert. Die Zellen wurden mit DAPI gefärbt, im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und der Anteil an Zellkerntypen prozentual dargestellt. Lösungsvermittler allein veränderte die Zellmorphologie nicht.

### 3.2.3.2 Induktion einer „DNA-Leiter“ durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

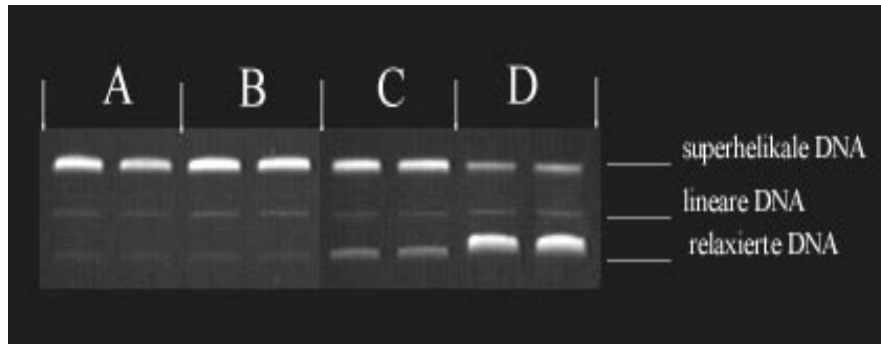
Astrozyten wurden für eine Stunde mit der Kombination S-Bioallethrin [1 mmol/l]/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µmol/l] sowie mit den Einzelsubstanzen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µmol/l] und S-Bioallethrin [1 mmol/l] behandelt. Im Anschluß folgte eine Nachinkubation (21 und 48 Stunden) in DMEM/0,5 % FCS. Darüber hinaus wurden Astrozyten mit Staurosporin [0,5-1 µmol/l] für 21 Stunden inkubiert. Unter gleichen Bedingungen wurden OLN-93 Zellen (permanente Zelllinie: ursprünglich aus einer Gliazell-Primärkultur des Rattenhirns stammend) mit 0,3 nmol/l Staurosporin behandelt. Letztere Probe diente als Kontrolle des Versuchsablaufs, da hier im Gegensatz zu Astrozyten bekannt war, daß durch eine Staurosporinbehandlung eine DNA-Fragmentierung ausgelöst wird. Aus Abbildung 27 geht hervor, daß durch eine Staurosporinbehandlung eine DNA-Fragmentierung in Astrozyten und OLN-93 Zellen induziert wurde (Nr. 1, 2, 13). Darüber hinaus zeigte sich in der Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit anschließender *recovery phase* von 48 Stunden eine „DNA-Leiter“ (Nr. 12). Bei einer kürzeren Nachinkubationszeit von 21 Stunden konnte in der Kombination eine Zunahme der Fragmentierung beobachtet werden, die jedoch nicht als „DNA-Leiter“ sondern als „DNA-Schmier“ sichtbar wurde. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und die Kontrollen führten sowohl nach 21- als auch 48-stündiger Nachinkubation zu keiner DNA-Fragmentierung.



**Abb. 27:** Einfluß von Staurosporin, S-Bioallethrin, S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Auslösung der DNA-Fragmentierung. Astrozyten wurden für eine Stunde mit S-Bioallethrin [1 mmol/l] mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 μmol/l] in DMEM/0,5 % FCS inkubiert. Anschließend wurde für 21 oder 48 Stunden in DMEM/0,5 % FCS weiterkultiviert. Staurosporin wurde für 21 Stunden inkubiert.

### 3.3 DNA-Strangbruchbildung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, S-Bioallethrin/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. Pyrethrine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in nativer PM2 DNA

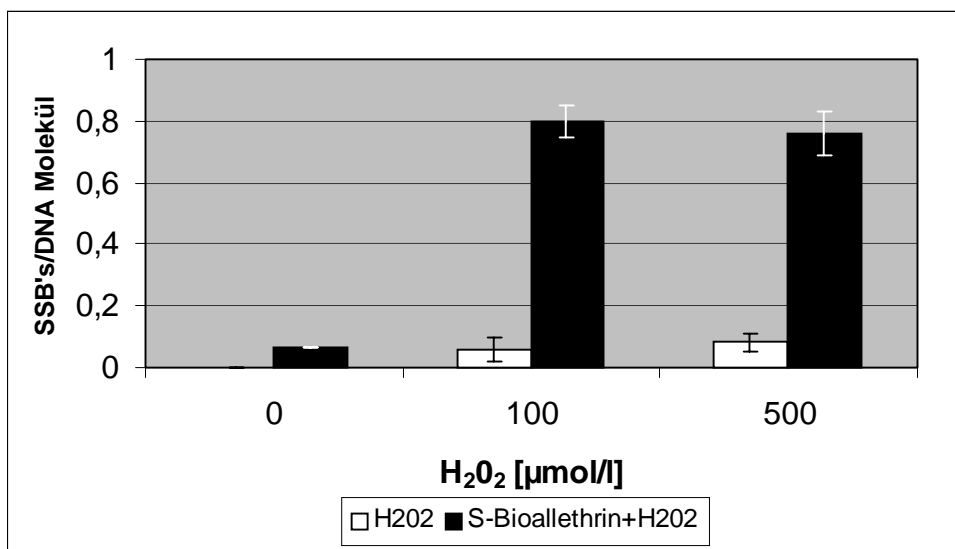
Einzelstrangbrüche überführen die zirkuläre superhelikale DNA in die zirkuläre relaxierte Form. Doppelstrangbrüche führen zu linearer PM2 DNA, die zu einem geringen Teil in der nativen DNA vorhanden war. Diese verschiedenen Konformationen können im Agarosegel getrennt und über die Quantifizierung der relaxierten und superhelikalen Form, die Anzahl der Strangbrüche/DNA Molekül bestimmt werden. 1 mmol/l S-Bioallethrin allein (B) erhöhte den Anteil von relaxierter DNA im Vergleich zur nativen DNA (A) nicht. Durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 μmol/l] allein (C) kam es zu einer leichten Zunahme von relaxierter DNA, die dann verstärkt in Kombination mit 1 mmol/l S-Bioallethrin (D) beobachtet wurde (Abb. 28).



**Abb. 28:** Induktion von PM2 DNA Konformationen im Agarosegel. Native DNA (A), S-Bioallethrin [1 mmol/l] (B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µmol/l] (C), S-Bioallethrin [1 mmol/l]/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µmol/l] (D). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C in NaPO<sub>4</sub>-Puffer [100 mmol/l].

### 3.3.1 Strangbruchinduktion durch variable H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen bei konstanter S-Bioallethrin-Konzentration

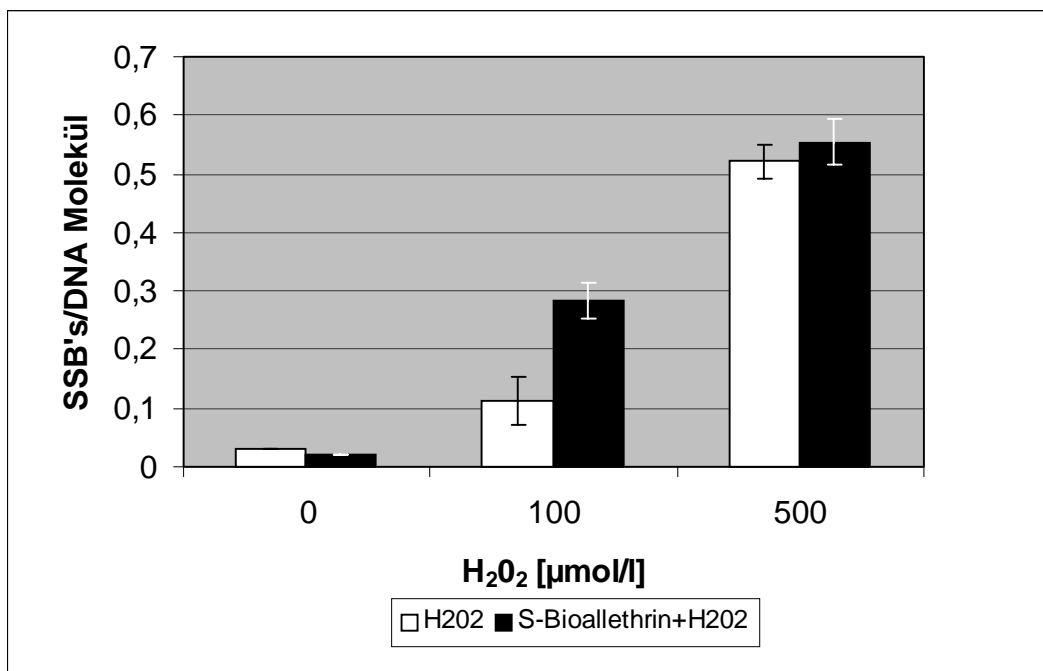
Die einstündige Inkubation von nativer PM2 DNA mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 und 500 µmol/l] mit und ohne 1 mmol/l S-Bioallethrin ergab bei beiden Konzentrationen eine Zunahme der Strangbrüche um den Faktor 8 durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein.



**Abb. 29:** Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 und 500 µmol/l] mit und ohne S-Bioallethrin [1 mmol/l] bei 37 °C und einer Stunde Inkubationszeit in NaPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7,24. Der Lösungsvermittleranteil betrug 0,1 %. Die native DNA enthielt 0,04 SSB's/DNA Molekül. Dieser Wert wurde bei allen Proben abgezogen.



Wurden 10fach niedrigere S-Bioallethrin-Konzentrationen eingesetzt (Abb. 30), so wurde immer noch eine 3fach höhere Strangbruchzahl in der Kombination im Vergleich zu 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  allein gemessen. Bei 500  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  waren kaum Unterschiede zwischen Einzel- und Kombinationswirkung meßbar. Es fällt auf, daß bei diesen Untersuchungen die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Wirkung höher als in Abbildung 29 war. Daraus ist zu schließen, daß der erhöhte Lösungsvermittler-Anteil für die Hemmung der  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierten Strangbrüche in Abbildung 29 entscheidend ist. Für DMSO sind Radikalfängereigenschaften beschrieben (Klein *et al.*, 1981).

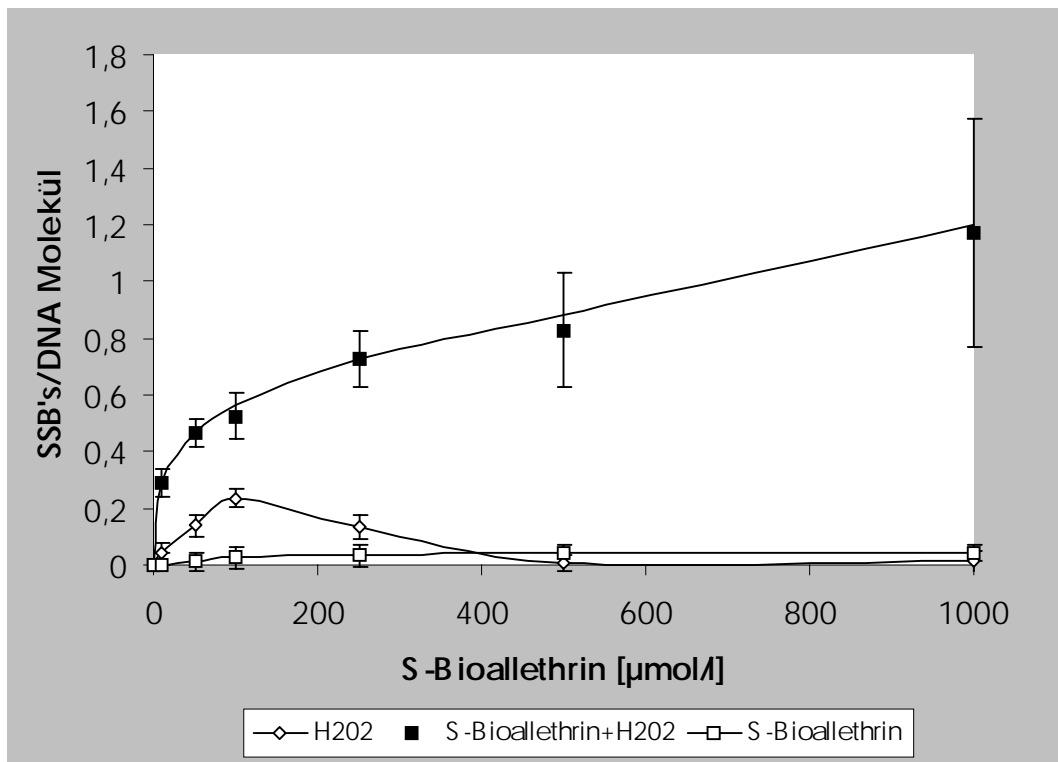


**Abb. 30:** Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  [100 und 500  $\mu\text{mol/l}$ ] mit und ohne S-Bioallethrin [100  $\mu\text{mol/l}$ ] bei 37 °C und einer Stunde Inkubationszeit in  $\text{NaPO}_4$ -Puffer, pH 7,24. Der Lösungsvermittleranteil betrug 0,01 %. Die native DNA enthielt 0,05 SSB'/DNA Molekül. Dieser Wert wurde bei allen Proben abgezogen.

### 3.3.2 Strangbruchinduktion durch variable S-Bioallethrin-Konzentrationen bei konstanter $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration

Abbildung 31 zeigt die Strangbruchinduktion in PM2 DNA durch S-Bioallethrin [10-1000  $\mu\text{mol/l}$ ] mit und ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  [100  $\mu\text{mol/l}$ ]. S-Bioallethrin allein verursachte kaum meßbare Schäden von 0,003 bis 0,043 SSB's/DNA Molekül. Ebenfalls geringe Schäden wurden durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein hervorgerufen. Es kam jedoch zu einer Erhöhung der Strangbrüche mit

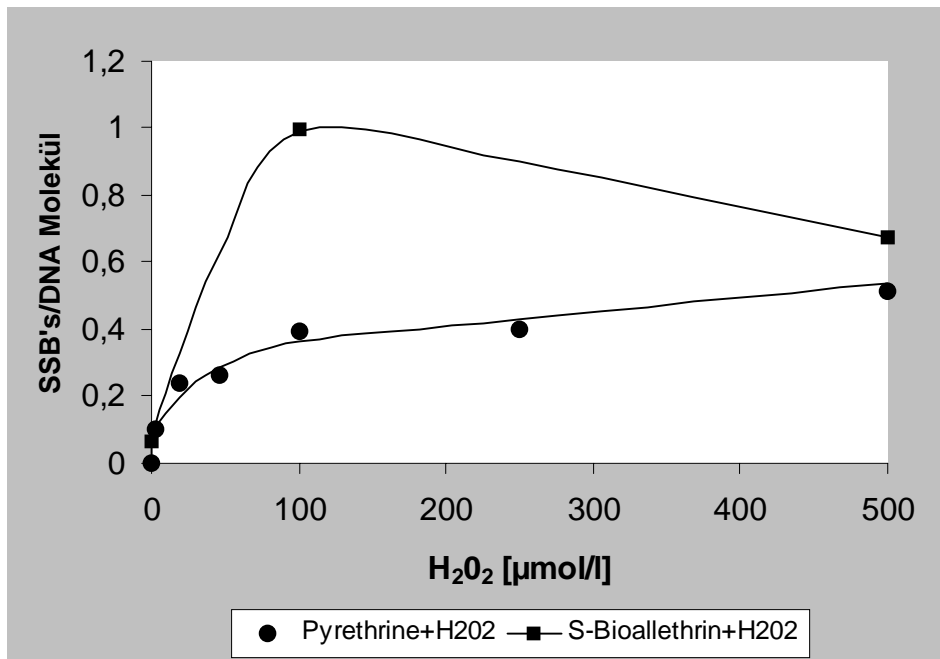
ansteigender S-Bioallethrin-Konzentration in Kombination mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf maximal 1,2 SSB's/DNA Molekül.



**Abb. 31:** Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch S-Bioallethrin [10-1000  $\mu\text{mol/l}$ ] mit und ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  [100  $\mu\text{mol/l}$ ] bei 37 °C und einer Stunde Inkubationszeit in  $\text{NaPO}_4$ -Puffer, pH 7,24. Die Kontrollkurve mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist mit dargestellt. Die native DNA enthielt 0,045 SSB's/DNA Molekül. Dieser Wert wurde bei allen Proben abgezogen.

