



**Zyto- bzw. gentoxische Wirkschwellen
von Gemischen aus 2 – 8 Umweltchemikalien
in Abhängigkeit von der Lipophilität der Komponenten**

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades und Titels eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) angenommene Dissertation

von Frau Heike Sommer

geboren am 9. Oktober 1961 in Celle

Erstgutachterin
Zweitgutachterin
Tag der Disputation

Prof. Dr. Irene Witte
Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg
24. Mai 2006

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	I
II. Tabellenverzeichnis	III
III. Abbildungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	9
2.1. Material	9
2.1.1. Geräte	9
2.1.2. Chemikalien	10
2.1.3. Puffer und Lösungen	12
2.2. Methoden	18
2.2.1. Zelllinien	18
2.2.2. Zellkulturen	18
2.2.3. Inkubation der Zellen mit den Schadstofflösungen	19
2.2.4. Zytotoxizitäts-Tests	20
2.2.4.1. Lumineszenz (ATP-assay)	20
2.2.4.2. Fluoreszenz (FDA-assay)	21
2.2.4.3. Fotometrie (MTT-assay)	23
2.2.4.4. Auswertung der Messergebnisse und Berechnung der Zytotoxizität	24
2.2.4.5. Bewertung der Kombinationseffekte	24
2.2.5. Gentoxizitäts-Test	25
2.2.5.1. comet-assay	25
2.2.5.2. Statistische Auswertung des comet-assays	28
2.2.6. Koloniebildungsfähigkeit	29
2.2.7. HPRT-Mutagenitätstest	30
2.2.8. Datenauswertung	31
3. Ergebnisse	32
3.1. Ermittlung eines geeigneten Vitalitätsnachweises	32
3.1.1. Vergleich verschiedener Vitalitätsnachweise	32

3.1.2.	Bestimmung der Nachweisgrenze der Vitalität	33
3.2.	Optimierung des FDA-assays	34
3.2.1.	FDA-Einwirkzeit	34
3.2.2.	Verschiedene FDA-Färbemethoden	34
3.2.3.	Optimierte Methode des FDA-assays	35
3.3.	Zytotoxizität	35
3.3.1.	Zytotoxische Einzeleffekte	35
3.3.2.	Zytotoxische Kombinationseffekte	40
3.3.2.1.	Konzentrationsabhängigkeit	40
3.3.2.1.1.	Kombinationswirkungen von binären Gemischen	40
3.3.2.1.2.	Kombinationswirkungen von Gemischen aus bis zu 8 Komponenten	43
3.3.2.2.	Zeitabhängigkeit	47
3.4.	Gentoxische Effekte	50
3.4.1.	Comet-assay	50
3.4.1.1.	Einzelwirkung von Methansulfonsäuremethylester	50
3.4.1.2.	Kombinationswirkungen zwischen dem Kanzerogen MMS und nicht gentoxisch wirkenden Chemikalien	52
3.4.2.	Induktion von Mutationen im HPRT-Mutagenitätstest	57
4.	Diskussion	60
4.1.	Zytotoxische Wirkungen der Einzelsubstanzen	61
4.2.	Zytotoxische Kombinationseffekte	64
4.2.1.	Kombinationseffekte in Abhängigkeit von der Konzentration	64
4.2.2.	Kombinationseffekte in Abhängigkeit von der Zeit	67
4.3.	Gentoxische Kombinationseffekte	69
4.4.	HPRT-Mutagenitätstest	72
4.5.	Schlussfolgerungen und Ausblick	72
5.	Zusammenfassung und summary	75
6.	Literaturverzeichnis	79

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Ampuwa [®]	destilliertes Wasser (für medizinische Zwecke)
AP	Apurin oder Apyrimidin
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
BUND	Bund für Umwelt- und Naturschutz Deutschland
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
CAS	Chemical Abstracts Service
2,4 D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNR	Deutscher Naturschutzring
Do	abfallender Bereich einer Dosis-Effekt-Kurve
D-PBS	Dulbeccos phosphate buffered saline
Dq	Schulterbereich einer Dosis-Effekt-Kurve
DSB	Doppelstrangbruch
EC ₅₀	effective concentration (50 %)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
ESB	Einzelstrangbruch
FF	Fehlerfortpflanzung
FCS	fetal calf serum
FDA	Fluoreszeindiacetat
griech.	griechisch
h	Stunde (lat. <i>hora</i>)
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IC ₂₀	inhibitory concentration (20 %)
KBF	Koloniebildungsfähigkeit
korr.	korrigiert
λ	Wellenlänge
log P_{OW}	Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
LMP	low melting point
MEM	minimum essential medium
min.	Minuten
mM	millimolare Konzentrationsangabe
MF	Mutantenfrequenz
MMS	Methansulfonsäuremethylester
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
n	Anzahl (lat. <i>numerus</i>)
NaOH	Natriumhydroxid
NHDF	normal human dermal fibroblasts
NOEC	no observed effect concentration
4-NQO	4-Nitrochinolin-1-oxid
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
o. g.	oben gezeigten
p. a.	pro analysis
PBS	phosphate buffered saline
PCP	Pentachlorphenol
REACH	registration, evaluation and authorisation of chemicals
RT	Raumtemperatur
t_0	Zeitpunkt null (t_1 etc. entsprechend)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SFM	serumfreies Medium
Tab.	Tabelle
TCHQ	Tetrachlorhydrochinon
TCP	2,4,6 Trichlorphenol
TG	6-Thioguanin
TU	toxic units
u. a.	unter anderem (-n)
vergl.	vergleiche

VMG-NA	Validation Management Groups on non-animal tests
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Liste der unspezifisch wirksamen Chemikalien mit Strukturformeln, $\log P_{ow}$ -Werten und CAS-Nummern	16
Tab. 2	Das Kanzerogen MMS mit Strukturformel, $\log P_{ow}$ -Wert und CAS-Nummer	27
Tab. 3	NOEC- und EC_{50} -Werte der unspezifisch wirksamen Chemikalien	38
Tab. 4	Toxizitäts- und M-Werte für binäre Substanzgemische der unspezifisch wirksamen Chemikalien auf verschiedenen Toxizitätsleveln, die mit EC_{30} bis EC_{50} angegeben wurden	42
Tab. 5	Toxizitätswerte (als NOEC je Substanz) und M-Werte für Substanzgemische aus 3 – 8 Einzelkomponenten auf verschiedenen Toxizitätsleveln, die mit EC_{30} bis EC_{50} angegeben wurden	46
Tab. 6	HPRT-Mutationen in V79 Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit 0,3 mM PCP und 0,8 mM MMS allein sowie mit 0,2 bzw. 0,3 mM PCP in Kombination mit 0,8 mM MMS nach 7 bzw. 11 Tagen Expressionszeit	58

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Geschädigter Fibroblastenkern, der im Mikroskop als Kommet erscheint	26
Abb. 2	Vergleich der Kombinationswirkung aus 4 mM 4-Chloranilin mit ansteigenden 2,4 D-Konzentrationen nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium, anhand der Vitalitätsnachweise ATP-, FDA- und MTT-assay	32
Abb. 3	Vergleich der benötigten Zellzahlen/well zur Ermittlung der Vitalität, jeweils für den ATP- und den FDA-assay	33
Abb. 4	Verschiedene FDA-Färbemethoden nach 1-stündiger Inkubation der menschlichen Fibroblasten mit 4-Chloranilin und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium	34
Abb. 5	NOEC-Werte der Substanzen Glyphosat, 2,4 D, 4-Chloranilin und PCP, ermittelt nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium	36
Abb. 6	Dosis-Effekt-Kurven der verwendeten 8 unspezifisch wirksamen Chemikalien nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium, dargestellt als Kurvenschar	37
Abb. 7	Korrelation zwischen der Lipophilität ($\log P_{OW}$) und der Zytotoxizität ($\log NOEC$) der eingesetzten Chemikalien	39
Abb. 8	Korrelation zwischen der Lipophilität ($\log P_{OW}$) und der Zytotoxizität ($\log EC_{50}$) der eingesetzten Chemikalien	39
Abb. 9	Dosis-Effekt-Kurven der binären Gemische aus (a) 2,4 D und 4-Chloranilin und (b) 2,4 D und Glyphosat sowie der eingesetzten Komponenten allein, dargestellt als NOEC-Wert je Komponente	41
Abb. 10	Kombinationswirkungen der unspezifisch wirksamen Chemikalien in Gemischen aus bis zu 8 Komponenten, dargestellt als Gesamt-NOEC der Substanz-Gemische	43
Abb. 11	Kombinationswirkungen der unspezifisch wirksamen Chemikalien in Gemischen aus bis zu 8 Komponenten, dargestellt als NOEC der Substanzen je Komponente	45

Abb. 12	Wachstumshemmung durch (a) 2,4 D, (b) 2,4 D und PCP, (c) 2,4 D, PCP und 4-Chloranilin an menschlichen Fibroblasten über einen Messzeitraum von 96 Stunden	48
Abb. 13	Gentoxische Wirkung von MMS in steigenden Konzentrationen auf menschliche Fibroblasten nach 1-stündiger Inkubationszeit	50
Abb. 14	Histogramm zur prozentualen Verteilung der tail moments nach DNA-Schädigung durch MMS	51
Abb. 15	Gentoxische Wirkung von 0,4 mM MMS in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen von PCP allein und Gemischen der unspezifisch wirksamen Chemikalien aus 2 – 8 Komponenten (angegeben als Gesamt-NOEC des Gemischs) nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen	53
Abb. 16	Gentoxische Wirkung von 0,4 mM MMS in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen von PCP allein und Gemischen der unspezifisch wirksamen Chemikalien aus 2 – 8 Komponenten (angegeben als NOEC je Substanz im Gemisch) nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen	55
Abb. 17	Nicht auswertbare Zellkerne nach 1-stündiger Inkubation mit einer Kombination aus 0,4 mM MMS und PCP in ansteigenden Konzentrationen	56
Abb. 18	Mutantenfrequenz von V79 Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit 0,3 mM PCP und 0,8 mM MMS allein sowie mit 0,2 bzw. 0,3 mM PCP in Kombination mit 0,8 mM MMS nach 7 und 11 Tagen Expressionszeit	57

In memoriam

Rosemarie Alms

Frieda Alms

et

Liesbeth Metzger

Olga Just

dilectissimas reverendissimas semperque memorandas

1. Einleitung

Die Belastung der Umwelt mit Chemikalien hat parallel mit der wirtschaftlichen Entwicklung deutlich zugenommen, stellt ein weltweites Problem dar und eine zunehmende gesundheitliche Bedrohung. Rückstände gefährlicher Chemikalien lassen sich mittlerweile in den Geweben fast aller Organismen nachweisen [Axelrod *et al.*, 2001]. Es können Beziehungen hergestellt werden zwischen der zunehmenden Umweltbelastung mit Chemikalien und verschiedenen Krebsarten, Erkrankungen vielfältiger Art [Longnecker *et al.*, 2001], Fortpflanzungsstörungen, Geburtsfehlern und Entwicklungsverzögerungen von Kindern mit Defiziten ihrer geistigen Fähigkeiten [Sharpe, 2003].

Die weltweite Produktion von Chemikalien war im Jahr 2000 auf 400 Millionen Tonnen angestiegen, und allein in der EU waren mehr als 100.000 Chemikalien registriert [BUND, 2006]. Viele dieser Substanzen wurden kaum auf ihre Gefahren für Umwelt und Organismen untersucht, obwohl sie sich auch in Produkten des täglichen Bedarfs befinden [BMU, 2004]. Das derzeit geltende Chemikalienrecht unterscheidet nicht anhand von Risiken für Gesundheit und Umwelt, sondern differenziert lediglich zwischen „Altstoffen“ (Markteinführung vor 1981, etwa 100.000 Chemikalien; ungeprüfte Verwendung) und „neuen Stoffen“ (Markteinführung nach 1981, 3.000 Chemikalien) [Holz, 2003]. Mit REACH (registration, evaluation and authorisation of chemicals) wurde ein EU-weites Regulierungssystem zur Gefährlichkeit aller auf dem Markt befindlichen Chemikalien verabschiedet [BMU, 2006].

Nach Greenpeace-Dokumentationen stieg sowohl die Anzahl als auch die Menge an Chemikalienrückständen in Lebensmitteln in den letzten Jahren kontinuierlich an. So wurden z. B. in bestimmten Tafeltrauben konventionellen Anbaus 14 verschiedene Pestizidwirkstoffe nachgewiesen, z. T. in Konzentrationen über der zulässigen Höchstmenge [Greenpeace, 2005]. Nach der neuen EU-Ergänzungsrichtlinie 396/2005, die am 05.04.2005 in Kraft getreten ist, sollen bei der Höchstmengenfestlegung von Pestiziden laut Artikel 14 auch Mehrfachbelastungen berücksichtigt werden: „The possible presence of pesticide residues arising from sources other than current plant protection uses of active substances, and their known cumulative and synergistic effects, when the methods of assess such effects are available“ [EU Regu-

lation No. 396/2005]. Greenpeace (2005) fordert, dass die Entwicklung entsprechender Methoden nunmehr höchste Priorität haben muss, damit sie zügig in der Rechtspraxis angewandt werden kann.

Die reale aktuelle Belastungssituation von Umwelt und Organismen ist durch eine Vielzahl von Substanzen unterschiedlicher Strukturen und Wirkungseigenschaften [Grimme *et al.*, 1996; Carpy *et al.*, 2000; Altenburger *et al.*, 2003] gekennzeichnet. Das Auftreten einer Substanzvielfalt in der Umwelt ist nicht ausschließlich die Folge ungewollten Zusammentreffens, sondern auch Konsequenz eines gezielten Einsatzes von Stoffgemischen. Es werden z. B. in der landwirtschaftlichen Produktion Pestizide mit mehreren, biologisch hoch potenten Wirkstoffen durch ihre bestimmungsgemäße Anwendung auf Agrarflächen direkt in die Umwelt eingebracht [Altenburger, 2005]. Die toxische Bewertung von Chemikalien erfolgte bislang jedoch zumeist auf der Basis von Einzelwirkungen. In zunehmendem Maße wird erkannt, dass Kombinationswirkungen chemischer Substanzen in eine Risikobewertung mit einbezogen werden müssen [z.B. Witte *et al.*, 2000; Heger *et al.*, 2002; Altenburger *et al.*, 2005].

Die grundsätzliche Unschädlichkeit einer Substanz oder eines Substanzgemisches kann kaum nachgewiesen werden und ist prinzipiell eine Frage seiner Konzentration bzw. Dosis [Cairns, 1992]. Das Gefährdungspotenzial von Chemikaliengemischen, insbesondere in niedrigen Konzentrationsbereichen, kann bis heute nicht eingeschätzt werden [Groten, 2000; Borgert *et al.*, 2004]. Dies ist u. a. deshalb so schwierig, weil Gemische häufig hoch komplex sind (mehr als 10 Komponenten) und aus heterogenen, unterschiedlich wirksamen Chemikalien bestehen können. Borgert *et al.* (2004) weisen darauf hin, dass zunächst die Metabolismen der Entgiftung geklärt und verstanden werden müssen, um die Toxizität und Wirkung von Substanzgemischen in subtoxischen Konzentrationen extrapolieren zu können. Aufgrund der enormen Mannigfaltigkeit von Chemikalien und entsprechend der Möglichkeiten von Kombinationen ist es weder möglich noch sinnvoll, die Kombinationsmöglichkeiten aller Substanzgemische hinsichtlich ihrer toxischen Wirkungen zu überprüfen. Dies ist nur bei solchen Kombinationen angebracht, die häufig anzutreffen sind, z. B. bei Pestiziden in Obst und Gemüse. Sinnvoll ist hingegen, prinzipielle Wirkmechanismen von Kombinationseffekten aufzuklären. Hierzu ist es erforderlich, Gemische aus ausge-

wählten Substanzen zu erstellen, die geeignet sind, die aufgestellten Hypothesen zu überprüfen. Falls zumindest in Teilbereichen allgemeingültige Schädigungsmechanismen erarbeitet werden könnten, stellt die gezielte Untersuchung toxikologischer Wirkungsmechanismen [Cassee *et al.*, 1998; Borgert *et al.*, 2004] von exemplarischen Substanzkombinationen einen wichtigen Bestandteil der toxikologischen Bewertung dar.