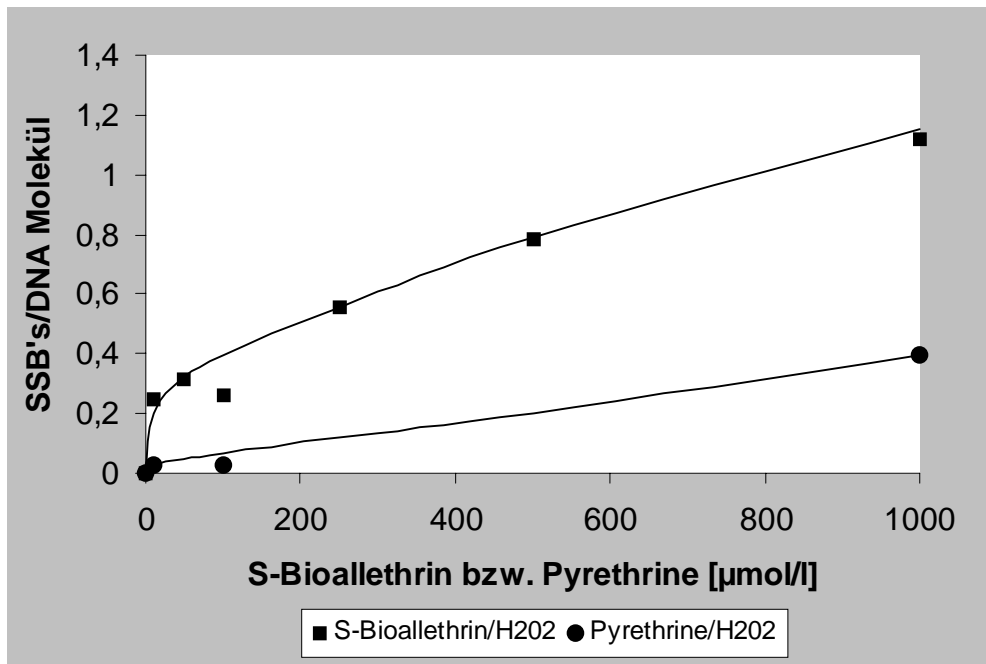
### 3.3.3 Strangbruchinduktion durch Pyrethrine/ $\text{H}_2\text{O}_2$ im Vergleich zu S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$

Um zu untersuchen, ob durch die natürlich vorkommenden Pyrethrine im Pyrethrum-Extrakt ebenfalls Strangbrüche in Kombination mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziert werden, wurde PM2 DNA mit Pyrethrum-Extrakt [1 mmol/l] und  $\text{H}_2\text{O}_2$  [5-500  $\mu\text{mol/l}$ ] inkubiert und mit den Effekten von S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  verglichen. Abbildung 32 zeigt, daß auch durch Pyrethrine im Pyrethrum-Extrakt in Kombination mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  DNA-Strangbrüche induziert werden, jedoch in geringerem Maße als durch S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Es wurden durch Pyrethrine/ $\text{H}_2\text{O}_2$  maximal 0,5 (bei 500  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und durch S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  maximal 1,0 SSB's/DNA Molekül (bei 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) induziert.



**Abb. 32:** Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch S-Bioallethrin [1 mmol/l] bzw. technisches Gemisch Pyrethrine [1 mmol/l] mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5-500 µmol/l] bei 37 °C und einer Stunde Inkubationszeit in NaPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7,24. Dargestellt sind die absoluten Effekte durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. Pyrethrine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abzüglich der SSB's/DNA Molekül durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein.

Ein Vergleich der Strangbrüche durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Pyrethrine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei konstanter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration ist in Abbildung 33 dargestellt. Mit steigender S-Bioallethrin- bzw. Pyrethrine-Konzentration verstärken sich die DNA-Schäden durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bis auf 1,0 SSB/DNA Molekül und nehmen weniger stark durch Pyrethrine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bis auf 0,4 SSB's/DNA Molekül zu.



**Abb. 33:** Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch S-Bioallethrin [10-1000  $\mu\text{mol/l}$ ] bzw. Pyrethrine mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  [100  $\mu\text{mol/l}$ ] bei 37 °C und einer Stunde Inkubationszeit in  $\text{NaPO}_4$ -Puffer, pH 7,24. Dargestellt sind die absoluten Effekte durch S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. Pyrethrine/ $\text{H}_2\text{O}_2$  abzüglich der SSB's/DNA Molekül durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein.

## 4 Diskussion

Pyrethrum und die synthetischen Pyrethroide besitzen eine geringe akute Humantoxizität. Dies begründet u. a. die weit verbreitete Anwendung dieser Substanzklasse. Die kommerzielle und private Nutzung von Pyrethroiden kann zu einer chronischen Exposition insbesondere in Innenräumen führen. Daher gilt es, sehr sorgfältig das toxische Potential dieser Substanzklasse zu erfassen. Hierzu gehören auch mögliche Kombinationswirkungen mit anderen Noxen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welcher Weise sich die toxische Wirkung von S-Bioallethrin unter Einfluß von oxidativem Streß verändert. Oxidativer Streß kann im Organismus unter verschiedenen Bedingungen wie chronische Entzündungen, erhöhte Exposition gegenüber Radikalbildnern, nach übermäßiger sportlicher Betätigung und möglicherweise durch psychischen Streß entstehen (Hartmann *et al.*, 1994; Moller *et al.*, 1996; Tsang *et al.*, 1996; Ikeda *et al.*, 1999). Es wurde dabei die zyto- und genotoxische Einzelwirkung von S-Bioallethrin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (als Erzeuger von oxidativem Streß) allein sowie deren Kombinationseffekte untersucht. Als Testsystem wurden zum einen nicht spezialisierte humane Fibroblasten und zum anderen Astrozyten des Rattenhirns ausgewählt. Ein Vergleich der Wirkungsweise auf diese beiden Zelltypen ist ausgehend von der Problematik der Pyrethroide, die insbesondere das Nervensystem betreffen, von Bedeutung. Dabei sind Astrozyten unter anderem wegen ihres hohen antioxidativen und damit Neuronen vor oxidativem Streß schützenden Potentials relevant. Zudem kommen sie durch ihre Beteiligung an der Blut-Hirnschranke potentiell schneller als andere Gehirnzellen mit Pyrethroiden in Berührung.

### 4.1 Einzelwirkung von S-Bioallethrin

#### 4.1.1 Wirkung auf Fibroblasten

Auf humane Fibroblasten erwies sich S-Bioallethrin allein bei der Bestimmung zur akuten Toxizität bis zur meßbaren Konzentration von 1 mmol/l als nicht zytotoxisch. Untersuchungen mit einer anschließenden *recovery phase* von 21 Stunden erwiesen sich ebenfalls als nicht toxisch. Auch die Koloniebildungsfähigkeit wurde nicht herabgesetzt. Diese nicht zytotoxi-

sche Wirkung von S-Bioallethrin im mmolaren Bereich war überraschend, da bekannt ist, daß bei Substanzen mit hoher Lipophilie auch eine hohe Zytotoxizität zu erwarten ist (Freese *et al.*, 1979; Halle *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu reduzierte S-Bioallethrin schon in niedrigen Konzentrationen (ab 0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) das Zellwachstum. Die Toxizitätskurve nahm dabei einen biphasischen Verlauf, was auf unterschiedliche Schäden bzw. Schäden, die sich überlagern, deutet. Dabei erwies sich die Ermittlung der NOEC als sehr schwierig und differierte in verschiedenen Experimenten. Die Wachstumshemmung durch S-Bioallethrin im  $\mu\text{molaren}$  Bereich ist für dieses Testsystem, im Vergleich zu anderen lipophilen Substanzen, ungewöhnlich hoch. Nach einer Methode von Meylan und Howard (1995) beträgt der berechnete  $\log P_{\text{ow}}$  von S-Bioallethrin 5,52. Dicofol und Pentachlorphenol besitzen einen ähnlich hohen  $\log P_{\text{ow}}$ , wobei für diese Substanzen die NOEC in der Bestimmung des Zellwachstums mit zwei Zehnerpotenzen höher nachgewiesen wurde (Witte *et al.*, 1995b). Dies deutet darauf hin, daß S-Bioallethrin spezifisch toxisch in Prozesse des Zellwachstums eingreift. In der Literatur sind akut zytotoxische Effekte von S-Bioallethrin nicht beschrieben. Bei einer 72-stündigen Einwirkung stellten Diel *et al.* (1999) jedoch fest, daß durch S-Bioallethrin im  $\mu\text{molaren}$  Bereich eine dosisabhängige Abnahme der Proliferation (MTT-Assay) in menschlichen T-Lymphozyten verursacht wird. Die Ursache der zytotoxischen Effekte wurde dabei nicht untersucht.

Die Bestimmung des Zellwachstums ist eine sehr sensitive Methode und erfaßt andere Parameter als beispielsweise die Messung der Zellvitalität (Witte *et al.*, 1995a). Mit Hilfe der Messung des Zellwachstums können zyto- und genotoxische Schäden ermittelt werden, die nicht zu einer sofortigen Zellschädigung führen müssen. Hierzu zählen Schäden, die die Zellteilung bzw. die vorausgehende DNA-Replikation betreffen. Neben genotoxischen Ereignissen können auch epigenetische Wirkungen wie die Hemmung der DNA-Reparatur oder der Proteinsynthese zu einer verzögerten Zellteilung führen. Eine Beeinträchtigung des Zellwachstums kann sich auch auf den Spindelapparat beziehen, der beispielsweise eine Konjugation von Substrat mit den Spindelproteinen bewirkt. In V79-Zellen konnten durch die Pyrethroide Fenvalerat, Deltamethrin, Cypermethrin, Permethrin und Cyfluthrin eine Inhibition des Zellzyklusses während der Mitose festgestellt werden. Dieses wurde auf eine Störung des Spindelapparats zurückgeführt, die zu einer Hemmung der Zellteilung führte und auch die Koloniebildungsfähigkeit beeinträchtigte (Hadnagy *et al.*, 1999). Diese Effekte scheinen für S-Bioallethrin jedoch nicht zuzutreffen, da die Koloniebildungsfähigkeit nicht beeinträchtigt wurde. Die beobachtete Hemmung der Teilungsfähigkeit im akut untoxischen Kon-

zentrationbereich muß also auf reversible Schäden zurückgeführt werden, die innerhalb von 14 Tagen reparabel sind.

Zur Untersuchung einer Lipidperoxidation wurde der Thiobarbitursäure (TBA)-Test durchgeführt. Der Test erfaßt nicht nur Malondialdehyd (MDA) als Endpunkt des Lipidperoxidationsprozesses in der Zelle, sondern auch Aldehyde, die sich während der Testprozedur aus primären und sekundären Produkten der Lipidperoxidation bilden. Daher ist die Bezeichnung Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) üblich (Gutteridge und Halliwell, 1990). Durch S-Bioallethrin allein konnte keine Induktion von TBARS nachgewiesen werden. Da eine Lipidperoxidation insbesondere in den Membranen stattfindet, sind membran-assoziierte Enzyme anfälliger gegenüber LPO-Schäden als Enzyme, die sich im Zytosol befinden. Insbesondere wurde dies für die Succinat-Dehydrogenase, einem Enzym der Mitochondrienmembran, das als Marker-Enzym die Zellvitalität im MTT-Assay widerspiegelt, festgestellt (Jacobi *et al.*, 1999). S-Bioallethrin zeigte keine Effekte auf die membran-assoziierte Succinat-Dehydrogenase, was mit den negativen Befunden der LPO korrespondiert. Untersuchungen der Zellmorphologie nach einstündiger Behandlung mit S-Bioallethrin ergaben im Phasenkontrastmikroskop keine Abweichungen gegenüber den Kontrollen.

S-Bioallethrin erzeugte weder im Kometen-Assay nachweisbare DNA-Schäden noch eine Veränderung der Zellkernmorphologie, ebensowenig eine Fragmentierung der DNA bei den Untersuchungen zur Induktion von Apoptose. Die Induktion von Apoptose ist in der Literatur für Deltamethrin beschrieben. Bei adulten Ratten führte eine Behandlung mit Deltamethrin (tägliche Gabe von 1 mg/kg für 21 Tage) zu Apoptose im Hodengewebe (El-Gohary *et al.*, 1999). Enan *et al.* (1996) konnten eine durch Deltamethrin induzierte Apoptose *in vivo* und *in vitro* nachweisen. In Mäusen führte die Behandlung von Deltamethrin in Abhängigkeit von der Konzentration und der Behandlungsdauer zu einer Thymus-Atrophie. Dabei wurde beispielsweise 24 Stunden nach einer Gabe von 25 mg Deltamethrin/kg Körpergewicht Apoptose nachgewiesen. In Thymuszellkulturen induzierte Deltamethrin (50 µmol/l) nach 24-stündiger Schadstoffbehandlung ebenfalls Apoptose (Enan *et al.*, 1996). Apoptose wurde auch im Gehirn (Hippocampus und Cortex) von Ratten dokumentiert, wenn diese mit einer einmaligen Dosis von 12,5 mg Deltamethrin/kg Körpergewicht (intraperitoneal) behandelt wurden (Wu und Liu, 2000). In einer weiterführenden Studie wurde eine durch Deltamethrin veränderte Expression von P53, Bax und Bcl-2 im Rattenhirn nachgewiesen und im Zusammenhang mit dem apoptotischen Absterben der Zellen diskutiert (Wu *et al.*, 2000). Deltamethrin gehört im

Gegensatz zu S-Bioallethrin zu den Pyrethroiden mit  $\alpha$ -Cyano-Gruppe, die im allgemeinen toxischer auf Insekten und Säugetiere wirken und für die andere Schadensmechanismen aufgezeigt wurden als für Pyrethroide ohne  $\alpha$ -Cyano-Gruppe (Lawrence und Casida, 1982; Casida *et al.*, 1983).

#### 4.1.2 Wirkung von S-Bioallethrin auf Astrozyten im Vergleich zu Fibroblasten

Astrozyten erwiesen sich ähnlich unempfindlich gegenüber S-Bioallethrin wie Fibroblastenkulturen. Bis zu einer Konzentration von 1 mmol/l S-Bioallethrin konnte in Astrozyten eine geringe, vernachlässigbare Hemmung der Zellvitalität gemessen werden.

Alle anderen Toxizitätsparameter (LPO, Veränderung der Zellmorphologie sowie Zellkernmorphologie und Induktion von Apoptose), die in dieser Arbeit mit Astrozyten durchgeführt wurden, zeigten keine Effekte durch S-Bioallethrin allein. Bei den Untersuchungen zur Lipidperoxidation zeigten Astrozyten ein stärkeres LPO-Grundlevel (um ca. 50 %) als Fibroblasten. Das Grundlevel an gebildeten LPO-Produkten bei nativen Hepatozyten ist ebenfalls höher als bei Fibroblasten, jedoch nicht so hoch wie in Astrozyten (Hammer *et al.*, 1997). Morphologisch charakterisieren Astrozyten zahlreiche Zellausläufer und Endfüße. Folglich könnten sie ein größeres Membranoberflächen/Volumen-Verhältnis als Fibroblasten besitzen. Da sich bei diesem Testsystem die LPO auf den Proteingehalt der Zelle bezieht, wäre unter der Annahme einer ähnlichen Lipidzusammensetzung die erhöhte LPO in Astrozyten erklärbar.

Aufgrund der zellspezifischen Eigenschaften eigneten sich die Methoden zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit (zu geringe *plating efficiency*), des Zellwachstums (zu geringe Kulturdichte bei der Begiftung) und der Nachweis von DNA-Schäden mit Hilfe des Kometen-Assays (zu hohe Individualschäden durch die Testprozedur) bei Astrozyten nicht. Die hohen Schäden können bei Astrozyten mit der Trypsinierungsart (siehe unter 2.2.1.2) zusammenhängen. Es ist bekannt, daß eine vergleichsweise längere Einwirkungsdauer von Trypsin auf die Zellen (Astrozyten: 3 min; Fibroblasten: 20-30 sec) zu der Ausbildung von Kometen führt (Singh *et al.*, 1991). Möglicherweise würde sich die Methode des Kometen-Assays bei Astrozyten eignen, wenn die Ablösung der Zellen bei mildereren Bedingungen durchgeführt werden könnte.



## 4.2. Einzelwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 4.2.1 Einfluß von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Fibroblasten

Die zyto- und genotoxische Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist in der Literatur gut beschrieben. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann durch Zellmembranen diffundieren und fern von dem Entstehungsort mit anwesenden Übergangsmetallen wie Eisen (II) und Kupfer (I), hochreaktive Hydroxylradikale bilden, die mit allen Bestandteilen der Zelle (Proteine, Lipide, DNA) reagieren können und dadurch Schäden verursachen.

Durch Einwirken von steigenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen wurde die Zellvitalität von Fibroblasten konzentrationsabhängig reduziert (Der EC<sub>50</sub>-Wert lag bei ca. 200 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Der zytotoxische Effekt von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist bereits bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellkulturen untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, daß Eisen-Chelatoren eine protektive Wirkung in bezug auf die Zytotoxizität und damit auf die •OH-Radikalbildung besitzen (Melho-Filho *et al.*, 1984). In anderen Arbeiten wurde ein Verlust der Zellvitalität auf die Oxidation von Glutathion und NAD(P)H auf Modifikationen der Thiolgruppen in Proteinen sowie ATP-Depletion zurückgeführt (Orrenius, 1993). Die Zellvitalität verminderte sich durch eine 21-stündige Nachinkubation in serumhaltigem Medium, wobei sich der EC<sub>50</sub>-Wert im Vergleich zur akuten Toxizität halbierte (Tab. 2). Dieses deutet auf Schäden hin, die sich erst nach längerer Zeit auswirken, und binnen der Nachinkubationszeit nicht repariert werden. Das wurde auch bei den Untersuchungen zur Koloniebildungsfähigkeit, bei denen irreversible Schäden erfaßt werden, bestätigt. Dort bildete sich im Gegensatz zur akuten Toxizität zwar bei geringen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen ein Schulterbereich aus, die Steilheit der Kurve im effektiven Bereich war jedoch wesentlich größer als bei der akuten Toxizität. Der EC<sub>50</sub>-Wert lag bei ¼ der akuten Toxizität. Bei der Methode zur Bestimmung des Zellwachstums, die als sehr sensitiv gilt, wurde der EC<sub>50</sub>-Wert bei einer noch geringeren Konzentration gemessen. In der NOEC der Koloniebildungsfähigkeit war das Zellwachstum fast vollständig gehemmt. Dies ist verständlich, da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> DNA-schädigend ist und sich auf die Replikation hemmend auswirkt (Li und Byrnes, 1999). Da die Koloniebildungsfähigkeit bei dieser Konzentration noch nicht reduziert war, scheinen trotz hoher Schädigung reversible Veränderungen stattzufinden.

Hydroxylradikale können die Fettsäuren von Membran-Phospholipiden angreifen und eine LPO auslösen, die darüber hinaus zu toxischen Carbonylverbindungen wie MDA oder 8-Hydroxy-2-nonenal führen (Halliwell und Gutteridge, 1989; Esterbauer *et al.*, 1989). Wurden die Zellen nach Schadstoffbehandlung direkt oder nach einer halben Stunde Nachinkubation in Saline A gemessen, war im Vergleich zu den Kontrollen kaum ein Effekt zu messen. Die Erhöhung der Nachinkubationszeit auf eine Stunde ergab einen 30 %igen Anstieg von TBARS. Die Erhöhung von LPO-Produkten nach einer Nachinkubation in Saline A wurde in der Literatur beschrieben (Jacobi *et al.*, 1999). Dabei wurden humane Fibroblastenkulturen für eine Stunde mit dem Antioxidans Propylgallat (PG) in Kombination mit einer untoxischen Kupfer (II)-Konzentration behandelt. Die verstärkte Zunahme der TBARS erfolgte erst nach einer einstündigen Nachinkubation in Saline A. Möglicherweise fehlen der Zelle dann die antioxidativen Substanzen des Kulturmediums, die einen Anstieg der LPO verhindern können.

Wurde an diese Behandlung noch eine *recovery phase* von 21 Stunden in serumhaltigem Medium durchgeführt, zeigte sich ein Anstieg des Grundlevels durch die veränderte Testprozedur, aber kein weiterer Anstieg der TBARS durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> innerhalb einer Stunde Nachinkubation in Saline A (Abb. 10). Der Lipidperoxidations-Status in den Zellen ist abhängig von der ständigen Oxidation von zellulären mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) und der nachfolgenden Detoxifizierung der LPO-Produkte (Halliwell und Gutteridge, 1989; Schaur *et al.*, 1991). Möglicherweise wird innerhalb einer *recovery phase* von 21 Stunden die vergleichsweise geringe Konzentration durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildeter TBARS abgebaut.

Neben den zytotoxischen Effekten wurde auch die Genotoxizität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untersucht. Bei der Ermittlung zur Induktion von DNA-Schäden konnte eine Zunahme von DNA-Einzelstrangbrüchen mit steigender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration beobachtet werden. Die genotoxische NOEC für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lag bei ca. 10 µmol/l, wenn die Zellen sofort nach der Behandlung gemessen wurden. Bei einer Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration um das Achtfache waren die DNA-Schäden zum Teil so stark, daß einige Zellen nicht mehr auswertbar waren. Im Kometen-Assay werden DNA-Schäden erfaßt, die entweder direkt zu Strangbrüchen führen oder über eine Alkalibehandlung in Einzelstrangbrüche überführt werden bzw. reparaturbedingte Strangbrüche sind (Speit und Hartman, 1995; 1999). Die starken Schäden waren nach einer *recovery phase* von 21 Stunden nicht mehr nachweisbar. Die zeitliche Abnahme des *tail moments* nach Schadstoffbehandlung gilt als indirekter Nachweis von DNA-Reparatur (Collins *et al.*, 1995). ROS-induzierte Einzelstrangbrüche werden in der Regel schnell repariert. Die Halbwertszeit ihrer

Reparatur beträgt nur wenige Minuten (Frankenberg-Schwager, 1989). Eines der Hauptprodukte bei der oxidativen DNA-Schädigung durch  $\cdot\text{OH}$ -Radikale, das 8-Hydroxyguanin, wird innerhalb der ersten 30 Minuten durch Basen-Exzision bis zu 50 % und nach ca. 4 Stunden komplett repariert (Jaruga und Dizdaroglu, 1996). Durch eine Nachinkubation von 60 Minuten wurden die durch 25  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  gesetzten Schäden um ca. 40 % reduziert. Bei einer ungefähr um den Faktor 3 höheren  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration waren nach einer 21 stündigen *recovery phase* keine Schäden mehr sichtbar. Collins *et al.* (1997) untersuchten mittels Kometen-Assays die Reparatur von oxidativen DNA-Schäden durch 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in humanen Lymphozyten. Die gemessenen Schäden waren dort nach 25 Stunden nicht mehr nachweisbar und entsprechen damit annähernd den Daten in dieser Arbeit.

Der Kometen-Assay ist eine sensitive Methode und eignet sich gut zur Erfassung von DNA-Schäden in individuellen Zellen (Östling und Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988). Es wurde durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen  $>40 \mu\text{mol/l}$  zum Teil sehr stark geschädigte DNA beobachtet. Diese Zellen konnten nicht mehr ausgewertet werden (Abb. 12). Es wurde untersucht, ob es sich dabei möglicherweise um wenige apoptotische Zellen handelte. Dieses konnte zum einen mit Hilfe von morphologischen Veränderungen der ganzen Zelle und separat des Zellkerns geklärt werden. Die Phasenkontrastaufnahmen ergaben durch 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  geringe Veränderungen gegenüber den Kontrollen, die durch Bläschenbildung gekennzeichnet war. Die dazugehörigen mit DAPI gefärbten Kerne ergaben bei der quantitativen Erfassung eine geringe Anzahl von kondensierten Zellkernen (Abb. 16). Im Falle einer Apoptose fragmentieren die Zellkerne zu kleinen Einheiten, deren Chromatin meistens eine starke Kondensation aufweist (Wyllie *et al.*, 1984). Zur Charakterisierung wurde das Auftreten einer „DNA-Leiter“ untersucht. Die Bedingungen, die zu einer Apoptose führen, können schadstoff- und zell-spezifisch sehr unterschiedlich sein. Deshalb wurden Versuche mit unterschiedlichen Nachinkubationszeiten und mit variablen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen durchgeführt. Dabei konnte in keinem Fall eine „DNA-Leiter“ festgestellt werden. Bei höheren  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (200-800  $\mu\text{mol/l}$ , 21 h *recovery*) konnte allerdings eine Zunahme von „DNA-Schmier“ beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Zunahme des „DNA-Schmiers“ wurde auch durch Stauroporin, einem Apoptose auslösenden Agens, beobachtet. Dieser „Schmier“ wird häufig bei Nekrose beobachtet, der aus einer unspezifischen DNA-Fragmentierung resultiert, mit zufällig gebildeten DNA-Bruchstücken unterschiedlicher Länge (Lieberthal *et al.*, 1996; El-Gohary *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 1999). Die apoptotische als auch nekrotische Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist gut untersucht, wobei sich zellspezifisch große Unterschiede zeigen. In humanen Fibroblasten der

Lunge (HFL-1-Zellen) induzierten geringe (analog zu Konzentrationen, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden)  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (10-100  $\mu\text{mol/l}$ ) Apoptose, während 1-10  $\text{mmol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  Nekrose auslöste (Teramoto *et al.*, 1999). Auch in einer Fibroblastenzelllinie (L929) konnte Gardner *et al.* (1997) bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen  $>10$   $\text{mmol/l}$  Nekrose, mit relativ frühen zytotoxischen Effekten nach 60-90 Minuten und dem Zelltod nach 2 Stunden, nachweisen. Wurden „moderate“  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (1  $\text{mmol/l}$  bis 10  $\text{mmol/l}$ ) verwendet, wurde Apoptose induziert. Dort wurden die zytotoxischen Effekte erst nach 8-24 Stunden nachgewiesen. In niedrigen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosen (0,1 und 0,5  $\text{mmol/l}$ ) wurde ein dritter Weg beschrieben, der auch zum Zelltod führte aber nicht mit der Induktion von Apoptose verbunden war. Es läßt sich zusammenfassen, daß in der Regel in proliferierenden Säugerzellkulturen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen von 0,5-1,0  $\text{mmol/l}$  Apoptose auslösen. Nekrotischer Zelltod wird bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen von 5,0-10,0  $\text{mmol/l}$  erwartet (Davies *et al.*, 1999).

#### 4.2.2 Einfluß von $\text{H}_2\text{O}_2$ auf Astrozyten im Vergleich zu Fibroblasten

In Tabelle 1 ist der Einfluß von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf Astrozyten und Fibroblasten aus den unterschiedlichen Toxizitätstests zusammengefaßt. Die ermittelten Daten werden im folgenden einzeln diskutiert.

Zellen Test	Fibroblasten		Astrozyten	
MTT	NOEC [ $\mu\text{mol/l}$ ]	EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	NOEC [ $\mu\text{mol/l}$ ]	EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{mol/l}$ ]
t <sub>0</sub>	5	200	25	60-65
t <sub>21</sub>	5	110	30	60
LPO-Zunahme [%] innerhalb 1 h Saline A bei 100 $\mu\text{mol/l}$ $\text{H}_2\text{O}_2$				
LPO	30		keine	
t <sub>21</sub>	30		nicht bestimmt	
Zellkerne [%] Zellkernmorphologie bei 100 $\mu\text{mol/l}$ $\text{H}_2\text{O}_2$				
normal (t <sub>21</sub> )	89		90	
(t <sub>48</sub> )	nicht bestimmt		89	
kondensiert (t <sub>21</sub> )	10		6	
(t <sub>48</sub> )	nicht bestimmt		10	
fragmentiert (t <sub>21</sub> )	1		4	
(t <sub>48</sub> )	nicht bestimmt		1	
„DNA-Leiter“	<u>nein</u> (in hohen Konz. „DNA-Schmier“)		<u>nein</u>	

**Tab. 1:** Zusammenstellung des Einflusses von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf Fibroblasten und Astrozyten in unterschiedlichen Toxizitätstest. NOEC- und EC<sub>50</sub>- Werte im Zellvitalitätstest, Induktion von LPO sowie Nachweis einer Apoptose.

Astrozyten tolerierten kleine  $H_2O_2$ -Konzentrationen besser als Fibroblasten. Obwohl  $H_2O_2$  die Fähigkeit besitzt, durch Membrane zu diffundieren (Halliwell und Gutteridge, 1989; Dizdaroğlu, 1992), ist es für eine hydrophile Substanz im allgemeinen schwerer, in die Zelle zu gelangen. Der ausgeprägte Schulterbereich bei  $H_2O_2$  im MTT-Assay von Astrozyten im Vergleich zu Fibroblasten deutet auf eine bessere Abwehr gegenüber der Substanz (z. B. antioxidative Abwehr, schlechte Aufnahme in die Zelle) und/oder auf eine gute Reparatur des gesetzten Schadens hin. Astrozyten können durch ihr antioxidatives Potential Neuronen vor oxidativem Streß schützen (Desagher *et al.*, 1996). Da insbesondere Neuronen sehr empfindlich auf oxidativen Streß reagieren, scheint dieser Befund verständlich (Halliwell, 1992; Hoyt *et al.*, 1997). Kleine  $H_2O_2$ -Konzentrationen zeigten zudem eine vitalitätssteigernde Wirkung auf Astrozyten. Es ist bekannt, daß sich geringe  $H_2O_2$ -Konzentrationen stimulierend auf das Wachstum in Säugerzellkulturen auswirken können (Burdon *et al.*, 1989; Davies, 1999). Durch geringe Gaben von  $H_2O_2$  [10 nmol/l-1  $\mu$ mol/l] in das Kulturmedium von Fibroblastenkulturen (Ratte und Hamster) wurde beispielsweise das Zellwachstum gesteigert (Burdon *et al.* 1989). Möglicherweise wird dadurch die antioxidative Kapazität (Enzyme) induziert (Mates, 2000).

Gegenüber höheren  $H_2O_2$ -Konzentrationen waren Astrozyten sensitiver als Fibroblasten. Während bei Astrozyten die Zytotoxizität direkt nach  $H_2O_2$ -Behandlung als auch nach einer 21-stündigen Erholungsphase identisch war, nahm die Zytotoxizität bei Fibroblasten innerhalb der *recovery phase* zu. Als Ursache der akuten Zytotoxizität kann zumindest bei Astrozyten die LPO nicht in Frage kommen, da in hoch zytotoxischen Konzentrationen keine LPO beobachtet wurde. Bei Fibroblasten sollte die LPO nicht ursächlich an der zytotoxischen Wirkung von  $H_2O_2$  beteiligt sein, da die Zunahme der Zytotoxizität innerhalb der Erholungsphase nicht mit einer Zunahme der LPO verbunden war.

Eine Veränderung der Morphologie von Astrozyten durch 100  $\mu$ mol/l  $H_2O_2$  nach 21-stündiger *recovery phase* konnte im Phasenkontrastmikroskop nicht festgestellt werden, obwohl hier keine Aktivität der Succinat-Dehydrogenase mehr meßbar war. Im Fluoreszenzmikroskop ergaben sich bei einigen Zellen geringe Abweichungen in der Gestalt der mit DAPI gefärbten Kerne im Vergleich zu den Kontrollen. Die Quantifizierung der Schäden ergab wenige kondensierte und fragmentierte Zellkerne. Durch eine Verlängerung der Nachinkubationszeit auf 48 Stunden stieg der Anteil von kondensierten Kernen geringfügig an und ergab gleiche Werte, wie sie auch bei Fibroblasten nach einer 21-stündigen *recovery phase* beobachtet wur-

den. Die Phasenkontrastaufnahmen von Astrozyten ergaben allerdings ein völlig anderes Bild. Es kam zur Bildung von „ausgefranst“ Zellkörpern und dem Verlust von Zellen. Die Zellverluste und die veränderte Zellmorphologie konnten nicht eindeutig auf apoptotischen Zelltod zurückgeführt werden. Es wurde durch einstündige Behandlung mit 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  weder nach 21 Stunden noch nach 48 Stunden *recovery phase* eine „DNA-Leiter“ induziert. Somit scheinen hier möglicherweise andere Effekte zum beobachteten Zellverlust (nach 48 Stunden Nachinkubation) geführt zu haben als über eine induzierte Apoptose.

### 4.3 Kombinationswirkung von S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$

S-Bioallethrin und  $\text{H}_2\text{O}_2$  unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen Strukturen und Eigenschaften erheblich voneinander. S-Bioallethrin besitzt eine hohe Lipophilie ( $\log P_{\text{ow}}$  5,52).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist stark hydrophil mit einem  $\log P_{\text{ow}}$  von -1,36. Bei Gemischen von strukturell „unähnlichen“ Substanzen kann es zu interaktiven Kombinationseffekten kommen. Die Stoffe können chemisch miteinander reagieren, oder sie können sich durch ihre unterschiedlichen Wirkorte gegenseitig beeinflussen. Für den Fall einer chemischen Reaktion können Produkte mit geringerer oder höherer Toxizität als ihre Ausgangsverbindungen entstehen. Im Falle unterschiedlicher Wirkorte kann eine Substanz eine Zellfunktion dahin beeinflussen, daß sich das toxische Potential einer weiteren Substanz stärker oder schwächer auswirkt (Berenbaum, 1985; Boedeker *et al.*, 1992). So können interaktive Kombinationswirkungen zur Toxifizierung oder Detoxifizierung führen. Dazu gehören z. B. interaktive Kombinationswirkungen im Fremdstoffmetabolismus. Ein Einfluß auf den Metabolismus von Substanz A durch eine Substanz B kann zu einer Beschleunigung oder Hemmung des Stoffwechsels führen und wird möglicherweise Folgen für die toxische Wirkung der Substanz A zeigen.

Eine interaktive Wirkung von S-Bioallethrin und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die auf unterschiedlichen Wirkorten der beiden Substanzen beruht, wäre denkbar. S-Bioallethrin besitzt eine hohe Lipophilie und sollte daher leicht in die Zellmembran gelangen. Bei Interaktion oder Akkumulation von S-Bioallethrin in den Membranen könnte die Membranintegrität gestört werden und damit zu einer erhöhten Aufnahme von  $\text{H}_2\text{O}_2$  kommen. Die Erhöhung der Fluidität durch eine „Model-Membran“ ist durch Einwirken der Pyrethroide Permethrin und Fenvalerate beschrieben (Sarkar *et al.*, 1993; Moya-Quiles *et al.*, 1996). Für lipophile organische Verbindungen wurden aufgrund einer Schädigung der Zellmembran eine erhöhte Aufnahme von Noxen, insbeson-

dere hydrophiler Substanzen, die nicht durch intakte Membranen diffundieren können („Türöffnerprinzip“), postuliert (Witte und Jacobi, 1993; Witte *et al.*, 1995b).

Ein gesteigerter Transfer des hydrophilen  $\text{H}_2\text{O}_2$  in die Zellen kann darüberhinaus aufgrund der Fähigkeit zur Adduktbildung mit biologischen Komponenten erfolgen. In menschlichen Fibroblasten verstärkte die Anwesenheit von L-Histidin eine durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte Chromosomen-Aberration um das Achtfache (Oya und Yamamoto, 1988).

#### 4.3.1 Einfluß von S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$ auf Fibroblasten

$\text{H}_2\text{O}_2$  wurde in seiner akut toxischen Wirkung durch 1 mmol/l S-Bioallethrin nicht beeinflusst. Durch eine 21-stündige Nachinkubation in serumhaltigem Medium reduzierte sich die Zellvitalität in der Kombination sehr deutlich. Dabei reduzierte sich der  $\text{EC}_{50}$ -Wert von S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein auf 1/6. Das deutet bei der Kombination auf Schäden hin, die sich erst nach längerer Zeit auswirken. In der Kombination S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  müssen im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein qualitativ andere Schäden auftreten. Sollten nur quantitative Veränderungen auftreten, z. B. durch einen erhöhten Influx von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , so sollten die Unterschiede auch direkt nach Schadstoffbehandlung sichtbar sein und nicht erst nach 21 Stunden. Damit scheint die Hypothese des „Türöffnerprinzips“ als alleinige Ursache der Kombinationsschäden unwahrscheinlich. Somit scheinen bei S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}$  andere Kombinationseffekte aufzutreten, und es erfolgt keine durch S-Bioallethrin erleichterte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Aufnahme in die Zellen.