Um Wirkmechanismen aufzuklären ist es wichtig, möglichst einfache Testsysteme auszuwählen, bei denen die gegebene Fragestellung eindeutig beantwortet werden kann. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob es überhaupt möglich ist, Wirkmechanismen experimentell in *in vivo* Versuchen aufzuklären. In komplexen Systemen kann gerade bei Substanzkombinationen eine Vielzahl von Wechselwirkungen auftreten, die unmöglich alle berücksichtigt werden können. Hinzu kommt, dass eine suggerierte direkte Übertragbarkeit von *in vivo* erzielten Ergebnissen, z. B. an Ratten oder Hunden, aufgrund des im Vergleich zum Menschen z. T. erheblich unterschiedlichen Metabolismus nicht gewährleistet ist [Timchalk, 2004]. Vor mehr als zwanzig Jahren wurde damit begonnen, die moralisch und ethisch bedenklichen und aus tierschützerischer Sicht völlig unnötigen *in vivo* Versuche an „Versuchstieren“ durch preisgünstige, gut und schnell reproduzierbare und ökonomisch günstige *in vitro* Experimente anhand von Zellkulturen zu entwickeln [Shrivastava, 1991; Ekwall *et al.*, 1999]. Das „OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ fordert *in vitro*-Methoden, die in Stufe 1 „Sorting and prioritization“ und in Stufe 2 „*In vitro* assays providing mechanistic data“ angewendet werden können [Seibert, 2005]. Die in der „Validation Management Group on non-animal tests“ (VMG-NA) diskutierten und initiierten tierversuchsfreien Testmethoden lassen sich unterschiedlichen Gruppen (z. B. Zell- bzw. Gewebe-assays, Rezeptor-assays) zuordnen. Insbesondere für Kombinationswirkungen, die einen großen Datensatz und somit hohe Versuchstierzahlen erfordern, sind *in vivo* Untersuchungen zu Wirkmechanismen weder effektiv noch ethisch zu vertreten. Viele *in vitro* Testmethoden sind längst in der Forschung etabliert, so wie die in diesem Forschungsvorhaben an menschlichen Fibroblasten durchgeführten Experimente zur Zyto- und Gentoxizität verschiedener Chemikalien und Substanzgemische.

Durch die vermehrte Etablierung von *in vitro* Testmethoden können Ressourcen, einschließlich Tieren, geschont werden und nur so wertvolle Beiträge z. B. zur Aufklärung von Wirkmechanismen und zur Risikoabschätzung geleistet werden.

Durch die Kombination von Substanzgemischen kann es zu additiven, synergistischen oder weniger als additiven (antagonistischen) Effekten kommen. Diese Begriffe stehen für Kombinationswirkungen, die gleich, größer oder kleiner sind als die Effekte, die aufgrund der Dosis-Effekt-Wirkungen der Einzelsubstanzen erwartet werden [Berenbaum, 1985]. Der vielfach angewendete Begriff „antagonistisch“ für eine weniger als additive Wirkung von Chemikaliengemischen täuscht häufig eine Verharmlosung der Toxizitätsbewertung von Substanzgemischen vor. Insbesondere in subtoxischen Bereichen der Einzelsubstanzen können auch bei weniger als additiven Wirkungen toxische Gesamtwirkungen auftreten. Hertzberg und MacDonell (2002) bemängeln die Begriffe „additiv, synergistisch und antagonistisch“ als lediglich plakativ vereinfachend, ohne dass die eigentliche Gefährlichkeit von Chemikalienwirkungen deutlich wird.

Additive Kombinationswirkungen von Substanzgemischen werden in Gemischen aus „gleich oder ähnlich wirkenden“ Noxen erwartet, wobei der Begriff „gleich oder ähnlich wirkend“ nicht näher präzisiert ist [Hermens *et al.*, 1984; Kühn-Birett, 1989; van Leeuwen, 1991]. Synergistische und weniger als additive Wirkungen können durch verschiedene interaktive Mechanismen verursacht werden [Berenbaum, 1985]. Toxische Kombinationswirkungen von Chemikalien sind auf unterschiedlichen Ebenen möglich:

- Molekülebene: z. B. interaktive Wirkungen von Mutagenen an der DNA (z. B. Substanz A ruft eine DNA-Schädigung hervor, Substanz B hemmt die Reparatur dieses DNA-Schadens)
- Zellebene: z. B. die Aufnahme einer schwer membrangängigen, hydrophilen Substanz nach Membranschädigung durch eine lipophile Chemikalie
- Organebene: z.B. Beeinflussung organspezifischer Metabolisierungssysteme
- Organismenebene: z.B. Beeinflussung von Aufnahme, Pharmakokinetik und Exkretion.

Allen aufgeführten synergistischen bzw. weniger als additiven Effekten liegen folgende Ursachen zugrunde [Berenbaum, 1985]:

- Substanz A verändert eine Zell- bzw. Organfunktion derart, dass das toxische Potential von Substanz B verstärkt oder vermindert zum Tragen kommt.
- Substanz A reagiert mit Substanz B. Die daraus resultierende Substanz C wirkt toxischer oder untoxischer als A und B gemeinsam.

Verstärkungseffekte durch unspezifisch wirksame Chemikalien auf die spezifische Wirkung z. B. von Kanzerogenen (DNA-Schädigung, DNA-Reparatur) können *per se* als synergistisch bezeichnet werden, weil die unspezifisch wirksamen Chemikalien diese spezifischen Eigenschaften nicht besitzen und somit ausschließlich „interaktive Kombinationswirkungen“ in Frage kommen [Berenbaum, 1985].

Zu akut toxischen Kombinationswirkungen wurden in den letzten Jahren zum Teil uneinheitliche Ergebnisse vorgelegt [z.B. Carpy *et al.*, 2000; Witte *et al.*, 2000; Carpenter *et al.*, 2002; Tichý *et al.*, 2002; Zeliger, 2003]. Dies erscheint auch logisch zu sein, denn je nach Zusammensetzung der Chemikaliengemische aus verschiedenen Substanzklassen werden unterschiedliche Kombinationseffekte erwartet. Dennoch stimmten die meisten Befunde darin überein, dass gerade im subtoxischen Konzentrationsbereich der Einzelkomponenten eine bestimmbare Gesamttoxizität des entsprechenden Gemischs zu ermitteln war.

In dieser Arbeit wurden unspezifisch wirksame Chemikalien hinsichtlich ihrer zytotoxischen Kombinationswirkungen untereinander und in Kombination mit der kanzerogenen Substanz MMS in *in vitro* Testsystemen untersucht.

Die Toxizität unspezifisch wirksamer Chemikalien wird definitionsgemäß allein durch ihre physiko-chemische Eigenschaft der Lipophilität bestimmt, wobei die Lipophilität mit der Toxizität korreliert werden kann [Halle, 1991; Saito *et al.*, 1993; Witte *et al.*, 2000]. Ursache für die Toxizität stellen Membranveränderungen dar, die aufgrund von Wechselwirkungen zwischen unspezifisch wirksamen Chemikalien und den Lipiden der bilayer-Membranen zu Desorientierungen und bei höheren Konzentrationen zu Funktionsverlusten in den Membranen führen [Cascorbi und Forêt, 1991; van Wezel und Opperhuizen, 1995; Chaisuksant *et al.*, 1999]. Während spezifisch wirkende Xenobiotika aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften mit speziellen

Biomolekülen der Zelle in Wechselwirkung treten und so über spezifische Schädigungen (z. B. Bindung an die DNA oder Rezeptoren) zu zum Teil stark toxischen Wirkungen führen, sind unspezifisch wirksame Chemikalien dazu nicht in der Lage. Ihre Toxizität ist vergleichsweise gering und stellt eine Basistoxizität aller Chemikalien dar, auf die bei spezifisch wirkenden Substanzen die spezifisch toxische Wirkung aufgesetzt wird.

Als unspezifisch wirksame Chemikalien wurden in dieser Arbeit toxikologisch relevante Substanzen unterschiedlicher Struktur und Lipophilität ausgewählt und zwar: Pentachlorphenol (PCP), 2,4,6 Trichlorphenol (TCP), m-Xylol, 4-Chloranilin, 1-Hexanol, 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D), Glyphosat und Methanol. In früheren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass die Lipophilität dieser Substanzen mit ihrer Zytotoxizität korreliert. Die Untersuchungen hier wurden an menschlichen Fibroblasten durchgeführt, die kein Cytochrom-P450-System besitzen und folglich kein metabolisch kompetentes Testsystem darstellen. Somit war es möglich, eine aromatische Substanz als unspezifisch wirksame Chemikalie einzustufen, deren gentoxische und mutagene Wirkung [Naito *et al.*, 1994] auf ihrer Metabolisierung unter Bildung reaktiver Zwischenprodukte beruht. Eine spezifisch toxische Eigenschaft von PCP stellt seine Entkopplerwirkung dar. Dies wies Weinbach (1954) an isolierten Mitochondrien nach. Es wurde untersucht, ob die Entkopplerwirkung an mitochondrienarmen Fibroblasten eine Rolle spielt. Dieser Nachweis erfolgte durch zwei parallele Testsysteme mit unterschiedlichen targets, dem MTT-assay zur Bestimmung der Succinatdehydrogenase-Aktivität und dem FDA-assay, mit dem die cytosolische Esterase-Aktivität detektiert wird. Bei einer Entkopplung der Atmungskette durch PCP in menschlichen Fibroblasten wurde erwartet, dass die Zellen im MTT-assay sensitiver reagieren als im FDA-assay. Ein Unterschied in den Ergebnissen war nicht nachweisbar [Witte, unveröffentlicht].

Als zytotoxischer Endpunkt wurde in dieser Arbeit der sensitive Parameter der Wachstumshemmung festgelegt, durchgeführt im FDA-assay. Die unspezifische Wirksamkeit der eingesetzten Chemikalien wurde anhand der Dosis-Effekt-Kurven der Einzelsubstanzen und der daraus resultierenden Korrelation Toxizität/Lipophilität überprüft. Es wurden Kombinationen vom binären bis zum Gemisch aus 8 Kompo-

nenten zusammengestellt. Dabei wurde untersucht, ob die Chemikalien konzentrationsadditiv, synergistisch oder weniger als additiv zur Gesamtwirkung beitragen.

Witte *et al.* (2000) beschrieben interaktive Kombinationswirkungen für Substanzgemische bei unterschiedlicher Lipophilität der Komponenten. Lipophile Moleküle könnten demnach über eine Membranschädigung als „Türöffner“ für hydrophile Substanzen in Kombinationen fungieren. Wenn die Türöffner-Hypothese für hydrophile/lipophile unspezifisch wirksame Chemikalien gilt, dann wird sie auch Gültigkeit haben für Gemische aus unspezifisch und spezifisch wirksamen Chemikalien. Dies bedeutet, dass eine lipophile unspezifisch wirksame Chemikalie die DNA-schädigende Wirkung eines Kanzerogens erhöhen müsste. Witte *et al.* (2000) zeigten, dass Kanzerogene im Gemisch interaktiv reagieren können. Additive Effekte zwischen Kanzerogenen werden erwartet, wenn an demselben Zielmolekül die gleichen Reaktionen mit den gleichen Folgen auftreten [EPA, 1986]. Hömme *et al.* (2000) konnten für ein Gemisch aus den gentoxischen Substanzen Methansulfonsäuremethylester (MMS) und 4-Nitrochinolin-1-oxid (4-NQO) synergistische Effekte nachweisen. Diese treten dann auf, wenn die beiden Komponenten im Gemisch ein unterschiedliches target besitzen [EPA, 1986].

Deshalb wurde neben der zytotoxischen Kombinationswirkung von unspezifisch wirksamen Chemikalien auch die Kombinationswirkung dieser Chemikalien mit einer spezifisch gentoxisch wirkenden Substanz getestet. Der gentoxische Endpunkt war die DNA-Schädigung, die im comet-assay erfasst wurde.

Als kanzerogenes Agens wurde die hydrophile Verbindung Methansulfonsäuremethylester (MMS) mit einem $\log P_{OW}$ von - 0,66 ausgewählt. MMS ist eine alkylierende Substanz und ohne metabolische Aktivierung direkt gentoxisch wirksam. Alkylantien methylieren wegen ihrer elektrophilen Eigenschaften hauptsächlich nukleophile Gruppen der Biomoleküle. In der DNA sind dies die Stickstoff- und Sauerstoffatome der Basen. Nach dem nukleophilen Angriff von MMS ändert sich die Elektronenverteilung der Nukleinsäurebasen. In dessen Folge bricht die N-glykosidische Bindung auf, und es entsteht eine AP-Stelle (apurinisch oder apyrimidinisch). Als Folge der Alkylierungen durch MMS können Mutationen entstehen. Diese basieren entweder auf einer fehlerhaften Exzisionsreparatur oder dem Einbau einer falschen

Base aufgrund des fehlenden templates während der Replikation. Das monofunktionale methylierende Agens MMS produziert N-Methylierungen wie 7-Methylguanin als Addukt [Boerrigter *et al.*, 1991]. Ein weiteres MMS-Addukt kann u. a. 3-Methyladenin sein. Während beide genannten N-Methylierungen (7-Methylguanin und 3-Methyladenin) als indirekte Mutagene lediglich ein geringes mutagenes Potenzial haben, können zwei hochmutagene Produkte direkte Mutationen auslösen: O⁶-Methylguanin und O⁴-Methylthymin [Altshuler *et al.*, 1996]. Diese modifizierten Basen haben aufgrund der Methylierung andere Paarungseigenschaften: O⁶-Methylguanin kann mit Thymin anstatt mit Cytosin paaren, und O⁴-Methylthymin kann mit Guanin paaren an Stelle von Adenin. Der größte Anteil der durch MMS gebildeten Addukte (7-Methylguanin und 3-Methyladenin) wird durch die Basenexzisionsreparatur repariert und kommt somit nicht zum Tragen.