Die Koloniebildungsfähigkeit ergab einen ähnlichen Kurvenverlauf wie im MTT-Assay nach 21 Stunden *recovery phase*. Es kam im Vergleich zur Einzelwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einer sehr starken Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit, wenn  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit einer untoxischen S-Bioallethrin-Konzentration kombiniert wurde (Abb. 4). Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein war im Vergleich zu der Kombination mit S-Bioallethrin um den Faktor 5 höher. Diese beobachteten irreversiblen Effekte beruhen auf Schäden, die zu einer Blockade der Zellteilung führten. Bei der Bestimmung des Zellwachstums ergaben weit geringere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen [7  $\mu\text{mol/l}$ ] mit  $\mu\text{molaren}$  Konzentrationen an S-Bioallethrin eine Erhöhung der Toxizität im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein (Abb. 8). Der Kombinationseffekt trat schon bei der kleinsten S-Bioallethrin-Konzentration mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf. (Trotz einer Erhöhung der S-Bioallethrin-Konzentration blieben

die Kombinationseffekte danach gleich). Der Verlauf der Graphen zeigte, daß sowohl durch S-Bioallethrin allein als auch in Kombination mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zwei charakteristische Phasen auftraten. Solch ein biphasischer Kurvenverlauf wurde auch von Zschenker (1996) bei der Untersuchung der Zellvitalität von Fibroblasten nach Behandlung mit unterschiedlichen S-Bioallethrin-Konzentrationen in Kombination mit Cu(II) beobachtet. Dies zeigt, daß in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedliche toxische Ereignisse auftreten. Daß durch die Kombination von kleineren Konzentrationen, sowohl  $\text{H}_2\text{O}_2$  als auch S-Bioallethrin-Konzentrationen, andere toxische Effekte auftraten, wurde auch bei Variation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Kombination mit einer S-Bioallethrin-Konzentration im  $\mu\text{molaren}$  Bereich sichtbar (Abb. 7). Dort unterschied sich der toxische Kombinationseffekt vom  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Effekt bis  $10 \mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Eine Verdopplung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration zeigte keine Unterschiede mehr zwischen S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein. Bei Kombinationswirkungen ist zu berücksichtigen, daß sich durch Variation der Konzentrationen die Verhältnisse der beiden Reaktanten zueinander ändern und sich dadurch insbesondere bei Radikalreaktionen die Intensität und Art des Schadens ebenfalls verändern kann. Durch geringe Tetracyclin-Konzentrationen mit gleichbleibenden Cu(II)-Konzentrationen wurde beispielsweise eine stärkere toxische Wirkung beobachtet als in Kombination mit höheren Tetracyclin-Konzentrationen (Buschfort und Witte, 1994).

Die gemessenen Kombinationseffekte im  $\mu\text{molaren}$  Bereich nähern sich den realen Bedingungen sowohl hinsichtlich der physiologisch messbaren Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als auch den Konzentrationen bezüglich akuter Pyrethroid-Expositionen. Bei Untersuchungen zur Ermittlung von physiologischen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen wurden in Augenlinsen von gesunden Tieren (Ratte, Maus, Hund, Lamm usw.) vergleichsweise hohe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen [ $100 \mu\text{mol/l}$ ] gemessen (Devamanoharan *et al.*, 1991). Gleichermäßen zeigten sich im Urin von gesunden Testpersonen hohe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bis  $100 \mu\text{mol/l}$  (Varma und Devamanoharan, 1990). Bei einem Schädlingsbekämpfer wurde nach einer akuten Deltamethrin-Exposition  $1,07 \mu\text{g/l}$  Deltamethrin im Urin über die Metaboliten nachgewiesen. Eine vollständige Genesung des Patienten stellte sich nach vier Tagen ein (He *et al.*, 1989).

Die wachstumshemmenden Effekte deuten in der Kombination S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  möglicherweise auf einen Replikationsblock aufgrund einer erfolgten DNA-Reparatur hin. Hält die aus einer DNA-Schädigung resultierende DNA-Synthesehemmung über einen längeren Zeitraum an, wird sich dieser Effekt auch in einer Reduzierung des Zellwachstums niederschlagen. Dies könnte die stark hemmenden Effekte auf die KBF durch S-Bioallethrin in Kombi-



nation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Abb. 4) und die deutlichen zytotoxischen Effekte im MTT-Assay ( $t_{21}$ ) (Abb. 3) erklären.

Eine induzierte LPO kann das Zellwachstum ebenfalls erheblich hemmen (Dianzani, 1993; Poot und Joenje, 1993). Durch die Kombinationswirkung S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  kam es zu einer starken Beeinträchtigung der Succinat-Dehydrogenase im MTT-Assay ( $t_{21}$ ). Dies könnte auf eine verstärkte Induktion einer LPO hindeuten, da die Succinat-Dehydrogenase ein membranständiges Enzym darstellt. Die einstündige Behandlung der Zellen mit S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  ergab nach sofortiger Messung keinen Anstieg der TBARS gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein sowie den Kontrollen. Durch eine Nachinkubation von 60 Minuten in Saline A stiegen die in der Kombinationswirkung gebildeten TBARS um insgesamt 50 % an. Im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein ergab die Kombination mit einer untoxischen S-Bioallethrin-Konzentration 20 % mehr Effekt auf die LPO. Nach weiteren 21 Stunden *recovery phase* erhöhten sich die TBARS nur in der Kombination S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Bei  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein war eine erhöhte LPO nicht mehr zu beobachten. Damit korrelierte die verstärkte LPO mit der erhöhten Zytotoxizität.

Da bei der Induktion einer LPO die antioxidative Kapazität der Zelle von Bedeutung ist, wurde in einem ersten Versuch eine Vorinkubation der Zellen mit Saline A (eine Stunde) vorgenommen, um möglicherweise eine Limitierung an Antioxidantien in den Zellen zu erreichen. Nur durch eine Limitierung der antioxidativen Kapazitäten in der Zelle, kann der LPO-Anstieg nach 21-stündiger *recovery phase* erklärt werden, der nur dann beobachtet wurde, wenn die erste Stunde der Erholungsphase in Saline A erfolgte.

Die Zellen wurden nach der Vorinkubation in Saline A im Anschluß für zwei Stunden mit den Testsubstanzen behandelt und danach für weitere 21 Stunden mit Medium inkubiert. Dabei wurde überraschenderweise eine signifikante Abnahme der TBARS in der Kombination S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen sowie S-Bioallethrin und  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein festgestellt (Daten nicht gezeigt).  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein zeigte eine geringe Abnahme der TBARS gegenüber den Kontrollen. Die Abnahme von TBARS nach Schadstoffbehandlung, wurden auch von Yuxiang *et al.* (1999) beobachtet. Dabei wurde in HL-60-Zellen (myeloische Leukämie) durch Kupfer-Nitrilotriacetat (Cu-NTA) LPO und Apoptose induziert. Es wurde gefolgert, daß die induzierte LPO zum Verlust des mitochondrialen Membran-Potentials führte und mit einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verbunden war. Dadurch wurde die Aktivierung von Caspase-3 induziert und infolgedessen eine DNA-Frag-

mentierung beobachtet, die über die Bildung einer DNA-Leiter nachgewiesen wurde. Sie schlossen aus ihren Untersuchungen, daß eine durch oxidativen Streß induzierte Lipidperoxidation, die mit einer Änderung der mitochondrialen Funktion verbunden war, möglicherweise ein frühes Ereignis zur Auslösung von Apoptose ist (Yuxiang *et al.* 1999).

Die DNA-schädigende Wirkung einer untoxischen S-Bioallethrin-Konzentration mit  $H_2O_2$  war im Vergleich zu  $H_2O_2$  allein annähernd gleich groß, wenn die Zellen sofort gemessen wurden. Bei  $40 \mu\text{mol/l } H_2O_2$  war allerdings das *tail moment* durch die Einzelwirkung größer als in der Kombinationswirkung. Das *tm* nach erfolgter Schadstoffinkubation setzt sich zusammen aus direkten Strangbrüchen aus der Schadstoffbehandlung und reparaturbedingten Strangbrüchen (Speit und Hartman, 1995; 1999). Möglicherweise deutet das geringere *tm* bei  $40 \mu\text{mol/l } H_2O_2$  in der Kombinationswirkung auf eine Hemmung oder Verzögerung der DNA-Reparatur hin.

Diese gemessene antagonistische Wirkung zwischen S-Bioallethrin in Kombination mit  $H_2O_2$  würde hinsichtlich der DNA-Reparatur im Einklang mit der Verstärkerwirkung in den Zytotoxizitätstests stehen. Wurden den Zellen ein längerer Zeitraum zur Reparatur gegeben, waren die Schäden durch  $H_2O_2$  in der Einzelwirkung nicht mehr nachweisbar, auch in vergleichsweise hohen Konzentrationen von  $80 \mu\text{mol/l } H_2O_2$  nicht. Dies zeigt wiederum die effektive Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen, die über  $\cdot\text{OH}$ -Radikale induziert werden (Collins *et al.*, 1995). In der Kombinationswirkung hingegen zeigten sich bei dieser Konzentration persistente Schäden. Die Schäden wurden entweder nicht vollständig repariert und/oder es wurden während 21 Stunden zusätzliche Schäden gesetzt. In der Kombinationswirkung wurden außerdem Zellverluste gemessen. Daß es sich hierbei um irreversible Schäden handeln könnte, wurde durch die Ergebnisse zur Hemmungswirkung der Koloniebildungsfähigkeit bestätigt.

Bei der Betrachtung einer kurzen *recovery phase* von einer Stunde wurden die primär gesetzte Schäden einer geringen  $H_2O_2$ -Konzentration [ $25 \mu\text{mol/l}$ ] in Kombination mit S-Bioallethrin erhöht (Abb. 14). Der Anstieg durch S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  weist bei dieser Konzentration möglicherweise auf eine Inzision durch Reparaturenzyme oder zusätzlich gesetzte Schäden hin, die aber nach 21 Stunden nicht mehr sichtbar waren.

Der Kometen-Assay ermöglicht die Betrachtung der DNA-Schäden jeder einzelnen Zelle (Östling und Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988). Dabei zeigen sich stoffspezifische Unter-

schiede hinsichtlich der Verteilung der DNA-Schäden. Bei Verbindungen, die ROS und andere organische Radikale erzeugen, zeigt sich häufig eine breite Streuung der *tail moments* (Purschke, 1999; Spindler, 1998). Solche Befunde wurden auch für Tetrachlorhydrochinon (TCHQ) gezeigt. Ein anderes Bild ergibt sich beispielsweise für alkylierende Stoffe wie Methylmethansulfonat (MMS). Im Vergleich zu TCHQ wurde für MMS eine Normalverteilung der DNA-Schäden nach Gauss beobachtet (Spindler, 1998). Die Schadensverteilung von TCHQ und hier für S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte, daß die Gruppe der ungeschädigten Zellkerne immer am häufigsten auftrat und keiner Gauss-Verteilung entsprach. Verbindungen mit einem homogenen Schadensprofil zeigen dagegen eine Schadensverteilung die einer Gauss-Kurve folgen, wobei sich das Maximum der Kurve mit zunehmendem Schaden zu höheren *tm* verschiebt (Spindler, 1998).

Bei den Experimenten mit S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war eine breite Streuung der *tail moments* zu beobachten, die insbesondere bei hohen Konzentrationen und/oder einer Nachinkubation sichtbar wurde. Darüber hinaus traten neben ungeschädigten sehr stark geschädigte Zellen auf, die Hinweise auf die verstärkte Bildung von radikalischen Reaktionen bzw. Verbindungen geben. Die Heterogenität, mit der die Zellen auf Radikalschäden/ROS reagieren, könnte mit einer komplexen Wechselwirkung zwischen Radikalen/ROS mit der Zelle und ihren Komponenten erklärt werden. Von großer Bedeutung ist der antioxidative Status der Zelle mit den entsprechenden Enzymaktivitäten (Imlay und Linn, 1988; Halliwell und Aruoma, 1991). Auch der Entstehungsort der gebildeten Radikale ist von Bedeutung. Bei ·OH-Radikalen beispielsweise kann es lokal zu einer erhöhten Konzentration kommen, und dadurch können unterschiedlich starke DNA-Schäden auftreten (Riley, 1994). Bei Radikalschäden kann es zur Induktion von Apoptose kommen. Es ist bekannt, daß über eine Vielzahl von Radikalen Apoptose induziert wird (Jajte, 1997; Ikeda *et al.*, 1999). In diesem Fall werden im Kometen-Assay sehr stark geschädigte Zellkerne (*highly damaged cells*) sichtbar (Fairbairn *et al.*, 1995). Solche Kometen zeigen häufig ein *tm* > 60 und können mit den herkömmlichen Auswertesystemen nicht mehr erfaßt werden. Ob es sich dann tatsächlich um apoptotische Zellen handelt, ist schwierig zu beurteilen, da durch Nekrose ebenfalls eine DNA-Migration ausgelöst wird (Gardner *et al.*, 1997; Anderson und Plewa, 1989). Fairbairn *et al.* (1996) konnten in Zellkultur durch Temperaturerhöhung (Hitzeschock) einen Wechsel von apoptotischen zu nekrotischen Zelltod induzieren. Dabei war es möglich, die durch Apoptose oder Nekrose induzierten Kometen in ihrer Morphologie voneinander zu unterscheiden. Bei Apoptose kam es zu einer starken DNA-Migration mit der Bildung eines Kometen-Schweifs fern von dem

Kopfbereich des Kometen (analog Abb. 12). Eine nähere Charakterisierung „nekrotischer Kometen“ erfolgte allerdings nicht, die DNA-Degradierung aus dem Kern wurde lediglich als „moderat“ beschrieben (Fairbrain *et al.*, 1996).

Die Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte im Gegensatz zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein die Persistenz von DNA-Schäden sowie Zellverluste 21 Stunden nach der Schadstoffbehandlung bzw. das Neuauftreten von DNA-Schäden nach Schadstoffinkubation. Darüber hinaus wurde durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Kombination mit S-Bioallethrin eine Verzögerung der DNA-Reparatur festgestellt. Es ist bekannt, daß ein Zusammenhang zwischen ineffizienter DNA-Reparatur und Apoptose existiert (Hollensworth *et al.*, 2000; Wani *et al.*, 2000). Dabei kann derzeit nicht zwischen kausalen und Folgereaktionen unterschieden werden, d. h. ob eine eingeleitete Apoptose die DNA-Reparatur hemmt oder ein persistierender Schaden (z. B. aufgrund unvollständiger oder fehlerhafter DNA-Reparatur) die Apoptose induziert. Letztere Möglichkeit wurde mehrfach nachgewiesen (Orren *et al.*, 1997; Erexson und Tindall, 2000). Hollensworth *et al.* (2000) zeigten in ihren Untersuchungen, daß durch Menadion induzierter oxidativer Streß in Gliazellen (Oligodendrozyten und Mikroglia) eine Hemmung der Reparatur-Kapazität von mtDNA verursachte, die mit der Induktion von Apoptose korrelierte. Ihre Hypothese geht davon aus, daß nicht reparierte mtDNA als ein Signal zur Induktion von Apoptose gilt, die durch Freisetzung von Cytochrom C und anschließender Aktivierung von Caspase-9 untersucht wurde (Hollensworth *et al.*, 2000).

Es wurde untersucht, ob durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Apoptose induziert wird. Die Zellmorphologie wurde durch die Kombination einer untoxischen S-Bioallethrin-Konzentration mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µmol/l] stark verändert und zeigte Anzeichen einer Apoptose-Induktion (Bläschenbildungen an den Zellkörpern und Bläschenbildung der Zellkerne). Ferner wies der Zellrasen keine zusammenhängende Struktur mehr auf. Die quantitative Erfassung ergab überwiegend stark kondensierte Zellkerne. In keiner Probe konnte jedoch eine „DNA-Leiter“ - aber die deutliche Zunahme eines „DNA-Schmiers“ mit steigenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen - beobachtet werden. Dieser Effekt war durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25-100 µmol/l] allein nur sehr gering ausgebildet. Die deutliche Zunahme des „DNA-Schmiers“ durch höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen und Staurosporin wurde bereits unter 4.2.1 beschrieben.