Alkylierende Substanzen wie MMS sind häufig anthropogenen Ursprungs, und finden Verwendung in der chemischen Industrie, als Desinfektionsmittel, Insektizide und als Chemotherapeutika. Diese Substanzen sind chemisch reaktiv, interagieren spontan mit zellulären Makromolekülen (besonders mit der DNA), und sie sind häufig besonders potente Kanzerogene mit transplazentärer Wirkung [Barrett, 1993; Rosenkranz, 1993]. Das mutagene Potenzial von MMS wird durch unspezifisch wirksame Chemikalien erhöht, insbesondere durch lipophile Substanzen [Witte *et al.*, 2000], was darauf hinweist, dass die Türöffner-Hypothese richtig ist. Eine erhöhte DNA-Schädigung führt nicht unbedingt zu einer erhöhten Mutagenität. Wenn aber unspezifisch wirksame Chemikalien die kanzerogene bzw. mutagene Wirkung von MMS erhöhen würden, wäre dies von entscheidender Bedeutung, einerseits für die weitere Bewertung des mutagenen Potenzials von Kanzerogenen, das durch unspezifisch wirksame Chemikalien beachtlich erhöht werden kann. Andererseits wäre die unspezifische Wirkung von Chemikalien per gültiger Definition nicht mehr gesichert, weil sie eine spezifische Wirkung auf Kanzerogene ausüben können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

- Analyse Waage: Sartorius, Typ 1002 MP 9, Göttingen
- Auswerteeinheit für den comet-assay:
 - Lucia Comet Assay: System for Image Processing and Analysis
 - Microscope Eclipse E 600 W, Nikon, Tokio, Japan
 - Mercury Lamp – C – SHG 1, Nikon, Tokio, Japan
 - Mercury Short Arc Photo Optic Lamp HBO 103 W/2, Osram
- Auswertungssoftware: Lucia Comet Assay Single Stain
 - SigmaStat® Version 3
- Brutschrank: Heraeus BBD 6220, Hanau
- Cleanbench: Heraeus Lamin Air HLBC 2472 GS, Hanau
- Elektrophoresekammer: BIO-RAD DNA Sub Cell™
- Eppendorf Tischzentrifuge 5414, Hamburg
- Feinwaage: Kern & Sohn, Albstadt
- Gewebekulturflaschen: 250 ml, 75 cm², Falcon®, Becton Dickinson, Heidelberg
- Heizplatte: IKAMAG REO, IKA® Werk, Staufen
- Kamera: COHU High Performance CCD Camera, Nikon, Tokio, Japan
- Kolonienzählgerät BZG 28, Wiss.-Techn. Werkstätten (WTW), Weilheim
- Microplate Reader: BMG, FLUOstar optima, Offenbach
 - BIO RAD, Modell 450
- Netzgerät: CONSORT E 835, Fröbel Labortechnik, Kempten
- Petrischalen: 94/16, Greiner bio-one, Frickenhausen
- pH-Meter, inoLab, WTW, Weilheim
- Reaktionsgefäße: PS-Röhrchen, TC, 14 ml, steril, Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen
- Schüttler: VKS 75, Edmund Bühler Laborgerätebau, Tübingen
- Statistikprogramm Systat 10.0
- Transilluminator, Biometra TFL-20M, 312 nm, Göttingen
- Umkehrmikroskop: Olympus CK2, Hamburg
- Zählkammer: Bürker-Türk, Jürgens, Bremen

- Zellkulturplatten:
 - 96er well, schwarz, μ -clear, Greiner bio-one, Frickenhausen
 - 96er well, weiß, μ -clear, Greiner bio-one, Frickenhausen
 - 96er well, transparent, Falcon[®], Becton & Dickinson, Heidelberg
- Zellkultur-Petrischalen: \varnothing 5 cm, Nunclon[™] Surface, Nunc Brand products, Wiesbaden

2.1.2. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in höchst möglichem Reinheitsgrad (p. a.) verwendet, wenn nicht anders vermerkt.

- Agarose, SeaKem[®] LE Agarose, FMC Bio Products, Rockland, Maine USA
- Aminosäuren, Seromed[®], Biochrom
- Ampuwa Wasser, Fresenius, Bad Homburg
- Borsäure, Fluka, Buchs, Schweiz
- Bromphenolblau, Janssen Chimica, Kortrijk, Belgien
- Calciumchlorid, Merck, Darmstadt
- 4-Chloranilin, 99,2 %, Riedel-de Haën AG, Seelze Hannover
- Cremophor EL, Sigma, Deisenhofen
- 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D), U 46[®] D-Fluid (500 g/l), vorliegend als Dimethylammoniumsalz, BASF AG, Ludwigshafen
- Dimethylsulfoxid (DMSO), F.E.R.O.S.A., Barcelona, Spanien
- 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA
- Dinatriumhydrogenphosphat \times 2 H₂O, Merck, Darmstadt
- Essigsäure, 80 %, Scharlau, Barcelona, Spanien
- Ethanol, Riedel-de Haën AG, Seelze Hannover
- Ethidiumbromid, Sigma, Deisenhofen
- Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz (EDTA), Serva, Heidelberg
- Ethylmethansulfonat (EMS), > 98 %, Sigma, Deisenhofen
- Ficoll, Serva, Heidelberg
- fötales Kälberserum (FCS), PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
- Formaldehyd, J T Baker, Deventer, Niederlande

- Glukose-1-hydrat, Merck, Darmstadt
- Glyphosat (N-(Phosphonomethyl)-glycin), 99,2 %, Riedel-de Haën AG, Seelze Hannover
- 1-Hexanol, 99,5 %, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Kaliumchlorid, Scharlau, Barcelona, Spanien
- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
- Kristallviolett, Merck, Darmstadt
- low melting point (LMP)-Agarose, Sea Plaque® GTG Agarose, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
- Magnesiumchlorid, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- Methanol, $\geq 99,6$ %, Scharlau, Barcelona, Spanien
- Methansulfonsäuremethylester (MMS), $> 98,0$ %, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Minimum Essential Medium (MEM) nach Earle, Seromed®, Biochrom, Berlin
- N,N-Dimethylformamid (DMF), Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Natriumchlorid, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Natriumdodecylsulfat (SDS), SERVA, Heidelberg
- Natriumhydrogencarbonat, Riedel-de Haën AG, Seelze Hannover
- Natriumhydroxid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Natriumlaurylsarkosinat, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
- Pentachlorphenol (PCP), Natriumsalz, umkristallisiert aus Witophen N (mit Eto-Ac, iso-Prop.), Geschenk von Prof. Dr. Butte, Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg
- Penicillin/Streptomycin, Seromed®, Biochrom, Berlin
- Quantum 333 Complete Medium for Fibroblasts, PAA Laboratories GmbH, Cölbe
- Salzsäure, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Serumfreies Medium (SFM), Minimum Essential Medium nach Earle; (Seromed, Biochrom, Berlin), ohne fötales Kälberserum und Antibiotika angesetzt
- 2,4,6-Trichlorphenol (TCP), 99,2 %, Riedel-de Haën AG, Seelze Hannover
- 6-Thioguanin (TG), > 98 %, Sigma, Deisenhofen
- Titriplex III (EDTA), Merck, Darmstadt
- Tris, Appli Chem, Darmstadt
- Triton X-100, Serva, Heidelberg

- Trypsin/EDTA-Lösung (10 ×), Biochrom, Berlin
- Vitamine für MEM, Seromed[®], Biochrom, Berlin
- m-Xylol, ≥ 99,0 %, Riedel-de Haën AG, Seelze Hannover

2.1.3. Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Puffer und Lösungen mit Millipore[®]-Wasser hergestellt.

Zellkulturmedien

- Einfriermedium
Serumhaltiges Medium mit 10 % (v/v) DMSO versetzt
- Serumfreies Medium (SFM), steril filtriert
1 Packung Minimum Essential Medium (MEM) nach Earle,
in 9220 ml Ampuwa gelöst
300 ml 7,5 %ige NaHCO₃-Lösung
120 ml nicht essentielle Aminosäuren (100 ×)
240 ml essentielle Aminosäuren (50 ×)
120 ml Vitamine
- MEM-Medium (12 % FCS) für NHDF-Zellkulturen, steril filtriert
440 ml SFM
60 ml fötales Kälberserum
5 ml Penicillin/Streptomycin
- MEM-Medium (5 % FCS) für V79-Zellkulturen, steril filtriert
475 ml SFM
25 ml fötales Kälberserum
5 ml Penicillin/Streptomycin
- Trypsinlösung
Trypsin 1 : 10 mit sterilem Ampuwa verdünnt

FDA-assay

- D-PBS (phosphate buffered saline nach Dulbecco) pH 7,5
 - 8 g/l NaCl
 - 0,2 g/l KCl
 - 1,15 g/l Na₂HPO₄ × 2 H₂O
 - 0,2 g/l KH₂PO₄
- FDA-Stammlösung (bei Raumtemperatur (RT) dunkel lagern, 4 Wochen haltbar)
 - 50 mg FDA
 - 10 ml Aceton
- FDA-Gebrauchslösung (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)
 - 60 µl FDA Stammlösung
 - 9,940 ml D-PBS

MTT-assay

- PBS (phosphate buffered saline) pH 7,5
 - 8 g/l NaCl
 - 0,2 g/l KCl
 - 1,15 g/l Na₂HPO₄ × 2 H₂O
 - 0,2 g/l MgCl₂ × 6 H₂O
 - 0,125 g/l CaCl₂ × 6 H₂O
- MTT-Stammlösung (Aufbewahrung im Dunkeln bei 4 °C, ca. 4 Wochen haltbar)
 - 50 mg MTT in 10 ml PBS-Puffer
- MTT-Gebrauchslösung (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)
 - 2,5 ml Stammlösung
 - 10 ml Medium
- SDS-Lysepuffer pH 4,2
 - 20 g SDS, gelöst in
 - 500 ml DMF und
 - 400 ml Ampuwa, Zugabe von
 - 25 ml Essigsäure (80 %) und
 - 25 ml HCl (1 N),
 - den pH-Wert einstellen und danach mit Ampuwa auf 1 l auffüllen.

Comet-assay

- PBS-Puffer (phosphate buffered saline), Ca^{2+} - und Mg^{2+} -frei pH 7,4 (Lagerung bei 4 °C)
 - 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 KH_2PO_4
- Lyse-Stammlösung pH 10 (Lagerung bei RT)
 - 146,1 g NaCl
 - 37,2 g EDTA (Titriplex III)
 - 1,2 g Tris
 - in dieser Reihenfolge zu 800 ml aqua bidest. geben, nach Zugabe von 8 g NaOH gehen die Salze in Lösung, pH-Wert mit NaOH auf 10 einstellen, 10 g Natriumlaurylsarkosinat zugeben (löst sich nach ca. einer Stunde (h)), mit aqua bidest. auf 890 ml auffüllen.
- Lyse-Gebrauchslösung (1 h vor Gebrauch in den Kühlschrank stellen)
 - 1 ml Triton X-100
 - 10 ml DMSO
 - 89 ml Lyse-Stammlösung
- Elektrophorese-Stammlösungen
 - 1) 200 g NaOH in 500 ml aqua bidest.
 - 2) 14,89 g EDTA (Titriplex III) in 200 ml aqua bidest.
- Elektrophorese-Gebrauchslösung pH > 13 (1 h vor Gebrauch in den Kühlschrank stellen)
 - 90 ml von Stammlösung 1)
 - 15 ml von Stammlösung 2)
 - mit aqua bidest. auf 3 l auffüllen
- Neutralisationspuffer pH 7,5
 - 48,5 g/l Tris
 - pH-Wert-Einstellung mit konzentrierter HCl
- Ethidiumbromid-Lösung
 - Stammlösung: 2 mg/ml in aqua bidest. (bei 4 °C im Dunkeln aufbewahren)

Gebrauchslösung: 250 µl der Stammlösung in 4,75 ml aqua bidest.

- LMP-Agarose

0,125 g LMP-Agarose (Sea Plaque GTG Agarose)

25 ml PBS-Puffer

in der Mikrowelle aufkochen, in 5 Portionen teilen und einfrieren,
vor Gebrauch noch einmal kurz aufkochen.

- Beschichtung der Objektträger

3 g Agarose

200 ml PBS-Puffer

dreimal aufkochen, danach jeweils auf 60 °C abkühlen lassen, in 60 °C
warmes Wasserbad stellen, Objektträger eintauchen und auf einer Seite
trocken wischen, Beschichtung horizontal über Nacht trocknen lassen.

Koloniebildungsfähigkeit

- Saline A pH 7,2

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCL

1 g/l Glukose-1-hydrat

0,35 g/l NaHCO₃

Lösung steril filtrieren (Lagerung bei 4 °C)

- Fixierlösung

4 %ige Formaldehydlösung

- Färbelösung

5 g/l Kristallviolett

HPRT Mutagenitäts-Test

- Selektionsmedium

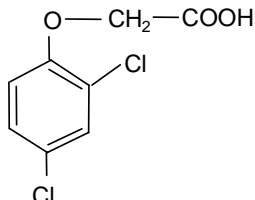
10 µg/ml 6-Thioguanin in Medium (mit 5 % fötalem Serum)

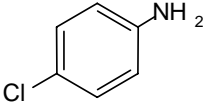
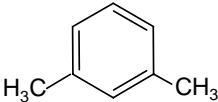
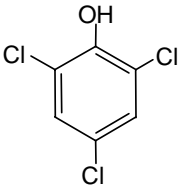
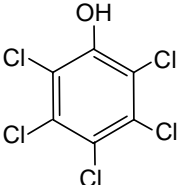
Saline A, Fixier- und Färbelösung wie bei der Koloniebildungsfähigkeit

Liste der unspezifisch wirksamen Chemikalien

Als unspezifisch wirksame Chemikalien wurden Substanzen unterschiedlicher chemischer Struktur und verschiedener Lipophilität ausgewählt. Schon bei der Auswahl der Substanzen musste sichergestellt werden, dass alle Chemikalien ausreichend wasserlöslich sind bzw. die Konzentration der Lösungsvermittler so gering ist, dass diese selbst keinen zytotoxischen Effekt bei den Einzel- und Kombinationswirkungen haben. Die unspezifisch wirksamen Chemikalien sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1 Die unspezifisch wirkenden Chemikalien mit ihren log P_{OW} -Werten, Strukturformeln und CAS-Nummern.

Substanz (CAS-Nr.)	Strukturformel	log P_{OW}
Methanol (67-56-1)	H_3C-OH	- 0,77 (Hansch <i>et al.</i> , 1995)
Glyphosat (1071-83-6)	$HOOC-CH_2-NH-CH_2-P(=O)(OH)_2$	0,0
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D) (94-75-7)		1,57 (Geyer <i>et al.</i> , 1984)

Substanz (CAS-Nr.)	Strukturformel	log P_{OW}
1-Hexanol (111-27-3)	$H_3C-(CH_2)_4-CH_2OH$	1,83 (Hansch <i>et al.</i> , 1995)
4-Chloranilin (106-47-8)		2,02 (Kishida and Otori, 1980)
m-Xylol (108-38-3)		3,3 (Rippen, 2000)
2,4,6-Trichlorphenol (88-06-2)		3,7 (Rippen, 2000)
Pentachlorphenol (87-86-5)		5,16 (Otte <i>et al.</i> , 2001)

Schadstofflösungen

Alle verwendeten Schadstoffe wurden entsprechend ihrer Löslichkeit in SFM, Ethanol oder DMSO/Cremophor als Lösungsvermittler zunächst als Stammlösungen angesetzt. Die Verdünnungen erfolgten in SFM. Alle Stamm- und Gebrauchslösungen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch hergestellt. Der pH-Wert der Arbeitslösungen wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit NaOH (1 N) auf pH 7,25 eingestellt.

- 4-Chloranilin Stammlösung (12,5 mM): 0,0638 g/40 ml SFM
- 2,4 D Stammlösung (500 mM): 1,33 ml Fluid/3,67 ml SFM
- Glyphosat Stammlösung (80 mM): 0,1353 g/10 ml SFM

- 1-Hexanol Stammlösung (500 mM): 312 µl in 2,344 ml DMSO lösen, danach 2,344 ml Cremophor dazu geben
- Methanol Stammlösung (1 M): 2,0245 ml/50 ml SFM
- MMS Stammlösung (100 mM): 0,0847 ml/9,9153 ml SFM
- PCP Stammlösung (1 mM): 7,2 mg/25 ml SFM
- TCP Stammlösung (5 mM): 0,09873 g/5 ml Ethanol
- m-Xylol Stammlösung (500 mM): 309 µl in 2,346 ml DMSO lösen, danach 2,346 ml Cremophor dazu geben

2.2. Methoden

2.2.1. Zelllinien

C-12350 Normale Humane Dermale Fibroblasten (NHDF) PromoCell[®] GmbH, Heidelberg, Deutschland, Lot-No. 1101102.2

V 79 Permanente Hamsterlungenzellen, freundlich überlassen durch Prof. Dr. Speit, Ulm

2.2.2. Zellkulturen

Die Kultivierung der Zellen im Brutschrank erfolgte in 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 37 °C in gebrauchsfertigem Kulturmedium Quantum (PAA). Quantum enthält 12 % fötales Kälberserum und ist zusätzlich mit Insulin und einem effizienten Eisen-bindenden Molekül versetzt.

Vorversuche hatten ergeben, dass die Fibroblasten in Quantum deutlich gleichmäßiger und schneller wuchsen als in MEM (minimum essential medium, Seromed[®]) - Medium. Deshalb wurde für die Kultivierung der Zellen Quantum verwendet.

In toxikologischen Untersuchungen sind die unterschiedlichen Stadien einer Wachstumsphase [Goldenberg *et al.*, 1971], die Teilungsrate [Aujard und Trincal, 1985], die Zelldichte [Eisele, 2002] und das Alter der Zellen [Bayreuther *et al.*, 1988] von entscheidender Bedeutung für die Sensitivität von Zellen gegenüber den verwendeten Testsubstanzen. Deshalb erfolgte die Kultivierung vor der Exposition wie folgt:

- Die Aussaat erfolgte aus innerhalb von 4 Tagen nach der letzten Passage konfluent gewachsenen Fibroblastenkulturen.
- Die primären Fibroblasten befanden sich in der 7. – 18. Passage.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden zweimal mit SFM gespült und dann für 10 Sekunden mit 0,125 %iger Trypsin-Lösung behandelt. Nach ca. 5 Minuten auf der Wärmebank lösten sich die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche ab und nahmen eine kugelige Gestalt an. Die Zellen wurden anschließend in Medium aufgenommen und mit Hilfe einer Glas-Pipette durch wiederholtes vorsichtiges Aufsaugen und Ablassen vereinzelt. Dann wurden die Zellen je nach Bedarf weiterkultiviert oder für die Versuche ausgesät.

2.2.3. Inkubation der Zellen mit den Schadstofflösungen

Die Endkonzentrationen der Schadstofflösungen wurden unmittelbar vor der Inkubation für die Versuche zur Konzentrationsabhängigkeit in 37 °C warmem SFM angesetzt. Bei Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit wurden die Testsubstanzen in temperiertem (37 °C) Medium gelöst. Vor der Schadstoffbehandlung wurden die Zellen zweimal mit temperiertem SFM gespült.

Bei allen Versuchsansätzen wurde als Kontrolle eine Probe mit SFM bzw. Medium inkubiert und bei Verwendung von Ethanol bzw. DMSO/Cremophor als Lösungsvermittler zusätzlich eine Probe mit der jeweils höchsten eingesetzten Konzentration des Lösungsmittels.

Die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen, sowie bei der Zeitabhängigkeit die Re-Inkubationszeit, erfolgte im Brutschrank in 5 %iger CO₂-Atmosphäre, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 37 °C.

Bei den Testmethoden zur Zytotoxizität wurden jeweils 200 µl der entsprechenden Schadstofflösung in die Wells der Multititerplatten pipettiert. Zur Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit wurden die Zellen für 1 Stunde mit den Testsubstanzen inkubiert. Anschließend folgte eine Wachstumsphase für 48 Stunden in frischem, schadstofffreiem Medium. Um Zellverluste zu vermeiden, wurden die Zellen nicht gewaschen. Für die Zeitabhängigkeit (FDA-assay) wurden die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum in den in Medium gelösten Testsubstanzen inkubiert.

Beim comet-assay wurden jeweils 3 ml der Schadstofflösungen (Gemische aus unspezifisch wirksamen Chemikalien und der kanzerogenen Substanz MMS) in die Petrischalen gegeben und für 1 Stunde inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Schadstofflösungen abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gespült.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Versuche im Rahmen der Datenvalidierung mindestens zweimal durchgeführt.

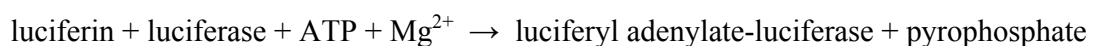
2.2.4. Zytotoxizitäts-Tests

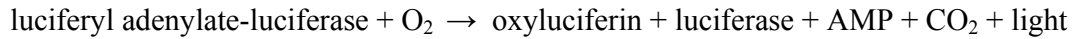
Jeweils 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden für die drei Nachweismethoden ATP-, FDA- und MTT-assay 2.500 Fibroblasten pro well einer konfluent gewachsenen Fibroblastenkultur in Multititerplatten ausgesät. Zur Gewährleistung vergleichbarer Versuchsbedingungen wurden die Platten hinsichtlich einheitlichen Zellwachstums geprüft. Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen zweimal mit SFM gewaschen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen in jeweils 8 Parallelproben pro Konzentration. Um Zellverluste zu vermeiden, wurden keine weiteren Spülschritte durchgeführt [Crouch *et al.*, 1993; Kurbacher *et al.*, 2003]. Die Kontrollen enthielten unbehandelte Zellen. Zur Ermittlung der Blindwerte wurden wells lediglich mit Medium ohne Zellen inkubiert und genauso behandelt wie die anderen wells.

2.2.4.1. Lumineszenz

ATP-assay

ATP ist ein Marker für die Vitalität von Zellen, weil es in allen metabolisch aktiven Zellen nachweisbar ist und die ATP-Konzentration schnell abnimmt, sobald Zellen ihre Vitalität verlieren und absterben. Der ATP-assay nach Kangas *et al.* (1984) wurde als Luminescence ATP Detection Assay System ATPlite (Perkin Elmer™) durchgeführt und basiert auf dem biochemisch gut untersuchten Enzym Luziferase von *Photinus pyralis* (McElroy, 1951). Dieses katalysiert die Oxidation von Luziferin mit Hilfe von ATP, Mg^{2+} und O_2 . McElroy (1951) beschreibt die Reaktion folgendermaßen:





Das Substrat Luziferin ((S)-4,5-Dihydro-2-(6-hydroxy-2-benzothiazolyl)thiazol-4-carbonsäure) wird durch die Luziferase unter ATP-Verbrauch zu Luziferyl-Adenylat umgesetzt. Dieses wird durch molekularen Sauerstoff oxidiert, wobei als Zwischenprodukt zyklisches Peroxid gebildet wird und weiter unter Abspaltung von AMP ein instabiles Dioxetanon. Das Dioxetanon wird durch intramolekulare Umstrukturierung decarboxyliert, wodurch eine Enol- oder eine Ketoform des Oxiluziferins in angeregtem Zustand entsteht. Der Übergang des Oxiluziferins in den energetischen Grundzustand ist mit Lichtemission der Wellenlänge λ 562 – 560 nm (grün-gelbes Licht) verbunden [Ditsch *et al.*, 2003].

Das emittierte Licht ist proportional der ATP-Konzentration und wurde anhand der Lumineszenz-Messung im Plattenreader quantifiziert.

Der ATP-assay wurde mit dem ATP-assay kit ATPlite[®] der Firma PerkinElmer[™] durchgeführt. Für den ATP-assay wurden weiße Multititerplatten (PerkinElmer[™]) mit klarem Boden verwendet, die eine Totalreflexion des emittierten Lichts gewährleisten. Nach einstündiger Schadstoff-Inkubation wurden die Testsubstanzen durch frisches Medium ersetzt und die Zellen im Brutschrank für 48 Stunden re-inkubiert. Für die Messung der Lumineszenz wurde das Medium abgenommen und die Zellen nach Zugabe von 50 μ l mammalian cell lysis solution pro well für 5 Minuten orbital geschüttelt. Es wurden 50 μ l substrate solution pro well hinzupipettiert und für weitere 5 Minuten geschüttelt. Nach Adaptation der Mikrotiterplatte im Dunkeln erfolgte die Messung der Lumineszenz im Plattenreader in entsprechendem Modus. Die Emission pro well wurde bei optimaler Temperatur (22 °C) und einem gain von 1.200 für jeweils 1 Sekunde gemessen. Der Blindwert beinhaltete beide Lösungen.

2.2.4.2. Fluoreszenz

FDA-assay

Atome eines Fluoreszenzfarbstoffes absorbieren Energiequanten einfallender Strahlung und emittieren diese durch Fluoreszenz spontan ohne Nachleuchten.

Der FDA-assay nach Rotman and Papermaster (1966) beruht darauf, dass vitale Zellen Membran-permeables, nicht fluoreszierendes Fluoreszeindiacetat (FDA) aufneh-

men. Die Acetatgruppen des Moleküls werden durch intrazelluläre Esterasen im Cytosol zu Acetat und dem lipophilen, grün fluoreszierenden Xanthin-Farbstoff Fluoreszein hydrolysiert. Fluoreszein akkumuliert in Zellen mit intakter Zellmembran, und das nunmehr geladene Molekül kann nur noch langsam aus der Zelle diffundieren.

Fluoreszein wird mit einer Excitationswellenlänge von λ 490 nm angeregt und emittiert bei einer Wellenlänge λ 520 nm. Da ausschließlich Zellen mit intakten Membranen Fluoreszein akkumulieren können, wird mit dem FDA-assay die metabolische Aktivität vitaler Zellen erfasst.

Die Versuchsdurchführung des FDA-assays erfolgte in Anlehnung an Larsson und Nygren (1989). Es wird die optimierte Methode beschrieben. Für den FDA-assay wurden die Zellen in schwarzen Platten mit klarem Boden (Greiner bio-one) ausgesät, die „cross talks“ zwischen den einzelnen wells und eine Anregung des Plattenmaterials weitgehend vermieden. Die Testsubstanzen wurden nach einstündiger Schadstoff-Inkubation durch frisches Medium ersetzt und die Zellen für 48 Stunden im Brutschrank re-inkubiert. Für die Messung der Fluoreszenz wurde das Medium abgenommen und die Zellen nach Zugabe von 100 μ l FDA-Gebrauchslösung pro well für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenzmessung (Excitation λ 485 nm, Emission λ 520 nm, 10 Lichtblitze/well, gain 1.200) im Fluorimeter erfolgte unmittelbar nach Abnahme der Färbelösung. Der Blindwert beinhaltete Medium, das durch die Färbelösung ersetzt wurde.

Im Folgenden wurde die optimierte Vorschrift zur Durchführung des FDA-assays zusammengestellt:

Vorbereitung der Zellen und Inkubation mit Testsubstanzen

- Aussaat von 2.500 Zellen/well (200 μ l) in schwarze Multititerplatten
- 24 h Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37 °C
- Mikroskopische Kontrolle des Zellwachstums und Dokumentation des Wachstums
- Abnehmen des Mediums aus den wells
- Begiftung der Zellen mit Testsubstanzen für 1 Stunde im Brutschrank bei 37 °C; die 0-Kontrolle wird für 1 h mit SFM inkubiert

- Abnehmen der Testsubstanzen
- 200 µl Medium in alle wells pipettieren (außer Blindwert)
- Re-Inkubation der Zellen für 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C

Vorbereitung und Durchführung des FDA-assays

- Herstellen der FDA-Stammlösung durch Lösen von 50 mg Fluoreszeindiacetat in 10 ml Aceton, abgedunkelt bei RT lagern (4 Wochen haltbar)
- Herstellen der FDA-Färbelösung aus 9.940 µl D-PBS-Puffer und 60 µl FDA-Stammlösung und abgedunkelt bereit stellen
- Mikroskopische Kontrolle des Zellwachstums mit Dokumentation
- Abnehmen des Mediums

die nachfolgenden Arbeiten werden in der dunklen Cleanbench zügig durchgeführt:

- 50 µl FDA-Färbelösung/well für 10 Minuten auf die Zellen geben
- Färbelösung abnehmen
- Fluoreszenzmessung im Fluorimeter (Excitation λ 485 nm, Emission λ 520 nm) als top-Messung

2.2.4.3. Fotometrie

MTT-assay

Der MTT-assay ist ein häufig angewandter Test zur Messung von Lebensfähigkeit und Wachstum, mit dem die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase lebender Zellen gemessen wird [Hansen *et al.*, 1989; Berg *et al.*, 1990]. Die Hemmung oder abnehmende Vitalität des Enzyms durch Schadstoffe gilt als direktes Maß für akut toxische Wirkungen [Bohrenfreund *et al.*, 1988; Husøy *et al.*, 1993] und wird als Vitalitätsverlust bezeichnet. Das gelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) dringt in die Zelle ein, sein Tetrazolium-Ring wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien (aber auch von Oxidoreduktasen in Peroxisomen und im Cytosol) aufgebrochen. Es werden wasserunlösliche dunkelblaue Formazankristalle gebildet, die nach Lyse der Zellen durch die Zugabe von SDS-Puffer freigesetzt, gelöst und photometrisch erfasst werden [Slater *et al.*, 1963].

Die Extinktionswerte sind proportional zu dem in den Zellen metabolisierten MTT und somit ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen nach der Schadstoffinkubation.

Für die Fotometrie wurden die Zellen in klaren Mikrotiterplatten (Falcon®) ausgesät. Im MTT-assay folgte nach der Begiftung der subkonfluent gewachsenen Zellen die Zugabe von 100 µl MTT-Lösung pro well. Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wurden 100 µl temperierter SDS-Lysepuffer je well zugegeben. Die vollständige Lyse und das Lösen der Formazankristalle erfolgte im Dunkeln über Nacht auf einem Orbitalschüttler. Die Konzentration des Formazans in den einzelnen Versuchsansätzen wurde am nächsten Tag im ELISA-Scanner (Extinktion λ 570 nm, Referenz λ 655 nm) photometrisch bestimmt. Der Blindwert beinhaltete MTT-Lösung und Lysepuffer.

2.2.4.4. Auswertung der Messwerte und Berechnung der Zytotoxizität

Zur Berechnung der Zytotoxizität der Testsubstanzen wurden die Messwerte der unbehandelten Kontrollen gleich 100 % gesetzt. Die Blindwerte wurden als arithmetisches Mittel von allen Messwerten subtrahiert. Als Berechnungsgrundlage für die Auswertung dienten die jeweiligen geometrischen Mittelwerte der acht gemessenen Parallelproben.

Die Vitalität der schadstoffbehandelten Proben im Vergleich zur SFM-Kontrolle wurde folgendermaßen ermittelt:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{[(\text{Messwert Probe } n) - (\text{Blindwert})] \cdot 100}{[(\text{Messwert Kontrolle}) - (\text{Blindwert})]}$$

2.2.4.5. Bewertung der Kombinationseffekte

Die Bewertung der aufgetretenen Kombinationseffekte erfolgte in Anlehnung an die Isobologramm-Methode [Berenbaum, 1985] nach dem Konzept der toxischen Einheiten durch Summation der Toxic Units (TU) [Nirmalakhandan *et al.*, 1997].

Es gilt:

$$M = \sum (C_i / EC_i) = \sum TU$$

TU ist die toxische Einheit eines Schadstoffs im Gemisch. C_i ist die Konzentration einer Einzelkomponente im Gemisch, die einen bestimmten toxischen Effekt hervorruft. EC_i gibt die Konzentration derselben Einzelkomponente an, die allein wirkend denselben toxischen Effekt wie die Mischung hat.