Unter Umständen erfolgte die DNA-Isolierung zu einem Zeitpunkt, bei dem sich die meisten Zellen bereits in einer späten Phase der Apoptose befanden. Die DNA-Degradierung ist dann

schon so weit fortgeschritten, daß nur noch ein „DNA-Schmier“ zu beobachten ist, der sich vom Muster des nekrotischen Zelltodes nicht unterscheiden läßt (El-Gohary *et al.*, 1999). Es wurde deshalb zu unterschiedlichen Zeitpunkten die DNA aus den Zellen isoliert, um eine Kinetik zu erhalten, die den Prozeß der DNA-Fragmentierung beschreibt. Dabei wurde folgendes festgestellt: S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25-100 µmol/l] verursachte bis zu einer Nachinkubationszeit von 5 Stunden keinen „DNA-Schmier“. Eine Verlängerung der Nachinkubationszeit von 5 Stunden auf 105 Stunden brachte keine Veränderung der beobachteten DNA-Fragmentierung. Die Ausbildung einer „DNA-Leiter“ über 105 Stunden hinaus scheint unwahrscheinlich und wurde auch nicht in der Literatur beschrieben. Die Ausbildung einer „DNA-Leiter“ sollte daher zwischen 5 und 21 Stunden liegen. Es könnte aber auch sein, daß hier sowohl apoptotische als auch nekrotische Prozesse stattfinden und eine „DNA-Leiter“ durch eine unspezifische DNA-Fragmentierung verdeckt bleibt bzw. die Konzentration von apoptotischen Zellen zu gering ist. Für die Bildung einer „DNA-Leiter“ muß eine Mindestanzahl von apoptotischen Zellen vorhanden sein (Benítez-Bribiesca, 1996). Daher wurden Untersuchungen durchgeführt, die eine Trennung von apoptotischen zu nekrotischen und ungeschädigten Zellen beinhalten sollten. Diese Experimente wurden mit Staurosporin und S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durchgeführt. Der beobachtete „DNA-Schmier“ stammte zum einen von Zellen, die sich von den Kulturschalen nach der Schadstoffbehandlung abgelöst hatten. Zum anderen rührte er von Zellen her, die sich sehr schnell von den Kulturschalen abtrypsinieren ließen. Der verbleibende Zellrasen zeigte im Agarosegel keine DNA-Fragmentierung. Die Annahme, daß sich die nekrotischen Zellen im Überstand und die apoptotischen Zellen - dadurch, daß sie noch über einen längeren Zeitraum intakt bleiben - in der Fraktion von Zellen, die sich schnell ablösten, befanden, konnte mit der Induktion einer „DNA-Leiter“ nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen von Qiao *et al.* (1998) und Zamai *et al.* (1996) dokumentierten den apoptotischen Zelltod in verschiedenen Zelltypen in Abwesenheit einer charakteristischen DNA-Fragmentierung bzw. „DNA-Leiter“. Dabei induzierte Aspirin (ASA) in einer humanen Dickdarm-Krebs-Zelllinie (HT-29 colon adenocarcinoma cells) Apoptose, die nicht mit der Ausbildung einer „DNA-Leiter“ assoziiert war, aber u. a. im Kometen-Assay und mit Hilfe von TUNEL-Technik nachgewiesen wurde (Qiao *et al.*, 1998). Die Indizien für die Induktion einer Apoptose durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden zwar durch die bisherigen Untersuchungen geliefert, aber es konnte nicht eindeutig geklärt werden, um welchen Prozeß des Zelltodes es sich hier handelt. Die Ergebnisse weisen möglicherweise darauf hin, daß bei dieser Zellkultur das „Zeitfenster“ bzw. die Schadstoffkonzentration, bei der eine „DNA-Leiter“ zu beobachten ist, eng begrenzt ist. Dafür spricht auch die Tatsache, daß durch Staurosporin

lediglich die Zunahme von „DNA-Schmier“ beobachtet wurde. In humanen HL-60-Zellen (myeloische Leukämie) konnte bei gleichen Staurosporin-Konzentrationen, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, nach 4 Stunden eine Apoptose-Leiter nachgewiesen werden (Cai und Jones, 1998). Bei humanen *Chang* Leberzellen zeigte sich durch 15-minütige Behandlung mit ebenfalls vergleichbaren Staurosporin-Konzentrationen eine „DNA-Leiter“. Diese wurde nach anschließender *recovery phase* von 8, 12 und 16 Stunden zu allen Zeitpunkten sichtbar (Swe und Sit, 2000).

Es können daher für S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowohl apoptotische als auch nekrotische Prozesse angenommen werden, aber auch die Assoziation beider Prozesse ist in der Literatur beschrieben. Formigli *et al.* (2000) formulierten den Begriff der Aponekrose als eine „neue“ Art des Zelltodes, der sowohl charakteristische Merkmale von Apoptose als auch Nekrose zeigte. Sie behandelten eine Fibroblastenzelllinie mit Antimycin A in verschiedenen Konzentrationen. Dabei induzierten geringe Konzentrationen (100 oder 200 µmol/l) Apoptose, höhere Konzentrationen (300 oder 400 µmol/l) Aponekrose und hohe Konzentrationen (1000 µmol/l) Nekrose.

#### 4.3.2 Einfluß von S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Astrozyten im Vergleich zu Fibroblasten

Die zusammengestellten Daten zeigen die unterschiedlichen zytotoxischen Effekte auf Astrozyten und Fibroblasten durch die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowohl mit als auch ohne S-Bioallethrin (Tab. 2).

Zellen Test		Fibroblasten		Astrozyten	
		EC <sub>50</sub> [µmol/l] H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	EC <sub>50</sub> [µmol/l] H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
MTT	t <sub>0</sub>	200	ca. 200	60-65	50-65
	t <sub>21</sub>	110	20	60	40
		LPO-Zunahme [%] nach 1 h Saline A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	LPO-Zunahme [%] nach 1 h Saline A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	S-Bioallethrin/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
LPO (100 µmol/l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /1mmol/l S-Bioallethrin)	t <sub>0</sub>	30	50	keine	30
	t <sub>21</sub>	30	50	nicht bestimmt	nicht bestimmt

**Tab. 2:** EC<sub>50</sub>-Werte für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in unterschiedlichen Testsystemen in Fibroblasten und Astrozyten mit und ohne einer untoxischen S-Bioallethrin-Konzentration.

Vergleichend mit Fibroblasten kann folgendes festgestellt werden: Astrozyten zeigten in der akuten Toxizität im Gegensatz zu Fibroblasten geringe Kombinationseffekte mit S-Bioallethrin. Eine Erholungsphase von 21 Stunden erhöhte die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Toxizität durch S-Bioallethrin in Fibroblasten weit stärker als in Astrozyten. Astrozyten zeigten im Gegensatz zu Fibroblasten in der Kombinationswirkung auch einen Schulterbereich analog zur Einzelwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dies bedeutet, daß Astrozyten im Gegensatz zu Fibroblasten in der Lage sind, die durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gesetzten Schäden in geringen Konzentrationen zu tolerieren oder die Schäden zu reparieren.

Sowohl bei Astrozyten als auch in Fibroblasten wurde unter geeigneten Versuchsbedingungen (1 Stunde Schadstoffbehandlung/1 Stunde Nachinkubation in Saline A) durch die Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine LPO nachgewiesen. Die Einzelsubstanzen zeigten in Astrozyten keine, in Fibroblasten dagegen eine geringe Zunahme der LPO. Während in Astrozyten die Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nur in hoch toxischen Bereichen (vollständige Hemmung der Succinat-Dehydrogenase) eine LPO induzierte, wurde in Fibroblasten durch gering toxische Konzentrationen sowohl durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein als auch in Kombination mit S-Bioallethrin eine LPO beobachtet. Das Auftreten einer LPO in hoch toxischen Bereichen wurde auch von Weiß (1995) beobachtet. Dabei wurde in menschlichen Fibroblasten durch die Substanzkombination Cu(II)/PG erst bei starken zytotoxischen Effekten (Fluoresceindiaceat-Methode) eine verstärkte LPO gemessen. Es wurde vermutet, daß die LPO jedoch nicht das primäre Schadensereignis der zytotoxischen Kombinationswirkung darstellte (Weiß, 1995).

Die Induktion einer LPO als Folge der zytotoxischen Kombinationswirkung sollte bei Astrozyten auszuschließen sein, da sonst auch durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein in toxischen Konzentrationen eine LPO zu erwarten wäre. Dies war jedoch nicht der Fall (Abb. 21 und 23). Daraus kann gefolgert werden, daß die induzierte LPO in Astrozyten nicht die primäre Ursache für die starke Zytotoxizität von S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> darstellt. Im Gegensatz dazu zeigten Fibroblasten auch in „moderat“ toxischen Konzentrationen in der Kombination eine LPO. Die LPO wurde auch schon direkt nach Schadstoffbehandlung sichtbar. Dennoch kann eine LPO nicht ausschließlich für die starke Zytotoxizität verantwortlich gemacht werden, da bereits bei kleineren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen DNA-Schäden durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> messbar waren.

Die starken zytotoxischen Effekte bei Fibroblasten könnten deshalb auch mit der Zunahme der Genotoxizität erklärt werden. Im Kometen-Assay wurden bei Fibroblasten DNA-Schäden

festgestellt und im Gegensatz zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein, eine Persistenz der DNA-Schäden gemessen. Die Gesamtzellzahl nahm dabei ab.

Die genotoxische Wirkung von S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Fibroblasten und Astrozyten sind in Tabelle 3 vergleichend zusammengefaßt.

Zellen Test	Fibroblasten		Astrozyten	
	$\text{H}_2\text{O}_2$	S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{H}_2\text{O}_2$	S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$
„DNA-Leiter“	<u>nein</u> (in hohen Konz. „DNA-Schmier“)	<u>nein</u> (bei allen Konz. „DNA-Schmier“)	<u>nein</u>	<u>nein</u> ( $t_{21}$ ) („DNA-Schmier“) <u>ja</u> ( $t_{48}$ )
Zellkerne [%]	Zellkernmorphologie bei 100 $\mu\text{mol/l}$ $\text{H}_2\text{O}_2$			
normal ( $t_{21}$ ) ( $t_{48}$ )	89 nicht untersucht	21 nicht bestimmbar	90 89	52 26
kondensiert ( $t_{21}$ ) ( $t_{48}$ )	10 nicht untersucht	71 nicht bestimmbar	6 10	38 8
fragmentiert ( $t_{21}$ ) ( $t_{48}$ )	1 nicht untersucht	8 nicht bestimmbar	4 1	11 66

**Tab. 3:** Genotoxische Effekte durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  [100  $\mu\text{mol/l}$ ] allein und in Kombination mit einer untoxischen S-Bioallethrin-Konzentration [1  $\text{mmol/l}$ ] in Fibroblasten und Astrozyten.

Während durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Einzelwirkung nach 21 Stunden der Prozentsatz an ungeschädigten Zellen in Fibroblasten und Astrozyten gleich war, waren in der Kombination mit S-Bioallethrin in Fibroblasten weitaus weniger Zellen mit normalem Zellkern sichtbar. Erst nach 48 Stunden *recovery phase* waren bei Astrozyten ähnlich viel Schäden sichtbar bezüglich der Abnahme der ungeschädigten Zellkerne wie in Fibroblasten nach 21 Stunden. Wurden die Zellen nach kondensierten und fragmentierten Zellkernen differenziert, so zeigte sich bei Fibroblasten nach 21 Stunden eine stark veränderte Morphologie mit doppelt so vielen kondensierten Kernen als bei Astrozyten. Die Anzahl der fragmentierten Kerne verachtachte sich bei Fibroblasten durch S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  im Vergleich zu der Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein, während bei Astrozyten eine Verdreifachung bei Betrachtung dieser Werte beobachtet wurde. Bei Astrozyten waren durch die Kombination S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  nach 48 Stunden *recovery phase* überwiegend fragmentierte Kerne vorhanden. Allgemein nahm die Gesamtzellzahl durch die Behandlung mit S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Astrozyten und Fibroblasten ab.

Die Inkubation mit S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  führte in Fibroblasten nicht zu einer „Apoptose-Leiter“, sondern zu einem auffälligen „DNA-Schmier“. Im Gegensatz dazu wurde in Astrozyten eine „DNA-Leiter“ induziert. Die „DNA-Leiter“ war nach 48 Stunden sichtbar. Da die



„DNA-Leiter“ erst zu einem späten Zeitpunkt festgestellt wurde, scheint der „DNA-Schmier“ nach 21 Stunden nicht mit der Induktion von nekrotischen Prozessen zusammenzuhängen. Das Auftreten von „DNA-Schmier“ wird häufig bei Nekrose beobachtet (Lieberthal *et al.*, 1996; El-Gohary *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 1999). Möglicherweise war die Anzahl von apoptotischen Zellen nach 21 Stunden für diesen Nachweis zu gering. Der Prozeß, der in Astrozyten zur Apoptose führte, scheint mit einer langsamen Reaktionskinetik verbunden zu sein. Im Gegensatz dazu konnte durch  $H_2O_2$  in Oligodendrozyten schon nach einer Stunde eine charakteristische DNA-Fragmentierung mit einer maximalen Intensität nach drei Stunden beobachtet werden (Vollgraf *et al.* 1999). Der Zeitpunkt, bei dem Apoptose gemessen werden kann, hängt sehr stark von dem Apoptose-Auslöser und von den Zellkulturen ab. In humanen Erythroleukämia-Zellen (K562) wurde zum Beispiel festgestellt, daß Cholesterol als *trigger* für Apoptose gilt. Es zeigten sich zytotoxische Effekte mit einer Zunahme von apoptotischen Körpern. Dabei kam es nach einer 24-stündigen Behandlung zu einer Inhibierung des Zellwachstums und nach 72-stündiger Behandlung zu einer Inhibierung der Zellvitalität. Die Bildung von apoptotischen Körpern stieg mit der Inkubationsdauer und war nach 72 Stunden maximal (Maccarrone *et al.*, 1998).

Aufgrund der Untersuchungen mit Astrozyten konnte die beobachtete Zunahme des „DNA-Schmiers“ bei Fibroblasten als Indiz für einen Anstieg apoptotischer Zellen gedeutet werden, falls durch S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  in Fibroblasten ebenfalls Apoptose zu einem späten Zeitpunkt durch eine „DNA-Leiter“ nachzuweisen ist. Dies konnte durch eine Verlängerung der Nachinkubationszeit nicht gezeigt werden.

Die hohe Anzahl an fragmentierten Zellkernen bei Astrozyten könnte die Ursache für die Induktion einer „DNA-Leiter“ darstellen. Die Fragmentierung, aber auch die Kondensation von Zellkernen, gelten als Indiz für Apoptose (Allen *et al.*, 1997). Ob in Fibroblasten der Zelltod durch apoptotische oder nekrotische Prozesse ausgelöst wurde oder ob beide Prozesse nebeneinander stattfanden, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise ist die Anzahl von apoptotischen Zellen in Fibroblasten zu gering, um sie über eine „DNA-Leiter“ nachzuweisen.

### 4.3.3 *In vitro*-Untersuchungen und mechanistische Aspekte

Es wurde untersucht, ob die Kombinationswirkung von S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf einer Reaktion zwischen den beiden Substanzen beruht. Dabei wurde ein Vergleich zwischen den natürlich vorkommenden Pyrethrinen und S-Bioallethrin vorgenommen. Dieser Vergleich war deshalb von Interesse, da von allen bekannten synthetischen Pyrethroiden S-Bioallethrin den natürlich vorkommenden Pyrethrinen hinsichtlich der chemischen Struktur am nächsten steht (Abb. 1 A und 1 B).

Die Einzelsubstanzen S-Bioallethrin und Pyrethrine induzierten kaum bzw. sehr geringe DNA-Strangbrüche nach einstündiger Inkubation. Die höchste eingesetzte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration induzierte in Einzelwirkung bis maximal 2 SSB's/DNA Molekül. Durch die Anwesenheit des Lösungsvermittlers (DMSO/Cremophor) reduzierten sich die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedingten Strangbrüche deutlich. Die Radikalfängereigenschaften von DMSO sind gut untersucht (Klein *et al.*, 1981; Milligan *et al.*, 1996) und auch in PM2 DNA beschrieben (Stoßberg, 2000). In Tabelle 4 ist der Einfluß des Lösungsvermittlers auf die Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zusammengefaßt. Dargestellt sind die SSB's/PM2 DNA Molekül.

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [100 µmol/l] SSB	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [500 µmol/l] SSB
Puffer	0,4	1,6
Lösungsvermittler (0,01 %)	0,2	0,5
Lösungsvermittler (0,1 %)	0,1	0,1

**Tab. 4:** Strangbrüche in PM2 DNA durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100µmol/l und 500 µmol/l] mit und ohne Lösungsvermittler in NaPO<sub>4</sub>-Puffer.

Die stark strangbruchhemmende Wirkung wird bei einem Lösungsvermittler-Anteil von 0,1 % besonders deutlich. Es ergaben sich keine Unterschiede in der Strangbruchzahl, wenn die Proben mit einer hohen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration oder mit einer um den Faktor 5 geringeren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration behandelt wurden. Die Hemmwirkung durch den Lösungsvermittler-Anteil kann auch als Hemmfaktor dargestellt werden, da er bei der Betrachtung der SSB's/DNA Molekül durch die Kombinationswirkung S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitberücksichtigt werden sollte. In Tabelle 5 sind diese Hemmfaktoren auf die Strangbruchbildung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dargestellt.

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [100 µmol/l] Hemmfaktor	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [500 µmol/l] Hemmfaktor
Lösungsvermittler (0,01 %)	2	3,2
Lösungsvermittler (0,1 %)	4	16

**Tab. 5:** Hemmfaktoren: Hemmung der Strangbrüche in PM2 DNA durch die verschiedenen Anteile des Lösungsvermittlers bezogen auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100µmol/l und 500 µmol/l] in NaPO<sub>4</sub>-Puffer.

Die wesentlichen Befunde aus den einzelnen Untersuchungen mit S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. Pyrethrine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Dargestellt sind die gemessenen SSB's/PM2 DNA Molekül und die Strangbrüche, die sich theoretisch ohne den Lösungsvermittler (Berücksichtigung des Hemmfaktors) ergeben würden.

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [100 µmol/l]		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [500 µmol/l]	
	SSB gemessen	SSB berechnet (x Hemmfaktor)	SSB gemessen	SSB berechnet (x Hemmfaktor)
S-Bioallethrin [100 µmol/l] (0,01 % Lösungsvermittler)	0,4	0,8	0,55	1,76
Pyrethrine [100 µmol/l] (0,01 % Lösungsvermittler)	0,13	0,26	nicht untersucht	nicht untersucht
S-Bioallethrin [1000 µmol/l] (0,1 % Lösungsvermittler)	1	4	0,75	12
Pyrethrine [1000 µmol/l] (0,1 % Lösungsvermittler)	0,45	1,8	0,5	8

**Tab. 6:** Strangbrüche in PM2 DNA durch S-Bioallethrin, Pyrethrine [100 µmol/l] und [1000 µmol/l] mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100µmol/l und 500 µmol/l] in NaPO<sub>4</sub>-Puffer.