M steht für folgende Kombinationseffekte

$M = 1$ Additivität (keine Interaktion)

$M < 1$ Synergismus (mehr als additiv)

$M > 1$ Antagonismus (weniger als additiv)

Die C_i - und EC_i -Werte wurden den Dosis-Effekt-Kurven desselben Versuchs entnommen. Dazu war es notwendig, in jedem Versuchsansatz sowohl das Gemisch als auch die entsprechenden Einzelkomponenten in steigenden Konzentrationen zu testen. Die Kombinationskurve und die Einzelkurven lagen der Berechnung der M-Werte zu Grunde.

2.2.5. Gentoxizitäts-Test

2.2.5.1. Comet-assay

Der comet-assay (single cell gel electrophoresis - SCGE) ist eine schnelle und sensitive Methode zum Nachweis von DNA-Schäden in einzelnen Säugerzellen [Östling und Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988].

Mit dem comet-assay werden DNA-Schäden erfasst, die entweder direkt zu Strangbrüchen führen oder über eine Alkalibehandlung in Einzelstrangbrüche überführt werden. Diese können unterschiedlicher Ursache sein: Sie werden durch die direkte Reaktion mit den Agenzien an der DNA induziert oder durch alkalilabile Stellen nach Behandlung der Zellkerne im Elektrophoresepuffer (alkaline unwinding, $\text{pH} \geq 13$). Weiterhin führen Basenmodifikationen zu einer Labilisierung der N-glykosidischen Bindung. Die so entstandenen AP-Stellen (apurinisch bzw. apyrimidinisch) werden im alkalischen Milieu in Strangbrüche überführt [Loeb, 1985]. DNA-Strangbrüche entstehen auch enzymatisch während der Exzisionsreparatur durch Endonukleaseaktivitäten. Der Vollständigkeit halber sollen schließlich noch Scherkräfte genannt werden, die trotz sensitiver Behandlung der lysierten Zellen auf Grund der Länge der chromosomalen DNA zu Strangbrüchen führen können.

Nach der Inkubation mit den Testsubstanzen werden die Zellen vereinzelt, in Agarose eingebettet, lysiert und einer alkalischen Elektrophorese unterzogen. Die angelegte Spannung bewirkt die Mobilität der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe. Je kleiner die Bruchstücke sind, desto länger ist ihr Wanderweg, die nicht geschädigte DNA wandert nicht. Nach der Anfärbung erscheint die intakte DNA kugelartig. Der Zellkern einer mit Schadstoff behandelten Zelle hat einen entsprechend ihrer Schädigung mehr oder weniger ausgeprägten Schweif (comet). Die Länge des Schweifs gibt die Größe der DNA-Fragmente wieder, und die Intensität des Schweifs steht für die Anzahl der DNA-Fragmente. Die Kometenbildung kann mit diesen beiden Faktoren quantifiziert werden und stellt das Verhältnis von DNA-Kern zu DNA-Schweif (tail-moment) dar [Singh *et al.*, 1988; Fairbairn *et al.*, 1995]. Abbildung (Abb.) 1 zeigt einen geschädigten Fibroblastenkern im mikroskopischen Bild.



Foto freundlich überlassen von Kathrin Henrichs.

Abb. 1 Geschädigter Fibroblastenkern, der im Mikroskop als Komet erscheint. Gezeigt ist der Nukleus, in dem sich noch ein Teil der DNA befindet und der Schweif, in dem sich die im elektrischen Feld gewanderten DNA-Bruchstücke befinden.

Als kanzerogene Substanz wurde Methansulfonsäuremethylester (MMS) ausgewählt. Es handelt sich hierbei um eine hydrophile Substanz, die ohne metabolische Aktivierung direkt gentoxisch wirksam ist, indem sie u. a. in der DNA an der N-7 Position des Guanins alkyliert [Hrdy, Bartzatt, 2004].

Tab. 2 Das Kanzerogen Methansulfonsäuremethylester (MMS), mit log P_{OW} -Wert, Strukturformel und CAS-Nummer.

Substanz (CAS-Nr.)	Strukturformel	log P_{OW}
Methansulfonsäure-methylester (MMS) (66-27-3)	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ \parallel \quad \diagup \\ \text{H}_3\text{C} - \text{S} - \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	- 0,66 (Hrdy, Bartzatt, 2004)

Die Fibroblasten wurden in 12 Petrischalen (\varnothing 5 cm) ausgesät und bei Erreichen der Subkonfluenz für den Versuch eingesetzt. Nach der Inkubation mit den Testsubstanzen (unspezifische wirksame Chemikalien und MMS als kanzerogene Substanz) wurden die Zellen durch Trypsinieren abgelöst und in 300 μl eiskaltem PBS-Puffer aufgenommen. Die Petrischalen wurden bis zum Auftragen der Zellen auf die Objektträger in den Kühlschrank gestellt, um die Reparatur der entstandenen DNA-Schäden zu hemmen. Darüber hinaus wurden alle Arbeitsschritte bei gedämpftem Licht durchgeführt, um zusätzliche DNA-Schäden durch Lichteinwirkung zu vermeiden. Mit Hilfe einer Eppendorfpipette wurde durch mehrmaliges, vorsichtiges Aufsaugen und Ablassen der Zellen eine gleichmäßige Zellsuspension hergestellt. Von dieser wurden 20 μl mit 90 μl einer 0,5 %igen LMP-Agaroselösung (37 °C) vermischt, auf einen zuvor mit SeaKem[®]-Agarose beschichteten Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Pro Versuchsansatz wurden zwei Objektträger hergestellt und für 5 Minuten zum Erstarren der Agarose in den Kühlschrank gelegt. Danach wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger für mindestens eine Stunde in eine abgedunkelte Küvette mit frisch hergestellter Lyselösung (4 °C) gestellt. Nach der Lyse wurden die Objektträger in eine waagerechte, von Eis umgebene Elektrophoresekammer lückenlos nebeneinander angeordnet, um während der Elektrophorese einen gleichmäßigen Stromfluss zu gewährleisten. Danach wurde in die Kammer kalte, frisch angesetzte Elektrophoreselösung gefüllt, bis die Objektträger gerade bedeckt waren. Zur Trennung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge und zur Überführung von alkalilabilen Stellen der DNA in Einzelstrangbrüche wurden sie abgedunkelt für 40 Minuten im „alkaline unwinding“ belassen. Anschließend wurde die Elektrophorese im Eisbad bei 300 mA, 25 V und 20 Minuten Laufzeit durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger auf ein Abtropfgestell gelegt, dreimal für jeweils 5 Minuten mit Neutralisationspuffer überschichtet und kurz in aqua dest. getaucht. Die über Nacht getrockneten Objektträger wurden mit 40 µl Ethidiumbromid-Färbelösung (20 µg/ml) angefärbt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops im UV-Licht (λ 515 – 560 nm; single staining mode; threshold 254, medium; standard) und entsprechender Software ausgewertet.

Pro Versuchsansatz wurden 50 auswertbare Zellen registriert, wie auch in der Literatur empfohlen [Lovell, 1999; Tice, 2000]. Die DNA-Schädigung wurde anhand des tail moments quantifiziert. Das tail moment ist das Produkt aus der Länge und der Fluoreszenzintensität des Kometenschweifs im Verhältnis zur Kernregion (Kometenkopf). Zellen, deren DNA so starke Schädigungen aufwies, dass die Kernregion nicht mehr sichtbar war und somit kein tailmoment mehr bestimmt werden konnte, wurden als „nicht auswertbare Zellen“ gesondert notiert. Weiterhin beobachtet man bei sehr stark geschädigten Zellen manchmal, dass der Zellkern sich vollständig vom Schweif gelöst hat. Um den prozentualen Gehalt der DNA im Schweif und die Taillänge zu ermitteln, benötigt die Software als Bezugspunkt den Kometenkopf. Fehlt dieser, kann das tail moment auf Grundlage dieser beiden Parameter nicht mehr bestimmt werden. Die nicht auswertbaren Zellen wurden erfasst, fanden aber bei der Medianberechnung und der statistischen Auswertung durch SigmaStat® keine Berücksichtigung. Für jeden Probenwert wurden die nicht auswertbaren Zellen angegeben und bei der Interpretation des assays berücksichtigt.

2.2.5.2. Statistische Auswertung des comet-assays

In vorangegangenen Arbeiten [Witte *et al.*, 2000; Stratis, 2001; Schewe, 2002; Schmidt, 2003; Lueken, 2004] konnte gezeigt werden, dass die im comet assay ermittelten Messergebnisse der tail moments in der Regel keiner Gauß'schen Normalverteilung folgten.

Als Grundlage für die nachfolgende statistische Auswertung der Messergebnisse wurde zunächst geprüft, ob die Werte der tail moments einer Normalverteilung folgten. Hierzu wurde der Einstichproben-*t*-Test von Kolmogorov-Smirnov nach Lilliefors angewendet. Gefragt wurde, ob die Nullhypothese (H_0): „die Messergebnisse seien normalverteilt“ auf dem 5 %-Niveau, dem Vertrauensbereich (confidence interval) von 95 % (Neyman, 1950), aufrechterhalten werden konnte.

Zusätzlich wurde geprüft, ob 2 oder mehr Messreihen zur gleichen Grundgesamtheit gehörten. Für normalverteilte Daten stehen t-Tests zur Verfügung, für nicht normalverteilte Daten der Mann-Whitney-Test (2 unabhängige Stichproben) oder der Wilcoxon-Test (paarweise angeordnete Daten). Auf dem 5 %-Niveau wäre zu prüfen, ob H_0 „2 Messreihen entstammen einer stetigen und symmetrischen Grundgesamtheit“ gehalten werden kann oder verworfen werden muss. Sollte H_0 „2 Messreihen entstammen einer stetigen und symmetrischen Grundgesamtheit“ Bestätigung finden, wäre mit der Varianzanalyse (normalverteilte Daten) oder dem Kruskal-Wallis-Test (nicht normalverteilte Daten) zu prüfen, ob H_0 „die Varianzen sind gleich“ bestätigt werden kann [Sachs, 2003].

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Computersoftware SigmaStat® Version 3.

2.2.6. Koloniebildungsfähigkeit

Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurde zwei Tage vor Versuchsdurchführung in Petrischalen (\emptyset 5 cm) ausgesät und nach Erreichen der Subkonfluenz mit den Testsubstanzen behandelt.

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zunächst zwei Mal mit SFM gewaschen und anschließend mit der jeweiligen Testlösung für eine Stunde bei 37 °C und einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre mit 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Nach dem Absaugen der Schadstofflösungen wurden die Zellen zwei Mal mit SFM gewaschen, trypsiniert und in 5 ml SFM aufgenommen. Durch mehrmaliges, vorsichtiges Aufsaugen der jeweiligen Zellsuspension wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen erreicht. Sofort wurden 0,5 ml der so hergestellten Zellsuspensionen in je 9,5 ml SFM überführt, gemischt und mittels Zählkammer die Anzahl der Zellen bestimmt. Es wurde eine Suspension von 250 Zellen/ml hergestellt und jeweils 1 ml Zellsuspension zu 4 ml Medium in Petrischalen (\emptyset 5 cm) pipettiert. Pro Schadstoffkonzentration wurden 5 Replikate angelegt.

Nach 6 - 8 Tagen wiesen die Kontrollschalen (Zellen ohne Gift) Kolonien auf. Das Medium aller Schalen wurde abgesaugt, die Zellen ein Mal mit Saline A gewaschen, für 10 Minuten mit 4 %iger Formaldehydlösung fixiert und mit 0,1 %iger Kristallviolettlösung gefärbt und mittels Kolonienzählgerät ausgezählt. Die Koloniebil-

dungsfähigkeit wurde in Prozent der Kolonien zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

2.2.7. HPRT-Mutagenitätstest

Im HPRT-Mutagenitätstest werden Vorwärtsmutationen des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (*HGPRT*)-Gens erfasst. Unter Zugabe des Purin-Analogons 6-Thioguanin zum Nährmedium wirkt die HGPR-Transferase des Wildtyps tödlich, indem das Enzym das Purin-Analogon zu letal wirkenden Nukleosid-5-monophosphaten metabolisiert. Ursachen hierfür sind Mutationen auf dem X-Chromosom (*hprt*) oder in Regulatorgenen [Nabholz *et al.*, 1966; Glatt, 1993].

Mutierte Zellen, bei denen das *HGPRT*-Gen durch eine Mutation inaktiviert wurde, können mit dem 6-Thioguanin-haltigen Nährmedium wachsen und Kolonien bilden.

Der HPRT-Mutagenitätstest zum Nachweis der mutagenen Potenz der zu testenden Substanzen wurde mit V79 Zellen des chinesischen Hamsters wie bei Bradley *et al.* (1981) und OECD Guideline 476 beschrieben, durchgeführt. Es wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen subkonfluent gewachsene V79 Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert, wie oben beschrieben.

In der OECD-Richtlinie RL 67/548/EWG Anhang V „Methoden zur Bestimmung der Toxizität“ ist unter B.15. Genmutation beschrieben, dass die höchste Konzentration die Überlebensrate nicht unter 10 – 20 % senkt. Als Negativkontrolle wurde SFM eingesetzt, als Positivkontrolle das direkt mutagen wirkende Ethylmethansulfonat (EMS).

Zur Erfassung der Toxizität wurde die Koloniebildungsfähigkeit bestimmt. Die restlichen Zellen wurden weiterkultiviert. Während der Expressionsphase (7 – 11 Tage nach Schadstoffinkubation) wurden die Zellen bei Erreichen konfluenten Wachstums so geteilt, dass jeweils 10⁷ Zellen weiterinkubiert werden konnten. Im Anschluss an die Expressionszeit wurden die Zellen trypsiniert und zur Erfassung der absoluten Koloniebildungsfähigkeit in Petrischalen (Ø 5 cm) in 5 Parallelen ausgesät (250 Zellen/Schale). Die absolute Koloniebildungsfähigkeit war für die Ermittlung der Klonierbarkeit der Zellen (cloning efficiency) notwendig. Zur Selektion der Mutanten

wurden 5×10^5 Zellen in Petrischalen (\varnothing 15 cm) ausgesät und in Medium mit 10 $\mu\text{g/ml}$ 6-Thioguaninzusatz subkultiviert. Pro Konzentration wurden 4 Replikate angelegt. Nach 7 bzw. 12 Tagen Inkubationszeit wurden die mutierten Zellen mit Formaldehydlösung fixiert und die Kolonien nach Färben mit Kristallviolettlösung quantitativ erfasst.

Die Berechnung der Mutationsfrequenz erfolgte als Mutanten pro 10^6 klonierbare Zellen. Erwiesen sich die Testsubstanzen sowohl als zytotoxisch als auch als mutagen, so musste die Mutationsrate entsprechend korrigiert werden.

2.2.8. Datenauswertung

Die Berechnungen sind im Folgenden dargestellt:

$$\text{Koloniebildungsfähigkeit [\%]} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien} \times 100}{250}$$

$$\text{Mutantenfrequenz} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien im Selektionsmedium} \times 10^6}{\text{Anzahl der klonierbaren Zellen}}$$

Fehlerfortpflanzung

$$\Delta_E = \sqrt{\left(\frac{\Delta_{\text{KBF}}^2}{\bar{X}_{\text{KBF}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{\text{Mutanten}}^2}{\bar{X}_{\text{Mutanten}}}\right)^2}$$

Δ_E Standardabweichung der Ergebnisse

Δ_{KBF}^2 Varianz der Koloniebildungsfähigkeit

$\Delta_{\text{Mutanten}}^2$ Varianz der Mutantenfrequenz

\bar{X} Mittelwert der Messwerte

3. Ergebnisse

3.1. Ermittlung eines geeigneten Vitalitätsnachweises

Um Kombinationswirkungen messen zu können, bedarf es eines einfachen sensitiven Nachweissystems, das in jeglicher Weise optimiert ist. Die hochsensitiven Nachweise zur Wachstumshemmung sollten zeit- und materialschonend in 96er well Multi-terplatten durchgeführt und in einem Plattenreader detektiert werden. Somit standen drei unterschiedliche Messmethoden zur Verfügung: Lumineszenzmessung mit dem ATP-Test, Fluorimetrie mit dem FDA-Test und Fotometrie mit dem MTT-Test.

3.1.1. Vergleich verschiedener Vitalitätsnachweise

Die drei Nachweismethoden ATP, FDA und MTT wurden zur Feststellung der Vitalität menschlicher Fibroblasten hinsichtlich toxischer Kombinationswirkungen mit einem binären Gemisch getestet. Der Methodenvergleich ist in Abb. 2 gezeigt.

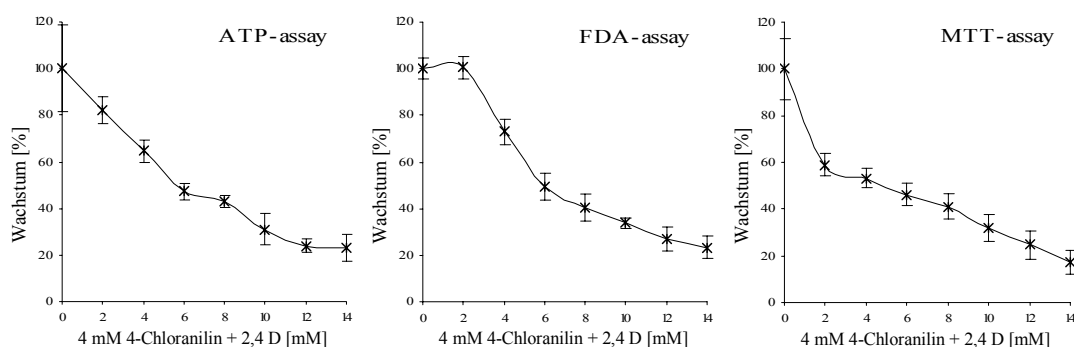


Abb. 2 Vergleich der Kombinationswirkung aus 4 mM 4-Chloranilin mit steigenden 2,4 D (Fluid)-Konzentrationen nach 1-stündiger Inkubation und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit SFM inkubiert und gleich 100 % gesetzt. 4-Chloranilin allein reduzierte die Vitalität bei allen drei Nachweismethoden um 20 %. Dargestellt ist das geometrische Mittel aus jeweils 8 Parallelen.

Anhand der dargestellten Versuchsergebnisse wird deutlich, dass nach 1 h Behandlung der Zellen mit einem binären Gemisch aus 4-Chloranilin und steigenden 2,4 D-Konzentrationen und 48-stündiger Wachstumsphase beim ATP- und beim MTT-assay keine signifikanten Unterschiede im Kurvenverlauf der beiden Kurven zu se-

hen sind. Die Kurve zum FDA-assay zeigt einen Schulterbereich, der bei den beiden anderen Tests fehlt.

Der MTT-assay erwies sich im Vergleich der drei Methoden bei gleicher Sensitivität als zu umständlich und zeitintensiv. Bestätigung findet dieses Ergebnis bei Petty *et al.* (1995).

3.1.2. Bestimmung der Nachweisgrenze der Vitalität

Es wurde die Sensitivität des ATP-assays mit der des FDA-assays verglichen. Hierzu wurde untersucht, wie viele Zellen/well zum Nachweis der Vitalität bei der Durchführung der einzelnen Methoden benötigt werden. Der Vergleich von ATP- und FDA-assay ist in Abb. 3 dargestellt.

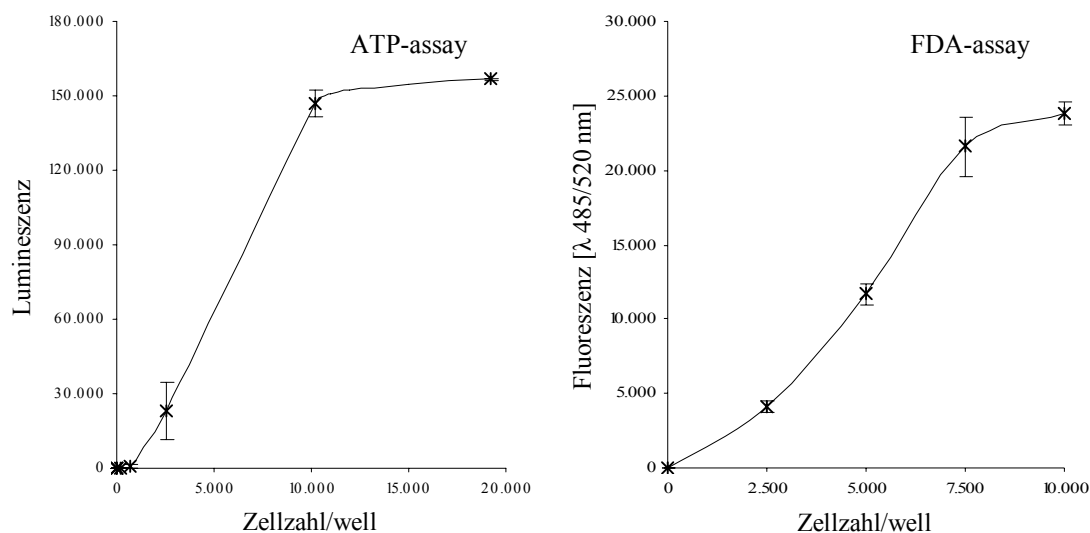


Abb. 3 Vergleich der benötigten Zellzahlen/well zur Ermittlung der Vitalität im ATP- und im FDA-assay. Hierzu wurden für den ATP-assay 10 – 19.250 Zellen/well und für den FDA-assay 2.500 – 10.000 Zellen/well ausgesät. Die Zellen wurden 24 Stunden vor den Tests ausgesät und bei 37 °C inkubiert.

ATP- und FDA-assay haben ähnliche Sensitivitäten: Ab einer Zellzahl von 10.000 Zellen/well war eine Linearität zwischen Lumineszenz/Fluoreszenz nicht mehr gegeben. Während der ATP-assay als Testkit teuer und kaum variabel war, konnte der FDA-assay optimiert werden und wurde daher favorisiert.

3.2. Optimierung des FDA-assays

3.2.1. FDA-Einwirkzeit

Im FDA-assay tritt bei der Messung der Fluoreszenz nach 5 Minuten Inkubationszeit zwischen 7.500 und 10.000 Zellen/well eine Sättigung der Kurve ein. Um zu klären, ob das Substrat FDA nach dieser kurzen Inkubationszeit vollständig enzymatisch umgesetzt ist, wurde die Einwirkzeit erhöht. Es stellte sich heraus, dass die Fluoreszenzwerte nach 10-minütiger Einwirkzeit um etwa 30 % höher detektiert wurden als nach 5 Minuten. Da eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit keine höheren Werte als die Messung nach 10 Minuten ergab, war das Substrat nach 10-minütiger Inkubationszeit vollständig enzymatisch umgesetzt.

3.2.2. Verschiedene FDA-Färbemethoden

Eine Arbeitserleichterung und Materialersparnis wäre es, wenn die FDA-Färbelösung dem Medium hinzu pipettiert werden könnte, anstatt das Medium vor der Färbung abnehmen zu müssen. Ein Vergleich der Methoden, die FDA-Messung mit und ohne Medium durchzuführen, ist in Abb. 4 dargestellt.

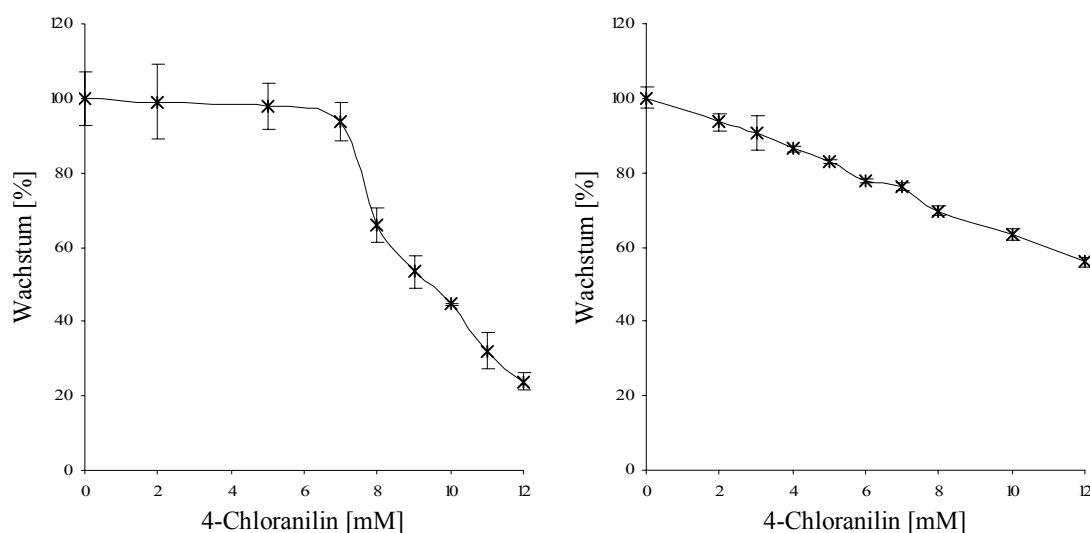


Abb. 4 Vitalität der Fibroblasten nach 1-stündiger Inkubation mit 4-Chloranilin und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit SFM inkubiert und gleich 100 % gesetzt. Die linke Grafik stellt die Vitalitätskurve dar, gemessen nach 5-minütiger Inkubationszeit mit FDA-Lösung und anschließender Entfernung der Lösung, die rechte gemessen mit FDA-Lösung. Dargestellt ist das geometrische Mittel aus jeweils 8 Parallelen mit Standardabweichungen.

Es zeigte sich, dass die Anwesenheit der FDA-Färbelösung im Medium während der Fluoreszenzmessung die Fluoreszenzwerte erhöhte und verfälschte. Möglicherweise enthielt das Medium selbst fluoreszierende Komponenten, und/oder FDA wurde auch außerhalb der Zelle zu Fluoreszein hydrolysiert. Deshalb wurde in den nachfolgenden Versuchen das Medium vor der Behandlung mit FDA abgenommen.

3.2.3. Optimierte Methode des FDA-assays

Die Durchführung des FDA-assays auf der Basis der Arbeit von Rotmann und Papermaster (1966) wurde in Anlehnung an Larsson und Nygren (1989) optimiert. So konnte gezeigt werden, dass

- eine Zellzahl von jeweils 2.500 Zellen/well ausreichend ist, um aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen (vergl. Abb. 3).
- nach der Inkubation mit den Testsubstanzen auf jegliche Spülschritte verzichtet werden kann, um Zellverluste der durch die Begiftung geschädigten Zellen zu vermeiden. Vor der Zugabe der FDA-Gebrauchslösung wurden das SFM bzw. das Medium und die Testsubstanzen entfernt.
- die Inkubation mit der FDA-Färbelösung auf 10 min. erhöht werden muss, da nach 5 min. das aufgenommene Fluoreszeindiacetat noch nicht vollständig umgesetzt war.
- durch die Einführung einer t_0 -Messung unmittelbar vor Versuchsbeginn und einer t_1 -Messung unmittelbar nach Versuchsende die Verdopplungsraten der Zellen erfasst werden konnten. Über die Wachstumsraten war es möglich, die Versuchsbedingungen innerhalb der Experimente zu vergleichen.

3.3. Zytotoxizität

3.3.1. Zytotoxische Einzeleffekte

Zunächst wurden Dosis-Effektkurven der Einzelsubstanzen Methanol, Glyphosat, 2,4 D, 4-Chloranilin, 1-Hexanol, m-Xylol, 2,4,6-TCP und PCP für die verwendete Zelllinie erstellt. Diese waren zur Bestimmung der NOEC-Werte (no observed effect concentration) erforderlich und um die Korrelation Lipophilität-Toxizität zu überprüfen und somit die unspezifische Wirksamkeit der Chemikalien im Testsystem festzustellen. Abb. 5 zeigt exemplarisch die NOEC-Werte der Substanzen Glyphosat,

2,4 D, 4-Chloranilin und PCP als Einzeldarstellungen. Die NOEC-Werte aller 8 verwendeten Testsubstanzen stellt Abb. 6 als Kurvenschar dar.

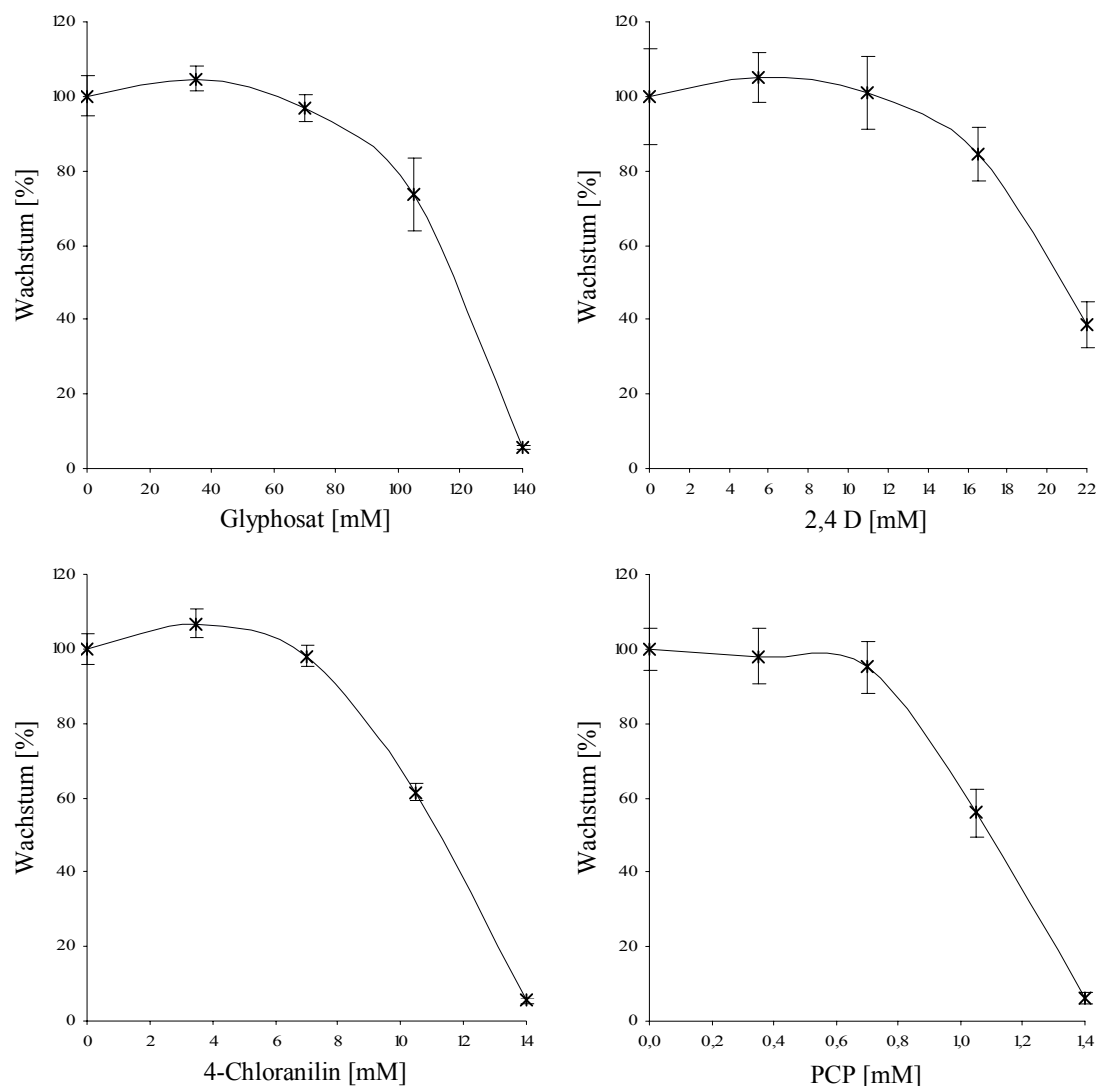


Abb. 5 Die NOEC-Werte der Substanzen Glyphosat, 2,4 D, 4-Chloranilin und PCP, ermittelt mit dem FDA-assay. Gemessen wurde die Vitalität der Fibroblasten nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium. Die Kontrolle wurde mit SFM inkubiert und gleich 100 % gesetzt. Dargestellt ist das geometrische Mittel aus jeweils 8 Parallelen mit Standardabweichung. Die Zellen der unbehandelten Kontrolle hatten sich über den Versuchszeitraum durchschnittlich etwa $1,2 \times$ geteilt.