Unter Berücksichtigung der Hemmwirkung des Lösungsvermittlers auf die SSB's/DNA Molekül ergab sich durch Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in der Kombination S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine deutliche Zunahme der Strangbrüche. Pyrethrine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verursachten unter den gleichen Versuchsbedingungen geringere Effekte auf die Strangbruchinduktion. Da nach Aussage des Herstellers das käufliche technische Pyrethrum-Präparat (Pyrethrine) nur zu ca. 30 % wirksame Bestandteile (Pyrethrine) enthält, müssten die Strangbrüche um den Faktor 3 über den gemessenen Werten liegen und damit gleich hohe bzw. höhere Schäden verursachen als durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Eine chemische Reaktion zwischen S-Bioallethrin und reaktiven Sauerstoffspezies (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. OH-Radikalen) wäre an unterschiedlichen Stellen des S-Bioallethrin-Moleküls denkbar. S-Bioallethrin ist ein komplexes organisches Molekül mit einem alicyclischen Anteil und verschiedenen funktionellen Gruppen. Es verfügt über eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylfunk-

tion, die nucleophil angegriffen werden kann. Das Pyrethroid Tetramethrin, das ebenfalls eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppe besitzt, reagiert unter physiologischen Bedingungen mit Glutathion (GSH) über eine Michael-Addition (Casida *et al.*, 1983). Die Reaktion zwischen Permethrin und einer reaktiven Sauerstoffspezies ( $O_2^{\cdot-}$ ) führte zu einer Dehydrohalogenierung des Moleküls (Dureja *et al.*, 1982). Die konjugierte Doppelbindung am Cyclopentenon-Ring stellt ebenfalls einen Angriffspunkt im Molekül dar. Ein Angriff von  $\cdot OH$ -Radikalen am S-Bioallethrin Molekül könnte am 1-Buten-Rest, der sich an dem Cyclopentenon-Ring befindet, stattfinden (Abb. 1 B). Durch die Abstraktion eines Protons könnte sich ein S-Bioallethrin-Radikal bilden, welches über die Konjugation mit dem Cyclopentenon-Ring resonanzstabilisiert ist. Dieses Radikal könnte dann mit weiteren S-Bioallethrin-Molekülen reagieren und die Kettenreaktion fortsetzen. Die Bildung solcher Radikale könnten die verstärkte Strangbruchinduktion in PM2 DNA erklären, da im Gegensatz zu  $H_2O_2$  allein eine nicht so stark Hemmung durch den Lösungsvermittler festgestellt wurde. Es wurde mehrfach gezeigt, daß C-zentrierte Radikale durch DMSO weit schlechter „abgefangen“ werden können als  $\cdot OH$ -Radikale (Becker *et al.*, 1998; Witte und Krieger, 1997). Der gleiche Mechanismus wäre auch bei den Pyrethrinen denkbar. Die Entstehung eines Radikals wäre am 2-Penten-Rest sogar noch wahrscheinlicher (in Analogie zu dem Mechanismus einer LPO). Eine Schädigung auf Zellkulturebene, mit möglicherweise apoptotischem Zelltod, wie sie für S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  nachgewiesen wurde, ist demnach auch durch Pyrethrine in Kombination mit oxidativem Streß nicht auszuschließen. Ob der apoptotische Zelltod durch S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  aufgrund der chemischen Reaktion zwischen  $H_2O_2$  und S-Bioallethrin und/oder anderer interaktiver Wechselwirkungen auf zellulärer Ebene ausgelöst wurde, konnte nicht endgültig beantwortet werden.

## 5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, daß S-Bioallethrin in Gegenwart von oxidativem Streß in Astrozyten zum apoptotischen Zelltod führte. Dieses Ergebnis erweitert die Diskussion um die Problematik der toxikologischen Erfassung und Beurteilung möglicher persistierender Veränderungen durch Pyrethroide insbesondere im Gehirn. In weiterführenden Experimenten könnten die molekularen Mechanismen bzw. Apoptose-Signalwege untersucht werden. In einem frühen Stadium der Apoptose kommt es z. B. zu einer Veränderung in der Zellmembran, die durch eine Störung der Membran-Permeabilität und dem charakteristischen Zusammenbruch des Membran-Potentials gekennzeichnet ist. Als Konsequenz gelangen verschiedene Proteine, die in den Mitochondrienmembranen lokalisiert sind, wie z. B. AIF (*apoptosis inducing factor*) und Cytochrom C, in das Zytoplasma. Es könnte untersucht werden, ob diese Proteine am apoptotischen Prozess beteiligt sind.

Da durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> DNA-Schäden persistent blieben bzw. nicht oder schlecht repariert wurden, könnte in nachfolgenden Untersuchungen als Apoptosenachweis in Fibroblasten die DNA-Reparatur betrachtet werden. Dabei könnte die Bestimmung nuclearer proteolytischer Aktivität, in diesem Falle das nukleare Enzym Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP), welches an DNA-Reparaturprozessen beteiligt ist, untersucht werden. PARP wird in einer frühen Phase durch apoptosespezifische Proteasen gespalten. Diese Proteasen aus der ICE-Familie (*interleukin-1 $\beta$  converting enzyme*) lösen die apoptotische Kaskade aus. Eine von ihnen ist z. B. Caspase-3, die PARP in zwei Fragmente spaltet. Die Spaltprodukte und PARP selbst können dann nach einer Gelelektrophorese mit polyklonalen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Die Spaltung spezifischer Substrate wie beispielsweise PARP (oder Lamin, Actin) sind dann letztlich für die Ausprägung der typischen morphologischen Veränderungen der Zellen bzw. Zellkerne und für die Degradierung der DNA verantwortlich.

Bei der Identifizierung jeder einzelnen apoptotischen Zelle durch S-Bioallethrin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eignet sich die Methode der *in situ*-Markierung der DNA durch Endmarkierung, die sogenannte TUNEL-Technik. Bei dieser Technik werden Einzelstrangbrüche in der DNA nachgewiesen, die durch Aktivität der Nukleasen entstehen, welche am apoptotischen Zelltod beteiligt sind.

Nicht zuletzt aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sollte die toxikologische Bewertung von (Umwelt-) Chemikalien nicht allein auf der Basis einer Einzelstoffbetrachtung erfolgen. Es

---

gibt eine Reihe von Umweltchemikalien, die mit vorhandenen ROS wechselwirken (z. B. Aromaten) und dadurch eine erhöhte Gesamtoxizität verursachen. Dazu zählen z. B. gebräuchliche Lösungsmittel wie Toluol, chlorierte Kohlenwasserstoffe wie Tetrachlorkohlenstoff, 2,4,6-Trichlorphenol und Chloroform (Leidecker, 1992; Lücken 2000). Durch die Kombination Phenol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte beispielsweise eine Erhöhung der apoptotischen Wirkung nachgewiesen werden (Goldman *et al.*, 1999). Auf der anderen Seite gibt es viele Umweltchemikalien, die oxidativen Streß erzeugen (<sup>•</sup>OH-Radikal-Bildner wie TCHQ oder ROS-Bildner wie Paraquat und Nitrofurazon). Hierbei muß ebenfalls einkalkuliert werden, daß durch die Kombination von <sup>•</sup>OH-Radikal-Bildnern mit oxidativem Streß wahrscheinlich weit geringere Konzentrationen der Verursacher-Substanz nötig sind, um Schäden hervorzurufen.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das toxische Potential des synthetischen Pyrethroid S-Bioallethrin in Abhängigkeit von oxidativem Streß untersucht. Die oxidativen Streßbedingungen wurden durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  erzeugt. Dabei wurde die zyto- und genotoxische Einzelwirkung sowohl von S-Bioallethrin als auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein sowie deren Kombinationseffekte ermittelt. Als Testsystem wurden humane Fibroblasten und Astrozyten des Rattenhirns gewählt. Ein Vergleich der Wirkungsweise auf diese beiden Zelltypen war ausgehend von der Toxizität der Pyrethroide, die insbesondere das Nervensystem betrifft, von Interesse.

- Zytotoxizität

S-Bioallethrin allein wirkte im  $\mu\text{molaren}$  Bereich wachstumshemmend auf menschliche Fibroblasten. Die Zellvitalität (akute Toxizität und Toxizität nach 21 Stunden) und die Koloniebildungsfähigkeit hingegen wurden auch in tausendfach höheren Konzentrationen nicht beeinträchtigt.

Die Kombination S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  wirkte sich gegenüber der Einzelwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Fibroblasten und Astrozyten toxizitätssteigernd aus. Die Zellvitalität durch S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein nicht akut, sondern nach einer *recovery phase* von 21 Stunden stark beeinträchtigt. Eine durch S-Bioallethrin verursachte verstärkte Aufnahme von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in die Zelle ist dabei unwahrscheinlich.

Die toxische Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Koloniebildungsfähigkeit und das Zellwachstum menschlicher Fibroblasten wurde durch die Kombination mit untoxischen S-Bioallethrin-Konzentrationen verstärkt. Es konnte gezeigt werden, daß durch die Kombinationswirkung von S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  im Gegensatz zu den Einzelsubstanzen irreversible Schäden auftraten, die zu einer Blockade der Zellteilung führten.

In beiden Zellkulturen wurde die Induktion einer LPO durch S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  nachgewiesen, wobei die dafür notwendige S-Bioallethrin/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in Fibroblasten gering, in Astrozyten jedoch stark toxisch war. In Fibroblasten wurde durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein eine geringe Erhöhung der LPO ausgelöst, Astrozyten dagegen zeigten unter den gleichen Bedingungen keine LPO durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein.

- Apoptose-Nachweis

Morphologische Untersuchungen zeigten für beide Zelltypen charakteristische Merkmale einer Apoptose, wenn die Zellen mit S-Bioallethrin in Kombination mit  $H_2O_2$  im  $\mu$ molaren Bereich behandelt wurden. Es wurden kondensierte und fragmentierte Zellkerne nachgewiesen, wobei in Astrozyten eine nachweisbar stärkere Fragmentierung der DNA ausgelöst wurde als in Fibroblasten. In Astrozyten wurde die Ausbildung einer apoptotischen „DNA-Leiter“ durch S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  beobachtet.  $H_2O_2$  allein löste keine Fragmentierung der DNA aus. Unter gleichen Bedingungen wurde in Fibroblasten ebenfalls in der Kombination S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  der Zelltod induziert, wobei gleichzeitig Indizien für Apoptose und Nekrose gefunden und diskutiert wurden. Die Ausbildung einer „DNA-Leiter“ blieb in Fibroblasten jedoch aus, und zwar auch bei Verbindungen wie Staurosporin oder  $H_2O_2$  allein, die als *trigger* von Apoptose gelten.

- Genotoxizität

Im Kometen Assay wurden DNA-Schäden durch  $H_2O_2$  und S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  in Fibroblasten quantifiziert. Während die  $H_2O_2$  bedingten DNA-Schäden über 21 Stunden nicht mehr nachweisbar waren, wurde für die Kombination S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  eine Persistenz der DNA-Schäden festgestellt. Die durch  $H_2O_2$  und S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  erzeugten DNA-Schäden erfolgten nicht nach einer Gaussverteilung und entsprachen den erzeugten Schäden von typischen Radikalbildnern. *In vitro*-Experimente an isolierter DNA wiesen auf eine chemische Reaktion zwischen  $H_2O_2$  und S-Bioallethrin, die zu synergistischen DNA-Schäden führten. Auch die natürlich vorkommenden Pyrethrine induzierten in Kombination mit  $H_2O_2$  verstärkt Einzelstrangbrüche, so daß auch hier von einer Schädigung in Zellkultur ausgegangen werden kann.

Resümierend läßt sich feststellen, daß die Kombination von S-Bioallethrin/ $H_2O_2$  zu massiven zyto- und genotoxischen Schäden in Astrozyten und Fibroblasten führte - vermutlich über eine verstärkte Radikalbildung mit der Folge einer Induktion von Apoptose, die in Astrozyten eindeutig nachgewiesen wurde. Da weder der erzeugte oxidative Streß allein noch S-Bioallethrin in Einzelwirkung Apoptose induzierte, stellt sich die Frage, ob es sich hier möglicherweise um ein allgemeines Phänomen handelt und somit neuroaktive Substanzen unter oxidativen Streßbedingungen als *trigger* von Apoptose gelten können.



## 7 Literaturverzeichnis

- Abernathy, C. O., Ueda, K., Engel, J. L., Gaughan, L. C. und Csida, J. E. (1973): Substrate-specificity and toxicological significance of pyrethroid-hydrolyzing esterases of mouse liver microsomes. *Pestic. Biochem. Physiol.* **3**, 631-636.
- Agarwal, D. K., Chauhan, L. K. S., Gupta, S. K. und Sundararaman, V. (1994): Cytogenetic effects of deltamethrin on rat bone marrow. *Mutation Res.* **311**, 133-138.
- Aldridge, W. N. (1990): An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **21**, 89-104.
- Allen, R. T., Hunter, W. J. und Agrawal, D. K. (1997): Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **37** (4), 215-228.
- Anderson, D. und Plewa, M. J. (1998): The international comet assay workshop. *Mutagenesis* **13** (1), 67-73.
- Appel, K. E. (1990): „Risk Assessment“ in der Toxikologie. *Bundesgesundheitsblatt* **6**, 240-247.
- Appel, K. E. und Gericke, S. (1993): Zur Neurotoxizität und Toxikologie von Pyrethroiden. *Bundesgesundheitsblatt* **6**, 219-228.
- Appel, K. E. und Michalak, H. (1994): Zur Toxikologie der Pyrethroide. *VDI-Berichte* **1122**, 401-424.
- Arends, M. J., Morris, R. G. und Wyllie, A. H. (1990): Apoptosis – the role of the endonuclease. *Am. J. Pathology* **136**, 593-608.
- Barrueco, C., Herrera, A., Caballo, C. und de la Peña, E. (1992): Cytogenetic effects of permethrin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* **7**, 433-437.
- Barrueco, C., Herrera, A., Caballo, C. und de la Peña, E. (1994): The induction of structural chromosomal aberrations in human lymphocytes and CHO cells by permethrin. *Teratog. Carcinog. Mutag.* **14**, 31-38.
- Becker, T. W., Krieger, G. und Witte, I. (1998): Different DNA damaging species as a result of oxidation of n-butyraldehyd and iso-butyraldehyd by Cu(II). *Free Radical Res.* **29**, 25-34.
- Bellomo, G., Perotti, M., Taddei, F., Mirabelli, F., Finardi, G., Nicotera, P. und Orrenius, S. (1992): Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca<sup>2+</sup> concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res.* **52** (5), 1342-1346.
- Benítez-Bribiesca, L. (1996): Imágenes de la apoptosis, *Gac. Méd. Méx.* **132**, 641.
- Berenbaum, M. C. (1985): The expected effects of a combination of agents: The general solution. *J. Theor. Biol.* **114**, 413-431.
- Bickmeyer, U., Weinsberg, F. und Wiegrad, H. (1994): Effects of deltamethrin on catecholsecretion of bovine chromaffin cells. *Arch. Toxicol.* **68** (8), 532.
- Boedeker, W., Altenburger, R., Faust, M. und Grimme, L. H. (1992): Synopsis of concepts and models for the quantitative analysis of combination effects: from biometrics to ecotoxicology. *ACES* **4**, 45-53.
- Bradbury, S. P. und Coats, J. R. (1989): Comparative Toxicology of Pyrethroid Insecticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **108**, 133-177.
- Bredesen, D. E. (1995): Neuronal apoptosis. *Ann. Neurol.* **38**, 839-851.
- Burdon, R. H., Gill, V. und Rice-Evans, C. (1989): Cell proliferation and oxidative stress. *Free Radic. Res. Commun.* **7**, 149-159.
- Buschfort, C. und Witte, I. (1994): Induction and mechanism of DNA single- and double-strand breaks by tetracycline/Cu(II) in the absence of light. *Carcinogenesis*. **15** (12), 2927-2930.

- Cai, J. und Jones, D. P. (1998): Mitochondrial generation triggered by cytochrome *c* LOSS. *J. Biol. Chem.* **273** (19), 11401-11404.
- Casida, J. E., Gammon, D. W., Glickman, A. H. und Lawrence, L. J. (1983): Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**, 413-438.
- Cohen, J. J., Duke, R. C., Fadok, V. A. und Sellins, K. S. (1992): Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 267-293.
- Cohen, J. J. (1993): Apoptosis. *Immunol. Today* **14** (3), 126-130.
- Collins, A., Dušinská, M., Franklin, M., Somorovká, M., Petrovská, H., Duthie, S., Fillion, M., Panayiotidis, M., Rašlová, K. und Vaughan, N. (1997): Comet assay in human bio-monitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.* **30**, 139-146.
- Collins, A., Ma, A.-G. und Duthie, S. (1995): The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* **336**, 69-77.
- Davies, K. J. (1999): The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *JUBMB Life* **48** (1), 41-47.
- Desagher, S., Gloxinski, J. und Premont, J. (1996): Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* **16**, 2553-2562.
- Devamanoharan, P. S., Ramachandran, S. und Varma, S. D. (1991): Hydrogen peroxide in eye lens: radioisotopic determination. *Curr. Eye Res.* **10** (9), 831-838.
- Dianzani, M. U. (1993): Lipid peroxidation and cancer. *Oncology/Hematology* **15**, 125-147.
- Diel, F., Schock, B., Modi, R., Schrimpf, D., Mitsche, T., Borck, H. und Diel, E. (1995): Wirkung von Pyrethroiden auf menschliche Lymphozyten *in vitro*. *Umwelt & Gesundheit* **3**, 70-75.
- Diel, F., Borck, B., Savtchenko, H., Mitsche, T. und Diel E. (1999): Pyrethroids and piperonyl-butoxide affect human T-lymphocytes *in vitro*. *Toxicol Lett* **107** (1-3), 65-74.
- Dizdaroglu, M. (1992): Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* **339**, 37-59.
- Dureja, P., Casida, J. E. und Ruzo, L. O. (1982): Superoxide-mediated dehydrohalogenation reactions of the pyrethroid permethrin and other chlorinated pesticides. *Tetrahedron Letters* **23**, 5003-5004.
- Duthie, S. J. und Collins, R. (1997): The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 717-724.
- Eadsforth, C. V. und Baldwin, M. K. (1989): Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide, cypermethrin. *Xenobiotica* **13**, 67-72.
- El-Gohary, M., Awara, W. M., Nassar, S. und Hawas, S. (1999): Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology* **132** (1), 1-8.
- Elliotte, E., Janes, N. F., Kimmel, E. C. und Casida, J. E. (1972): Metabolic fate of pyrethrin I, pyrethrin II, and allethrin administered orally to rats. *J. Agr. Food Chem.* **20** (2), 300-313.
- Emerit, I. (1994): Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.* **16**, 99-109.
- Enan, E., Pinkerton, K. E. und Matsumura, F. (1996): Deltamethrin-Induced Thymus Atrophy in Male Balb/c Mice. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 447-454.
- Erexson, G. L. und Tindall, K. R. (2000): Micronuclei and gene mutations in transgenic Big Blue ((R)) mouse and rat fibroblasts after exposure to the epoxide metabolites of 1,3-butadien. *Mutat Res.* **472** (1-2), 105-117.
- Eriksson, P. und Frederiksson, A. (1991): Neurotoxic effects of two different pyrethroids. Bioallethrin and deltamethrin, on immature and adult mice: Changes in behavioral and muscarinic receptor variables. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **108**, 75-85.