Alle Substanzen bildeten einen Schulterbereich aus, d. h. einen Bereich in dem keine toxische Wirkung gemessen wurde. Die zellabtötende Wirkung war für alle verwendeten Substanzen bei einer Konzentration von 2 NOEC erreicht, außer bei 2,4 D (Daten nicht gezeigt).

Abb. 6 zeigt die Dosis-Effektkurven der 8 verwendeten Einzelsubstanzen als Gesamtdarstellung.

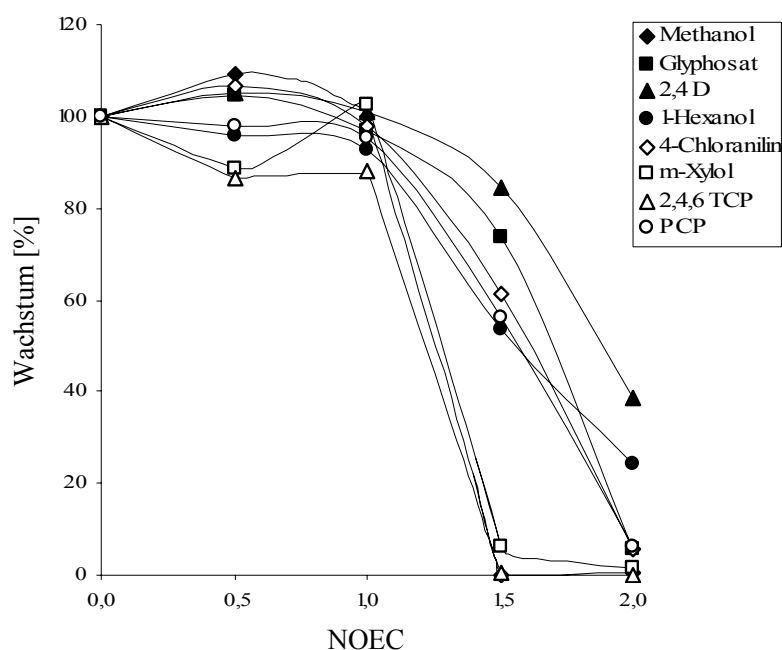


Abb. 6 Die Dosis-Effektkurven der 8 Einzelsubstanzen, dargestellt als Kurvenschar. Gemessen wurde die Vitalität der Fibroblasten nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium. Die Kontrollen wurden mit SFM inkubiert und gleich 100 % gesetzt. Dargestellt ist das geometrische Mittel aus jeweils 8 Parallelen. Die Standardabweichungen wurden zu Gunsten der Übersichtlichkeit nicht gezeigt, sie lagen bei $\pm < 10$ %. Die Zellen der unbehandelten Kontrolle hatten sich über den Versuchszeitraum durchschnittlich etwa $1,2 \times$ geteilt.

Die Kurven der Substanzen zeigen in ihrem Verlauf bis zur NOEC z. T. Effekte, die als Hormesis (von griech. *horme* – arbeiten) bezeichnet werden. Ein Anstieg der Kurve, hervorgerufen durch eine Stimulierung des Zellwachstums durch die eingesetzte Substanz, bezeichnen Calabrese and Baldwin (2003), Hadley (2003) und Butler (2004) als „inverted U-shaped hormetic model“. Dieser Effekt wurde häufig von Methanol, Glyphosat, 2,4 D und 4-Chloranilin hervorgerufen. Ein vorübergehender Abfall der Kurve, der mit „J-shaped hormetic model“ bezeichnet wird, wurde bei m-Xylol und 2,4,6 TCP festgestellt. Diese Hormesis-Effekte wurden häufig, aber nicht immer reproduzierbar für die o. g. Substanzen gemessen. Für 1-Hexanol und PCP wurde zumeist keine Abweichung vom 100 %-Wert bis zu ihrer jeweiligen NOEC beobachtet.

Der Kurvenverlauf der Chemikalien bis zu ihrer jeweiligen NOEC wird mit D_q bezeichnet und die Steigung im toxischen Bereich der Kurve mit D_0 .

Im wirksamen Bereich der Substanzen (D_0) wurden Unterschiede anhand unterschiedlicher Steigungen ermittelt:

- Die Kurven von Methanol, m-Xylol und 2,4,6 TCP haben eine durchschnittliche, statistisch signifikante Steigung von $m = -189,18$ ($\alpha < 0,05$).
- Für 1-Hexanol, 4-Chloranilin und PCP wurde bei gemeinsamer Betrachtung der Kurven eine durchschnittliche Steigung von $m = -76,65$ errechnet, wiederum statistisch signifikant ($\alpha < 0,05$).
- Die flachesten Kurven und damit die geringste Toxizität zwischen 1,0 – 1,5 NOEC wurden reproduzierbar für Glyphosat ($m = -46,49$) und 2,4 D ($m = -32,67$) ermittelt.

Die mit dem FDA-assay ermittelten NOEC- und EC_{50} -Werte der unspezifisch wirksamen Chemikalien sind in Tab. 3 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 3 Die NOEC- und EC_{50} -Werte der unspezifisch wirksamen Chemikalien. Gemessen wurde die Vitalität der Fibroblasten nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium. Die NOEC- und EC_{50} -Werte wurden den einzelnen Dosis-Effekt-Kurven entnommen.

Umweltchemikalie	NOEC (mM)	EC_{50} (mM)
Methanol	275	344
Glyphosat	70	120
2,4-D	11	20,7
4-Chloranilin	7	11,4
1-Hexanol	8	12,4
m-Xylol	2,625	3,4
2,4,6-TCP	1,5	1,9
PCP	0,7	1,1

Auf der Grundlage der in Tab. 3 aufgelisteten NOEC-Werte der verwendeten Testsubstanzen wurden alle nachfolgenden Versuche durchgeführt.

Als Merkmal für die Unspezifität von Chemikalien wurde vielfach die Korrelation der Zytotoxizität mit ihrer Lipophilie angegeben [Halle *et al.*, 1991; Saito *et al.*,

1993; Witte *et al.*, 2000].

Abb. 7 zeigt die Korrelation der ermittelten NOEC-Werte der eingesetzten Chemikalien mit ihrem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{OW}$).

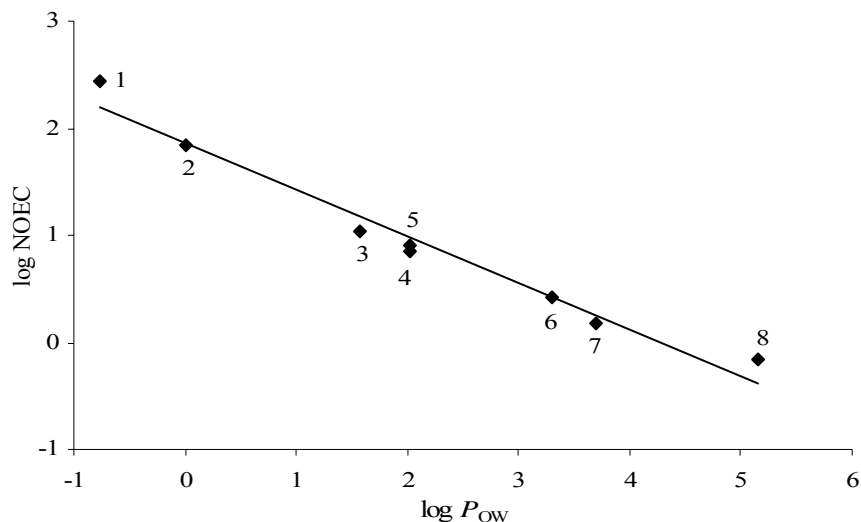


Abb. 7 Korrelation zwischen der Lipophilität ($\log P_{OW}$) und Zytotoxizität ($\log NOEC$) der eingesetzten Chemikalien: (1) Methanol (2) Glyphosat (3) 2,4 D (4) 1-Hexanol (5) 4-Chloranilin (6) m-Xylol (7) 2,4,6 TCP (8) PCP.
 $r = 0,97$; $p < 0,001$; $s = 0,16$; $n = 8$

Abb. 8 zeigt die Korrelation der EC_{50} -Werte der Umweltchemikalien mit ihrem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{OW}$).

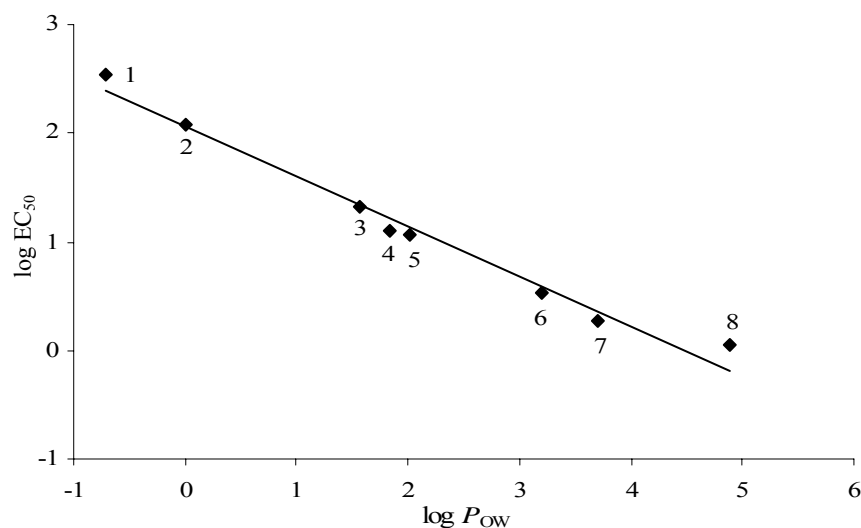


Abb. 8 Korrelation zwischen der Lipophilität ($\log P_{OW}$) und Zytotoxizität ($\log EC_{50}$) der eingesetzten Chemikalien: (1) Methanol (2) Glyphosat (3) 2,4 D (4) 1-Hexanol (5) 4-Chloranilin (6) m-Xylol (7) 2,4,6 TCP (8) PCP.
 $r = 0,98$; $p < 0,001$; $s = 0,14$; $n = 8$

Man sieht eine statistisch signifikante lineare Korrelation zwischen den NOEC- bzw. den EC_{50} -Werten der Einzelsubstanzen und ihrem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten. Die Steigungen der Regressionsgeraden betragen - 0,435 (Abb. 7) bzw. - 0,459 (Abb. 8).

3.3.2. Zytotoxische Kombinationseffekte

3.3.2.1. Konzentrationsabhängigkeit

Die Einzelsubstanzen Methanol, Glyphosat, 2,4 D, 4-Chloranilin, 1-Hexanol, m-Xylol, 2,4,6-TCP und PCP wurden als Gemische aus bis zu 8 Komponenten untersucht, wobei Kombinationen vom binären bis zum Gemisch aus 8 Komponenten erfasst wurden. Die Substanzen wurden in nicht zytotoxischen Konzentrationen jeweils im Verhältnis 1 NOEC : 1 NOEC gemischt und diese Lösung zur Erstellung der Konzentrationsabhängigkeits-Kurven verdünnt. In jedem Versuch wurden sowohl die Einzelwirkungen als auch die Kombinationswirkungen der beteiligten Komponenten gemessen, es sei denn, es wurde anders vermerkt.

3.3.2.1.1. Kombinationswirkungen von binären Gemischen

Zur Ermittlung der zytotoxischen Wirkung binärer Substanzgemische wurde 2,4 D, eine Substanz mit mittlerer Lipophilität, mit den 7 Einzelsubstanzen kombiniert. Weiterhin wurde eine Kombination aus den hydrophilen Substanzen Methanol und Glyphosat durchgeführt, sowie eine hydrophile/lipophile (Methanol/PCP) Kombination. Dabei wurden in einem Versuch gleichzeitig die Kombinationen und die Einzelwirkungen gemessen. In Abb. 9 und Tab. 4 sind die Ergebnisse dargestellt.

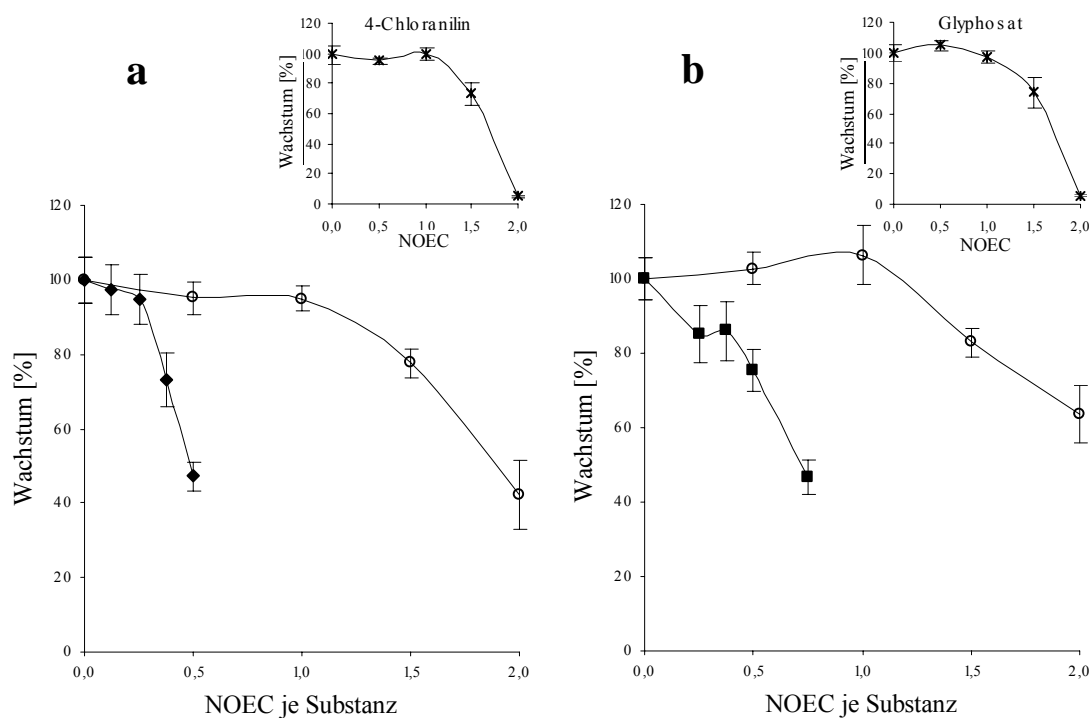


Abb. 9 Vitalität menschlicher Fibroblasten nach der Inkubation mit (○) 2,4 D, 4-Chloranilin bzw. Glyphosat allein und mit der (a) 2er-Kombinationen (◆) aus 2,4 D und 4-Chloranilin bzw. mit der (b) 2er-Kombinationen (■) aus 2,4 D und Glyphosat. Dargestellt ist das geometrische Mittel aus je einem Versuch mit jeweils 8 Parallelen mit Standardabweichung. Bei den Kombinationen wurden die NOEC-Werte je Komponente dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Kombinationen aus 2,4 D und 4-Chloranilin bzw. 2,4 D und Glyphosat auch unterhalb ihrer Toxizitätsschwellen (NOEC-Werte) toxische Kombinationswirkungen verursachten. Dieses Ergebnis wurde für alle binären Gemische festgestellt. Somit erwies sich ein Gemisch aus zwei Substanzen in derselben Gesamtkonzentration als deutlich toxischer als die jeweilige Substanz allein.