- Eriksson, P., Johansson, U., Ahlbohm, J. und Frederiksson A. (1993): Neonatal exposure to DDT induces increased susceptibility to pyrethroid (Bioallethrin) exposure at adult age.- changes in cholinergic muscarinic receptor and behavioral variables. *Toxicology* **77** (1-2), 21-30.
- Espejo, R. T., Canelo, E. S. und Sinsheimer, R. L. (1969): DNA of bacteriophage PM2: a closed circular doublestranded molecule. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **63**, 1164-1168.
- Esterbauer, H. und Cheeseman (1990): Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* **184**, Hrsg.: Packer, L., Academic Press, London, 407-420.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. und Rothender, M.(1989): Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* **6**, 67-75.
- Estman, A., Barry, M. A., Demarcq, C. (1994): The involvement of cell cycle in apoptosis. In the cell cycle: Regulators, Targets, and Clinical Applications. V. W. Hu (ed.) (New York: Plenum Press) pp. 369-378.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. und O'Neill, K. L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* **339**, 37-59.
- Fairbrain, D. W., Walburger, D. K., Fairbrain, J. J. und O'Neill, K. L. (1996): Key morphological changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: diskriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* **18**, 407-416.
- Fakata, K. L., Swanson, S. A., Vorce, R. L. und Stemmer, P. M. (1998): Pyrethroid insecticides as phosphatase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **55** (12), 2017-2022.
- Feig, D. I., Reid, T. M. und Loeb, L. A. (1994a): Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res. (suppl)* **54**, 1890-1894.
- Feig, D. I., Sowers, L. C. und Loeb, L. A. (1994b): Reverse chemical mutagenesis: identification of mutagenic lesions resulting from reactive oxygen-mediated damage to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6609-6613.
- Feron, V. J., Cassee, F. R. und Groten, J. P. (1998): Toxicology of chemical mixtures: international perspective. *Environ. Health Perspect* **106**, 1281-1289.
- Frankenberg-Schwager, M. (1989): Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation, *Radiother. Oncol.* **14**, 307-320.
- Freese, E., Levin, C., Pearce, R., Sreevalsan., T., Kaufmann, J. J., Koski, W. S. und Semo, N. M. (1979): Correlation between the growth inhibitory effects, partition coefficients and teratogenic effects of lipophilic acids. *Teratology* **20**, 413-440.
- Fromigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G. E., Capaccioli, S und Orlandini, S. Z. (2000): Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell Physiol.* **182** (1), 41-49.
- Fujimoto, S., Adachi, Y., Ishimitsu, S. und Ohara, A. (1986): Release of bases from deoxyribonucleic acid by ascorbic acid in the presence of Cu<sup>2+</sup>. *Chem. Pharm. Bull.* **34** (11), 4848-4851.
- Fujita-Yamaguchi, Y. und Kathuria, S. (1988): Characterization of receptor tyrosine-specific protein kinase by the use of inhibitors. Staurosporine is 100-times more potent inhibitor of insulin receptor than IGF-1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **218**, 267-272.
- Fusia, J. F., Marek, W. J. und Puerini, A. Jr. (1987): Nationwide comparative trial of pyrethrin and lindane for pediculosis in children: Experience in northeastern United States. *Current Therapy Research* **41**, 881-890.
- Gandhi, G., Chowdhury, J. B., Sareen, P. K. und Dhillon, V. P. S. (1995): Genotoxic effects of deltamethrin in mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutation Res.* **346**, 203-206.
- Gardner, A. M., Xu, F.-H., Fady, C., Jacoby, F. J. und Duffey, D. C. (1997): Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 73-83.

- Gaughan, L. C., Engel, J. L. und Casida, J. E. (1980): Pesticide Interactions: Effects of Organophosphorus Pesticides on the Metabolism, Toxicity, and Persistence of Selected Pyrethroid Insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **14**, 81-85.
- Goldman, R., Claycamp, G. H., Sweetland, M. A., Sedlov, A. V., Tyurin, V. A., Kisin, E. R., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Wegner, S. L., Grant, S. G. und Kagan, V. E. (1999): Myeloperoxidase-catalyzed redox-cycling of phenol promotes lipid peroxidation and thiol oxidation in HL-60 cells. *Free Radic. Res.* **27**, 1050-1063.
- Gutteridge, J. M. C. und Halliwell, B. (1990): The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 129-135.
- Haas, M. (1992): Der Gift-Detektiv: *natur* **11**, 26-32.
- Hadnagy, W., Seemayer, N. H., Kühn, K.-H., Leng, G. und Idel, H. (1999): Induction of mitotic cell division disturbances and mitotic arrest by pyrethroids in V79 cell cultures. *Toxicol. Lett.* **107**, 81-87.
- Halle, W., Baeger, I., Ekwall, B. und Spielmann, H. (1991): Correlation between *in vitro* cytotoxicity and octanol/water partition coefficients of 29 substances from the MEIC programme. *ATLA* **19**, 338-343
- Halliwell, B. (1990): How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* **9**, 1-32.
- Halliwell, B. und Aruma, O. I. (1991): DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Lett.* **281** (1-2), 9-19.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-4.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (1989): Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. und Cross, C. E. (1992): Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **119**, 598-620.
- Hammer, A., Ferro, M., Tillian, H. M., Tatzber, F., Zollner, H., Schauenstein, E. und Schaur, R. (1997): Effect of oxidative stress by iron on 4-hydroxynonenal formation and proliferative activity in hepatomas of different degrees of differentiation. *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 26-33.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. und Berg, K. (1989): Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. methods* **199**, 203-210.
- Hartmann, A., Plappert, U., Raddatz, M., Grünert-Fuchs, M. und Speit, G. (1994): Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenese* **9** (3), 269-272.
- Hartwig, A., Klyszcz-Nasko, H., Schlepegrell, R. und Beyersmann D. (1993): Cellular damage by ferric nitrilotriacetat and ferric citrate in V79 cells: Interrelationship between lipidperoxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis* **14** (1), 107-112.
- He, F., Wang, S. and Liu, L. (1989): Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Arch. Toxicol.* **63**, 54-58.
- Hecht, R. und Thielmann, H. W. (1978): Purification and characterization of an endonuclease from micrococcus luteus that acts on depurinated and carcinogen modified DNA. *Eur. J. Biochem.* **89** (2), 607-618.
- Hessling E. J., Miller S. E. und Levy N. L. (1980): A direct comparison of procedures for the detection of mycoplasma in tissue-culture. *J. Immunol. Methods* **38**, (3-4), 315-328.
- Hetts, S. W. (1998): To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* **279** (4), 300-307.
- Hewitt, R. R., Harless, J., Loyd, R. S., Love, J. und Robberson D. L. (1979): Molecular test systems for identification of DNA-reactive agents. In: Griffin, C. und Shaw, C. R. (Hrsg.): Carcinogens: Identification and mechanism of action, Raven Press, New York.

- Hiraku, Y. und Kawanishi, S. (1996): Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. *Cancer Res.* **56**, 5172-5178.
- Hollensworth, S. B., Shen, C.-C., Sim, J. E., Spitz, D. R., Wilson, G. L. und LeDoux, S. P. (2000): Glia cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1161-1174.
- Hoyt, K. R., Gallagher, A. J., Hastings, T. G. und Reynolds, J. (1997): Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons. *Neurochem. Res.* **22** (3), 333-340.
- Ikeda, K., Kajiwara, K., Tanabe, E., Tokumaru, S., Kishida, E., Masuzawa, Y. und Kojo, S. (1999): Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in chemically induced apoptosis of HL-60 cells. *Biochem. Pharmacol.* **57** (12), 1361-1365.
- Imlay, J. A. und Linn, S. (1988): DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**, 1302-1309.
- Indap, M. A. und Rao, S. G. (1995): Cell death by apoptosis and cancer chemotherapy. *Natl. Med. J. India* **8** (2), 65-67.
- Isacson, O. (1993): On neuronal health. *Trends Neurosci.* **16** (8), 306-308
- Jacobi, H., Hinrichsen, M.-L., Weß, D. und Witte I. (1999): Induction of lipid peroxidation in human fibroblasts by the antioxidant propyl gallat in combination with copper (II). *Toxicol. Lett.* **110**, 183-190.
- Jacobi, H., Krieger, G. und Witte, I. (1995): Characterization and applicability of a cytotoxicity assay determining growth inhibition after a 1-hour treatment with xenobiotics in human cell culture. *Toxicol. in Vitro* **9**, 751-756.
- Jacobson, M. D. (1996): Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* **21** (3), 83-86.
- Jajte, J. M. (1997): Chemicals-induced changes in intracellular redox state and in apoptosis. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **10** (2), 203-212.
- Jaruga, P. und Dizaroglu, M. (1996): Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res.* **24** (8), 1389-1394.
- Johansson, U., Fredriksson, A. und Eriksson, P. (1995): Bioallethrin causes permanent changes in behavioural and muscarinic acetylcholine receptor variables in adult mice exposed neonatally to DDT. *Eur. J. Pharmacol.* **293** (2), 159-166.
- Jones, O. T. und Lee, A. G. (1986): Effects of pyrethroids on the activity of a purified (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase. *Pestic. Biochem. Physiol.* **25**, 420-430.
- Kale, M., Rathore, S., John, S. und Bhatnagar, D. (1999): Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* **105**, 197-205.
- Kalter, D. C., Sperber, M. D. und Rosen, T. (1987): Treatment of pediculosis pubis. *Arch. Dermatol.* **123**, 1315-1319.
- Kerr, J. F. R. (1971): Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* **105**, 13-20.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer* **26**, 239-47.
- Kimura, K. I. und Truman, J. W. (1990): Postmetamorphic cell death in nervous and muscular systems of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **10** (2), 403-411.
- Kitamura, Y., Furukawa M., Matsuoka, Y., Tooyama, I., Kimura, H., Nomura, Y., Taniguchi, T. (1998): In vitro and in vivo induction of heme oxygenase-1 in rat glia cells: possible involvement of nitric oxide production from inducible nitric oxide synthase. *Glia* **22**, 138-148.
- Kitamura, Y., Ota, T., Matsuoka, Y., Tooyama, I., Kimura, H., Shimohama, S., Nomura, Y., Gebicke-Haerter, P. J. und Taniguchi, T. (1999): Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glia cells. *Glia* **25**, 154-164.

- Klein, S. M., Cohen, G. und Cederbaum, A. I. (1981): Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydrogen radical generation systems. *Biochemistry* **20**, 6006-6012.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. und Mignotte, B. (1995): The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* **9**, 1277-1287.
- Kuo, M. L., Shiah, S. G., Wang, C. J. und Chuang, S. E. (1999): Suppression of apoptosis by Bcl-2 to enhance benzene metabolites-induced oxidative DNA damage and mutagenesis: a possible mechanism of carcinogenesis. *Mol. Pharmacol.* **55** (5), 894-901.
- Labourdette, G. und Sensenbrenner, M. (1995): Growth factors and their receptors in the central nervous system. In: Kettenmann H., Ransom, B. R., (eds.) *Neuroglia*. New York: Oxford University Press. p 441-459.
- Lawrence, L. J. und Casida, J. E. (1982): Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. *Pestic. Biochem. Physiol.* **18**, 9-14.
- Leidecker, R. (1992): Untersuchungen von DNA-Schädigung durch organische Lösungsmittel. Diplomarbeit, *Carl von Ossietzky* Universität Oldenburg.
- Le Quesne, P. M. (1980): Transient facial sensory symptoms following exposure to synthetic pyrethroids: A clinical and electrophysiological assessment. *Neurotoxicology* **2**, 1-11.
- Li, H. und Byrnes, R. W. (1999): Association of redox-active iron bound to high molecular weight structures in nuclei with inhibition of cell growth by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radic. Biol. Med.* **26** (1-2), 49-60.
- Lieberthal, W., Triaca, V. und Levine, J. (1996): Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelia cells: apoptosis vs. necrosis. *Am. J. Physiol.* **270**, F 700-708.
- Lüken, A. (2000): Kombinationswirkungen von oxidativem Stress und unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien in menschlichen Fibroblasten. Diplomarbeit, *Carl von Ossietzky* Universität Oldenburg.
- Maccarrone, M., Bellincampi, L., Melino, G. und Finazzi Agrò, A. (1998): Cholesteral, but not its esters, triggers programmed cell death in human erythroleukemia K562 cells. *Eur. J. Biochem.* **253**, 107-113.
- Madsen, C., Claesson, M. H. und Röpke, C. (1996): Immunotoxicity of the pyrethroid insecticides deltamethrin and  $\alpha$ -cypermethrin. *Toxicology* **107**, 219-227.
- Maiorino, M., Zamburlini, A., Roveri, A. und Ursini, F. (1995): Copper-induced lipid peroxidation in liposomes, micelles and LDL: which is the role of vitamin E? *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 67-74.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahou, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C. LaFace, D. M. und Green, D. R. (1995): Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182** (5), 1545-1556.
- Mates, M. (2000): Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153** (1-3), 83-104.
- Matsuoka, Y., Kitamura, Y., Okazaki, M., Kakimura, J., Tooyama, I., Kimura, H. und Taniguchi, T. (1998): Kainic acid induction of heme oxygenase in vivo and in vitro. *Neuroscience* **85**, 1223-1233.
- McConey, D. J., Orrenius, S. und Jondal, M. (1990): Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol. Today* **11**, 120-121.
- Melho-Filho, A. C., Hoffman, M. E. und Meneghini, R. (1984): Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.* **218**, 273-275.
- Meneghini, R. (1988): Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. *Mutat. Res.* **195**, 215-230.
- Meng, H., Terado, T. und Kimura, H. (1998): Apoptosis induced by X-rays and chemical agents in murine fibroblastic cell lines with a defect in repair of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (5), 503-510.

- Mestres, R. und Mestres, G. (1992): Deltamethrin: Uses and environmental safety. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **124**, 1-18.
- Meylan, W. M. und Howard, P. H. (1995): Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J. Pharm. Sci.* **84**, 83-92.
- Milligan, J. R., Wu, C. C., Jy, N. G., Aguilera, J. A. und Ward, J. F. (1996): Characterization of the reaction rate coefficient of DNA with the hydroxyl radical. *Radiat. Res.* **146** (5), 510-513.
- Miyamoto, J., Kaneko, H., Tsuji, R. und Okuno, Y. (1995): Pyrethroids, nerve poisons: how their risks to human health should be assessed. *Toxicol. Lett.* **82/83**, 933-940.
- Moller, P., Wallin, H. und Knudsen, L. E. (1996): Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem. Biol. Interact.* **102** (1), 17-36.
- Morisseau, C., Derbel, M., Lane, T. R., Stoutamire, D. und Hammock, B. D. (1999): Differential induction of hepatic drug-metabolizing enzymes by fenvaleratic acid in male rats. *Toxicol. Sci.* **52** (2), 148-153.
- Moya-Quilles, M. R., Muñoz-Delgado, Cecilion, J. und Vidal, J. (1996): Effects of the pyrethroid insecticide permethrin on membrane fluidity. *Chem. Phys. Lipids.* **79**, 21-28.
- Müller-Mohnsen, H. und Hahn, K. (1995): Über eine Methode zur Früherkennung neurotoxischer Erkrankungen (am Beispiel einer Pyrethroidintoxikation). *Gesund.-Wes.* **57**, 214-217.
- Mumtaz, M. M., Spies, I. G., Clewell, H. J. und Yang, R. S. H. (1994): Symposium overview: risk assessment of chemical mixtures: biologic and toxicologic issues. *Fundam. Appl. Toxicol.* **21**, 258-269.
- Narahashi, T. (1992): Nerve membrane Na<sup>+</sup> channels as target of insecticides. *TIPS* **13**, 236-241.
- Naharashi, T., Carter, D. B., Frey, J., Ginsburg, K., Hamilton, B. J., Nagata, K., Roy, M. L., Song, J.-H. und Tatebayashi, H. (1995): Sodium channels and GABA<sub>A</sub> receptor-channels complex as targets of environmental toxicants. *Toxicology Letters* **82/83**, 239-245.
- Nedergaard M. (1994): Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* **263**, 1768-1771.
- Östling, O. und Johanson, K. L. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291-298.
- Orren, D. K., Petersen, L. N. und Bohr, V. A. (1997): Persistent DNA damage inhibits S-Phase and G2 progression, and results in apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **8** (6), 1129-1142.
- Orrenius, S. (1993): Mechanism of oxidative damage. In: Poli, G., Albano, E., Dianzani, M. U., eds. *Free radicals: From basic science to medicine*. Basel: Birkhauser Verlag, 47-64.
- Oya, Y. und Yamamoto, K. (1988): The biological activity of hydrogen peroxide. IV. Enhancement of its clastogenic actions by coadministration of L-histidine. *Mut. Res.* **198**, 233-240.
- Perez, J. M., Matesanz, A. I., Martin-Ambite, A., Navarro, P., Alonso, C. und Souza, P. (1999): Synthesis and characterization of complexes of p-isopropyl-benzaldehyde and methyl-2-pyridyl ketone thiosemicarbazones with Zn (II) and Cd (II) metallic centers. Cytotoxic activity and induction of apoptosis in Pam-ras cells. *J. Inorg. Biochem.* **75** (4), 255-261.
- Pluijmen, M., Devron, C., Montesano, R., Malaveille, C., Hautefeuille, A. und Bartsch, H. (1994): Lack of mutagenicity of synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium* strains and V79 Chinese hamster cell. *Mutation Res.* **137**, 7-15.
- Poot, M. und Joenje, H. (1993): Oxidative stress and cell proliferation *in vivo*. *DNA and free radicals*. Hrsg.: Halliwell, B. und Aruma, O., Ellis Horwood Limited, Chichester.
- Poulos, L., Athanasis, S. und Coutselinis, A. (1982): Acute intoxication with cypermethrin (NRDC 149). *J. Toxicol-Clin. Toxicol.* **19**, 519-520.

- Puig, M., Carbonell, E., Xamena, N., Creus, A. und Marcos, R. (1989): Analysis of cytogenic damage induced in cultured lymphocytes by the pyrethroid insecticides cypermethrin and fenvalerate. *Mutagenesis* **4**, 72-74.
- Purschke, M. (1999): Vergleich der Hydroxylradikalbildner Tetrachlorhydrochinon und Wasserstoffperoxid hinsichtlich zyto- und genotoxischer Einzelwirkungen sowie ihrer Kombinationswirkungen mit Pentachlorphenol. Diplomarbeit, *Carl von Ossietzky Universität Oldenburg*.
- Qiao, L., Hanif, R., Sphicas, E., Shiff, S. J. und Rigas, B. (1998): Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **55** (1), 53-64.
- Radi, R., Beckmann, J. S., Bush, K. M. und Freeman, B. A. (1991): Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 481-487.
- Raff, M. (1998): Cell suicide for beginners. *Nature* **396**, 119-122.
- Rao, G. V. und Rao, K. S. (1993): Inhibition of monoamine oxidase-A of rat brain by pyrethroids - an in vitro kinetic study. *Mol. Cell Biochem.* **124** (2), 107-114.
- Richter-Landsberg, C. und Heinrich, M. (1995): S-100 immunreactivity in rat brain glia cultures is associated with both astrocytes and oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* **42**, 657-663.
- Richter-Landsberg, C. und Vollgraf, U. (1998): Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp. Cell Res.* **244** (1), 218-229.
- Riley, A. E. (1994): Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing. *Int. J. Radiat. Biol.* **65** (1), 27-33.
- Sarkar, S. N., Balasubramanian, S. V. und Sikdar, S. K. (1993): Effects of fenvalerate, a pyrethroid insecticide on membrane fluidity. *Biochem. Biophys. Acta.* **1147** (1), 137-142.
- Schaur, K. M., Zollner, H. und Esterbauer, H. (1991): Biological effects of aldehydes with particular attention to 4-hydroxynonenal and malonaldehyde. *Membrane Lipid Oxidation*. Vol. III. Hrsg.: Vigo-Pelfrey, CRC Press, Florida, 142-158.
- Schechter, M. S., Green, N. und LaForge, F. B. (1949): Synthesis of structurally related compounds of the natural pyrethrins. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 3165.
- Scherb, H. und Weigelt, E. (1994): Statistische Deskription von Gesundheitsbeschwerden nach Pyrethroidexposition. *Gesundh.-Wes.* **56**, 622-628.
- Schütze, L. (1996): Wirksamer Insektenschutz mit Pyrethroiden. Bei sachgerechter Anwendung unschädlich für den Menschen. *Gesellschaftspolitische Kommentare* **7**, 22-26.
- Sies, H. (1985): Oxidative Stress: Introduction: In: Sies, H. (ed.) *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, pp. xv-xxi, London: Academic Press.
- Simonian, N. A. und Coyle, J. T. (1996): Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 83-106.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. und Schneider, E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Expl. Cell Res.* **175**, 184-191.
- Singh, N. P., Tice, R. R., Stephens, R. E. und Schneider, E. L. (1991): A microgel electrophoresis technique for the direct quantification of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat. Res.* **252**, 289-296.
- Slater, A. F. G., Stefan, C., Nobel, I., van den Dobbelsteen, D. J. und Orrenius S. (1995): Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol. Lett.* **82/83**, 149-153.
- Slater, A. F. G., Stefan, C. und Orrenius S. (1995): The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochem. Biophys. Acta* **1271**, 59-62.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. D. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.



- Smith, M. A., Sayre, L. M., Monnier, V. M. und Perry, G. (1995): Radical AGEing Alzheimer's disease. *Trends. Neurosci.* **18**, 172-176.
- Speit, G. und Hartman, A. (1995): The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* **10** (6), 555-559.
- Speit, G. und Hartmann, A. (1999): The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* **113**, 203-212.
- Spindler, M.-P. (1998): DNA-schädigende Kombinationswirkung von Tetrachlorhydrochinon und Methylmethansulfonat an PM2-DNA und in menschlichen Fibroblasten. Diplomarbeit, *Carl von Ossietzky Universität Oldenburg*.
- Staudinger, H. und Ruzicka, L. (1924): Insektentötende Stoffe X. Über die Synthese von Pyrethrinen. *Helv. Chim. Acta* **7**, 448-458.
- Stolz, P., Krooß, J. und Meierhenrich, U. (1994): Vorkommen und Bewertung von Pyrethroiden in Innenräumen. *Umwelt & Gesundheit* **4**, 6-10.
- Stoßberg, H. (2000): Der Einfluß nicht genotoxischer Umweltchemikalien auf die DNA-schädigende Wirkung von Tetrachlorhydrochinon in menschlichen Fibroblasten. Diplomarbeit, *Carl von Ossietzky Universität Oldenburg*.
- Sumer, S., Diril, N. und Izbirak, A. (1990): The mutagenicity of some insecticides in the Salmonella/microsome test system. *Mikrobiyol. Bul.* **24**(2), 103-110.
- Surrallés, J., Carbonelle, E., Puig, M., Xamena, N., Creus, A. und Marcos, R. (1990). Induction of mitotic micronuclei by the pyrethroid insecticide fenvalerate in cultured human lymphocytes. *Toxicol. Lett.* **54**, 151-155.
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalán, J., Norppa, H. und Marcos, R. (1995): Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* **341**, 169-184.
- Swe, M. und Sit, K. H. (2000): zVAD-fmk and DEVD-cho induced late mitosis arrest and apoptotic expressions. *Apoptosis* **5**, 29-36.
- Tebourbi, O., Rhouma, K. B. und Sakyl, M. (1998): DDT induces apoptosis in rat thymocytes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **61**, 216-223.
- Teramoto, S., Tomita, T., Matsui, H., Ohga, E., Matsue, T. und Ouchi, Y. (1999): Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. *Jpn. J. Pharmacol.* **79** (1), 33-40.
- Thompson, C. B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
- Treon, J. R. und Cleveland, F. P. (1955) Toxicity of certain chlorinated hydrocarbon insecticides for laboratory animals with special reference to aldrin and dieldrin. *J. Agric. Food Chem.* **3**, 402-408.
- Tsang, S. Y., Tam, S. C., Bremner, I. und Burkitt, M. J. (1996): Research communication copper-1,10-phenanthroline induces internucleosomal DNA fragmentation in HepG2 cells, resulting from direct oxidation by hydroxyl radicals. *Biochem. J.* **317**, 13-6.
- Turco, L., De Angelis, I., Stamatii, A. und Zucco, F. (2000): Apoptosis evaluation in epithelial cells exposed to different chemicals: relevance of floating cells. *Cell. Biol. Toxicol.* **16** (1), 53-62.
- Vainio, H., Sorsa, M. und McMichael, A. J. (Hrsg.) (1990): Complex mixtures and cancer risk: IARC, Lyon.
- Varma, S. D. und Devamanoharan, P. S. (1990): Excretion of hydrogen peroxide in human urine. *Free Radic. Res. Commun.* **8** (2), 73-78.
- Vaux, D. L. (1993): Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 786-789.
- Verschoye, R. D. und Aldridge, W. N. (1980): Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Arch. Toxicol.* **45**, 325-329.

- Vijverberg, H. P. M. und van der Bercken, J. (1982): Action of pyrethroid insecticides on the vertebrate nervous system. *Neurophathol. Appl. Neurobiol.* **8**, 421-440.
- Vijverberg, H. P. M. und van der Bercken, J. (1990): Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Crit. Rev. Toxicol.* **21**, 105-126.
- Vollgraf, U., Wegner, M. und Richter-Landsberg, C. (1999): Activation of AP-1 and nuclear factor-kappaB transcription factors is involved in hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes. *J. Neurochem.* **73** (6), 2501-2509.
- Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R. und Paipis, R. (1965): The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 1104-1111.
- Walker, P. R. und Sikorska, M. (1994): Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* **72**, 615-623.
- Wani, M. A., Zhu, Q., El Mahdy, M., Venkatalama, S. und Wani, A. A. (2000): Enhanced sensitivity to anti-benzo(a)pyrene-diol-epoxide DNA damage correlates with decreased global genomic repair attributable to abrogated p53 function in human cells. *Cancer Res.* **60** (8), 2273-2280.
- Wax, P. M. und Hoffman, R. S. (1994): Fatality associated with inhalation of a pyrethrin shampoo. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **32** (4), 457-460.
- Weß, D. (1995): Entwicklung und Evaluation einer Methode zur Untersuchung der Lipidperoxidation in menschlichen Fibroblasten, induziert durch Kupfer (II) in Kombination mit ausgewählten Xenobiotika. Diplomarbeit, *Carl von Ossietzky Universität Oldenburg*.
- Witte, I., Frahmman, E. und Jacobi, H. (1995a): Comparison of the sensitivity of three toxicity tests determination survival, inhibition of growth and colony-forming ability in human fibroblasts after incubation with environmental chemicals. *Toxicol. in Vitro* **9** (3), 327-331.
- Witte, I. und Jacobi, H. (1993): Entwicklung einer Prüfvorschrift zur Erkennung synergistischer Wirkung zwischen membranschädigenden Substanzen und anderen Schadstoffen. Umweltbundesamt, Forschungsbericht Nr. 10604031.
- Witte, I. und Jacobi, H. (1995): Additive und synergistische Kombinationswirkungen von Xenobiotika in subtoxischen Konzentrationen auf menschliche Fibroblasten. *Z. Umweltchem. Ökotox.* **7** (5), 254-259.
- Witte, I. und Krieger, G. (1997): Genotoxische Wirkung durch Redoxreaktionen sauerstoffhaltiger organischer Verbindungen mit Kupfer (II) *in vitro* und in Zellkultur. Abschlußbericht (Geschäftszeichen Wi 1117/1-1 bis 1-6) DFG. Fachbereich Biologie und Institut für Chemie und Biologie des Meeres der *Carl von Ossietzky Universität Oldenburg*.
- Witte, I., Jacobi, H. und Juhl-Strauss, U. (1995b): Correlation of Synergistic Cytotoxic Effects of Environmental Chemicals in Human Fibroblasts with their Lipophilicity. *Chemosphere* **31**, 4041- 4049
- Witte, I., Jacobi, H. und Juhl-Strauss, U. (2000): Krebsrisiken durch Gemische aus Umweltchemikalien und erbgutschädigenden Stoffen. Abschlußbericht (Fördernummer: 07GTX03/6) BMBF, *Carl von Ossietzky Universität Oldenburg*.
- Woodard, G., Ofner, R. R. und Montgomery, C. M. (1945): Accumulation of DDT in the body fat and its appearance in the milk of dogs. *Science* **102**, 177.
- Wu, A. und Liu, Y. (2000): Apoptotic cell death in rat brain following deltamethrin treatment. *Neurosci. Lett.* **279** (2), 85-88.
- Wu, A., Ren, T., Hu, Q. und Liu, Y. (2000): Deltamethrin induces alteren expression of P53, Bax and Bcl-2 in rat brain. *Neurosci. Lett.* **284** (1-2), 29-32.
- Wyllie, A. H., Bellamy, C. O. C., Bubb, V. J., Clarke, A. G., Corbet, S., Curtis, L., Harrison, D. J., Hooper, M. L., Toft, N., Webb, S. und Bird, C. C. (1999): Apoptosis and carcinogenesis. *Br. J. Cancer* **80**, 34-37.

- Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L. und Dunlop, D. (1984): Chromatin cleavage in apoptosis - association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.*, **142**, 67-77.
- Yamamoto, I. und Casida, J. E. (1966): O-Demethyl pyrethrin II analogs from oxidation of pyrethrin I, allethrin, dimethrin, and phtalthrin by house fly enzyme system. *J. Econ. Entomol.* **59**, 1542-1543.
- Yuxiang, M., Tetsuya, O., Teruyuki, K., Jie, L., Kaori, E. und Shigeru, o. (1999): Cuppric-nitritriacetate-induced apoptosis in HL-60 cells association with lipid peroxidation, release of cytochrome c from mitochondria, and activation of caspase-3. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 227-233.
- Zamai, L., Falcieri, E., Marhefka, G. und Vitale, M. (1996): Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. *Cytometry* **23** (4), 303-311.
- Ziegler-Skylakakis, K. und Andrea, U. (1987): Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Res.* **192**, 65-67.
- Zschenker, O. (1996): DNA-schädigende und cytotoxische Wirkung von S-Bioallethrin in Kombination mit Cu(II). Diplomarbeit, *Carl von Ossietzky Universität Oldenburg*.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Geburtsdatum 22. März 1967  
Geburtsort Jever  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Eltern Günther Hohlen,  
Walburga Hohlen, geb. Langer,

## Ausbildung

Schulausbildung 1983-1986 Fachgymnasium Hauswirtschaft an den Berufsbildenden Schulen in Jever, Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Studium WS1986/87 bis SS 1995 Diplom-Chemie an der *Carl von Ossietzky* Universität Oldenburg; Verleihung des Hochschulgrades Diplom-Chemikerin

1995 Wissenschaftliche Hilfskraft beim "Informationsdienst Pestizide und Gesundheit" (IPuG) Fachbereich 7 und ICBM der *Carl von Ossietzky* Universität Oldenburg

seit Jan. 1996 Doktorandin an der *Carl von Ossietzky* Universität Oldenburg, in der Arbeitsgruppe Biochemie unter der Leitung von Frau apl. Prof. Dr. Irene Witte. Arbeitstitel: Toxische Wirkung von S-Bioallethrin unter oxidativen Streßbedingungen in Fibroblasten und Gliazellen: Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt von der Heinz Neumüller Stiftung sowie über das Graduiertenstipendium (GradFöG).

Juli-Oktober 2000 Eigenes Projekt im Rahmen der internationalen Frauenuniversität (*ifu*) in Hannover: Titel: „Mensch, Expo?“ (über die Ausstellung „life is chemistry“ im Themenpark Mensch)

## Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner „Doktor-Mutter“, Frau apl. Prof. Dr. Irene Witte, für die Betreuung dieser Arbeit. Durch die Überlassung des interessanten Themas ergaben sich viele anregende Diskussionen, die jederzeit möglich waren. Aber zum Beispiel auch durch die Erzählung der Anekdote „Die blonde Amazone ritt durch das Morgengrauen“ war eine besondere Art der Betreuung gegeben. Die Crux den ersten „entscheidenden“ Satz in dem Kapitel der Einleitung zu formulieren, war nach dieser Geschichte vergleichsweise unkompliziert.

Für die Bereitschaft, diese Arbeit als Koreferentin zu begutachten, möchte ich Frau Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg danken. Für die großzügige Bereitstellung der Materialien, der technischen Geräte sowie der Überlassung von Gliazellen möchte ich mich ebenso wie für die produktiven Gespräche bedanken.

Ich danke allen Angehörigen aus der Arbeitsgruppe von Frau apl. Prof. Irene Witte und aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg. Ich danke den technischen Assistentinnen Frau Elke Frahm, Frau Anke Müller, Frau Angelika Spanjer, Frau Marita Weerts-Eden, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich danke den vielen DiplomantInnen und DoktorandInnen für die fachliche Auseinandersetzung und dem gemeinsamen Spaß während der Forschungszeit im Labor.

Ich danke Frau Birgit Siemers, die mir sowohl im Labor, als auch mit dem Umgang meines absturz-liebenden PC (Birgit, ich krieg‘ die „Lyse“) eine große Hilfe war.

Frau Dr. Heike Jacobi, Frau Dr. Ursula Juhl-Strauss, Herrn Dr. Ulrich Vollgraf und all den anderen Freundinnen und Freunden, vor allem Frau Tomma Hangen und Frau Dr. Ursula Gerdes, möchte ich an dieser Stelle danken, da sie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Krupuk für sein beruhigendes Schnurren und daß er mir immer noch ein Fleckchen auf dem Sofa freiläßt.

Ich danke meinen Eltern für jegliche Unterstützung während meines Studiums und für die mitgelittenen und mitgefremten Stunden sowohl vor als auch nach Prüfungen und Kolloquien.

Ich danke Dir, liebe Marion, daß Du da bist. Dir ist diese Arbeit gewidmet.

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Oldenburg, den 22.12.2000