Die Toxizitätswerte aller getesteten binären Gemische (angegeben als Wert je Substanz) und die M-Werte sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4 Toxizitäts- und M-Werte für Substanzgemische aus 2 Einzelkomponenten auf verschiedenen Toxizitätsleveln, die mit EC₃₀ bis EC₅₀ (30 %- bis 50 %-Effekt) angegeben wurden. Dargestellt sind die Werte aus je 2 Versuchen pro Gemisch mit jeweils 8 Parallelen.

Chemikaliengemische	Toxizitätswerte der Gemische [NOEC je Substanz]			M-Werte		
	EC ₃₀	EC ₄₀	EC ₅₀	EC ₃₀	EC ₄₀	EC ₅₀
2,4 D, Methanol	0,30 0,30	0,31 0,30	0,31 0,32	0,45 0,43	0,44 0,42	0,44 0,42
2,4 D, Glyphosat	0,17 0,55	0,22 0,63	0,42 0,73	0,13 0,66	0,25 0,71	0,42 n.b.
2,4 D, 1-Hexanol	0,43 0,40	0,47 0,45	0,50 0,50	0,66 0,58	0,62 0,58	0,61 0,55
2,4 D, 4-Chloranilin	0,41 0,40	0,47 0,45	0,50 0,50	0,54 0,49	0,57 0,52	0,55 0,54
2,4 D, m-Xylol	0,40 0,35	0,41 0,41	0,43 0,45	0,49 0,35	0,49 0,40	0,47 n.b.
2,4 D, 2,4,6-Trichlorphenol	0,48 0,34	0,50 0,38	n.b. 0,43	0,59 0,47	0,57 0,46	n.b. n.b.
2,4 D, Pentachlorphenol	0,07 0,27	0,18 0,38	0,37 0,43	0,44 0,51	0,49 0,54	0,58 0,54
Methanol, Pentachlorphenol	0,43 0,42	0,46 0,46	0,48 0,50	0,73 0,65	0,74 0,69	0,77 0,72
Methanol, Glyphosat	0,50 0,37	0,51 0,55	0,52 0,78	0,87 0,57	0,87 0,81	0,85 1,07

n.b. nicht berechenbar

Es ergaben sich für die EC₃₀- bis EC₅₀-Werte für alle binären Substanzgemische synergistische Effekte ($M < 1$). Die Kombination aus den stark hydrophilen Substanzen Methanol und Glyphosat wiesen etwas höhere M-Werte auf, als alle anderen Kombinationen, was auf eher additive Effekte schließen lässt.

3.3.2.1.2. Kombinationswirkungen von Gemischen aus bis zu 8 Komponenten

Analog der binären Gemische wurden Substanzgemische aus 3 – 8 Chemikalien erstellt und konzentrationsabhängig die Wachstumshemmung gemessen. Abb. 10 stellt exemplarisch die toxischen Kombinationswirkungen dieser Substanzgemische in der Konzentration „Gesamt-NOEC“ (Addition aller Konzentrationen der beteiligten Komponenten) der Substanzgemische auf menschliche Fibroblasten dar. Die Substanzen wurden wiederum jeweils im Verhältnis 1 NOEC : 1 NOEC gemischt und diese Lösung zur Erstellung der Konzentrationsabhängigkeits-Kurven verdünnt. Die dargestellten Kurven wurden in zwei unabhängigen Versuchen erstellt. Zur Berechnung der M-Werte wurden Einzelkurven der Substanzen aus vorangegangenen Versuchen herangezogen.

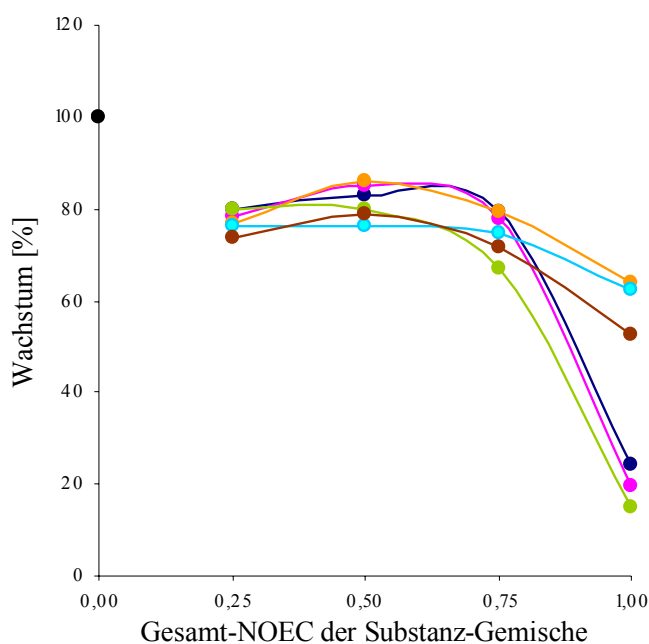


Abb. 10 Vitalität menschlicher Fibroblasten nach der Inkubation mit Substanzgemischen aus: ● 3er-Kombination (2,4 D, 4-Chloranilin, PCP) ● 4er-Kombination (2,4 D, 4-Chloranilin, PCP, 2,4,6 TCP) ● 5er-Kombination (2,4 D, 4-Chloranilin, PCP, 2,4,6 TCP, Glyphosat) ● 6er-Kombination (2,4 D, 4-Chloranilin, PCP, 2,4,6 TCP, Glyphosat, m-Xylol) ● 7er-Kombination (2,4 D, 4-Chloranilin, PCP, 2,4,6 TCP, Glyphosat, m-Xylol, 1-Hexanol) ● 8er-Kombination (2,4 D, 4-Chloranilin, PCP, 2,4,6 TCP, Glyphosat, m-Xylol, 1-Hexanol, Methanol). ● Stellt den Wert für die unbehandelte Kontrolle dar. Gemessen wurde die Vitalität der Fibroblasten nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium. Dargestellt ist das geometrische Mittel aus 2 Versuchen mit jeweils 6 Parallelen. Es wurden die Gesamt-NOEC-Werte der Substanzgemische dargestellt. Die Standardabweichungen ($\pm < 10\%$) wurden zu Gunsten der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

Es wird deutlich, dass sich untoxische Konzentrationen der einzelnen Komponenten im Gemisch toxisch auswirkten. Wie in Abb. 10 gezeigt, wurden bei gleicher Gesamt-Konzentration der unspezifisch wirksamen Chemikalien im Gemisch, unter Berücksichtigung der Standardabweichungen (zur besseren Übersicht nicht gezeigt), vergleichbare gesamt-konzentrationsabhängige Toxizitäten ermittelt. Dies gilt für alle getesteten Gemische aus 3 – 8 Komponenten und spiegelt sich in der Ähnlichkeit der 6 Kurven wider.

Für die statistische Auswertung der Messwerte wurde als Voraussetzung für den Einstichproben-*t*-Test im Varianzen F-Test geprüft, ob die Varianzen (die Quadrate der Standardabweichungen) signifikant unterschiedlich ($\alpha > 0,05$) oder gleich sind ($\alpha \leq 0,05$) [Sachs, 2003]. Die Gleichheit der Varianzen ($\alpha \leq 0,05$) wurde für die Messwerte $0,25 - 0,75 \times$ Gesamt-NOEC festgestellt, ein signifikanter Unterschied ($\alpha > 0,05$) wurde für alle Messwerte für 1 Gesamt-NOEC der Gemische ermittelt. Im Einstichproben-*t*-Test von Kolmogorov-Smirnov nach Lilliefors wurde als Nullhypothese (H_0) auf dem 5 %-Niveau geprüft, ob die Messwerte für die Konzentrationen $0,25 - 0,75 \times$ Gesamt-NOEC einer stetigen und symmetrischen Grundgesamtheit entstammen. H_0 konnte auf dem 5 %-Niveau beibehalten werden. Es zeigte sich, dass lediglich bei der höchsten Konzentration (1 Gesamt-NOEC) statistisch signifikante Unterschiede der Messwerte festgestellt werden konnten.

Abb. 11 stellt die toxischen Kombinationswirkungen aus Abb. 10 als NOEC je Komponente der Substanzgemische dar. Zur besseren Übersicht wurden 4 Kombinationen aufgeführt, und zwar die aus 3, 4, 6 und 8 Komponenten

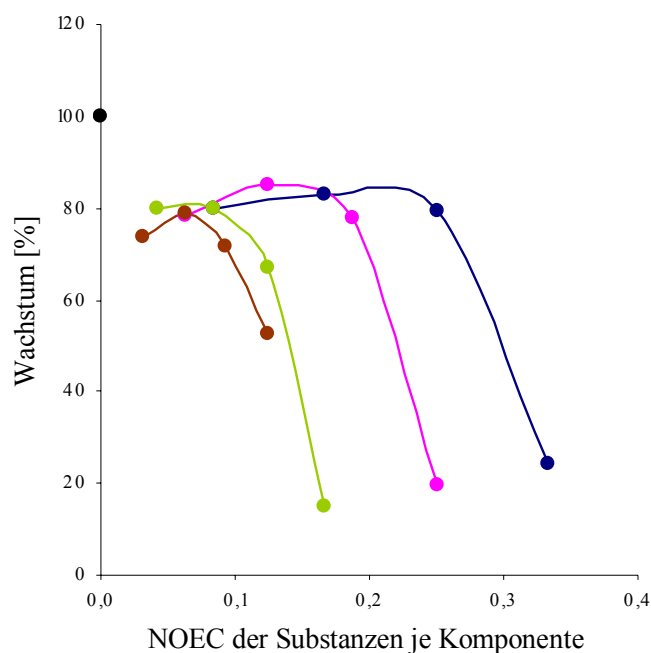


Abb. 11 Vitalität menschlicher Fibroblasten nach der Inkubation mit Substanzgemischen aus: ● 3er-Kombination (2,4 D, 4-Chloranilin, PCP) ● 4er-Kombination (2,4 D, 4-Chloranilin, PCP, 2,4,6 TCP) ● 6er-Kombination (2,4 D, 4-Chloranilin, PCP, 2,4,6 TCP, Glyphosat, m-Xylol) ● 8er-Kombination (2,4 D, 4-Chloranilin, PCP, 2,4,6 TCP, Glyphosat, m-Xylol, 1-Hexanol, Methanol). ● Stellt den Wert für die unbehandelte Kontrolle dar. Gemessen wurde die Vitalität der Fibroblasten nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen und anschließender 48-stündiger Wachstumsphase in Medium. Dargestellt ist das geometrische Mittel aus 2 Versuchen mit jeweils 6 Parallelen. Es wurden die NOEC-Werte je Komponente dargestellt. Die Standardabweichungen wurden zu Gunsten der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Sie lagen bei $\pm < 10$ %.

Je komplexer das Gemisch war, desto geringere Konzentrationen der einzelnen Komponenten im Gemisch waren zum Erreichen eines bestimmten Toxizitätslevels (z. B. 40 %) nötig.

Die berechneten toxischen Kombinationseffekte für die Kombinationen aus 3 – 8 Komponenten wurden in Tab. 5 zusammengestellt.

Tab. 5 Toxizitäts-Werte (als NOEC je Substanz) und M-Werte für Substanzgemische aus 3 - 8 Einzelkomponenten auf verschiedenen Toxizitätsleveln, die mit EC₃₀ bis EC₅₀ (30 %- bis 50 %-Effekt) angegeben wurden. Dargestellt wurden die Toxizitäts- und M-Werte aus je 1 Versuch pro Gemisch mit jeweils 6 Parallelen.

Chemikaliengemische	Toxizität der Gemische [NOEC je Substanz]			M-Werte		
	EC ₃₀	EC ₄₀	EC ₅₀	EC ₃₀	EC ₄₀	EC ₅₀
3er Gemisch 2,4 D, 4-Chloranilin, Pentachlorphenol	0,27	0,29	0,30	0,554	0,527	0,896
4er Gemisch 2,4 D, 4-Chloranilin, 2,4,6 Trichlorphenol, Pentachlorphenol	0,20	0,21	0,22	0,587	0,570	0,880
5er Gemisch Glyphosat, 2,4 D, 4-Chloranilin, 2,4,6 Trichlorphenol, Pentachlorphenol	0,18	0,20	n.b.	0,650	0,663	n.b.
6er Gemisch Glyphosat, 2,4 D, 4-Chloranilin, m-Xylol, 2,4,6 Trichlorphenol, Pentachlorphenol	0,12	0,13	0,14	0,531	0,537	0,844
7er Gemisch Glyphosat, 2,4 D, 4-Chloranilin, 1-Hexanol, m-Xylol, 2,4,6 Trichlorphenol, Pentachlorphenol	0,12	0,14	n.b.	0,638	0,692	n.b.
8er Gemisch Methanol, Glyphosat, 2,4 D, 4-Chloranilin, 1-Hexanol, m-Xylol, 2,4,6 Trichlorphenol, Pentachlorphenol	0,10	0,11	0,13	0,590	0,640	n.b.

n.b. nicht berechenbar

Bei einer Bewertung der Kombinationseffekte (M-Werte) ergaben sich für die EC₃₀- bis EC₅₀-Werte für die Substanzgemische aus 3 – 8 Komponenten durchweg synergistische Effekte. Auffällig ist die Ähnlichkeit der M-Werte auf den jeweiligen Toxizitätsleveln, unabhängig von der Anzahl der Testsubstanzen im Gemisch.

3.3.2.2. Zeitabhängigkeit

Für die Ermittlung der zytotoxischen Kombinationswirkung der eingesetzten Testsubstanzen in Abhängigkeit von der Zeit, wurden Fibroblasten über einen Versuchszeitraum von 5 Tagen in Medium inkubiert, in dem die Testsubstanzen gelöst waren. Die Messung am Fluorimeter erfolgte am Versuchstag mehrmals (t_0 , t_5 , t_8) und weiterhin täglich zur selben Zeit (t_{24} , t_{48} , t_{72} , t_{96}). Es wurden die Wirkung einer Einzelsubstanz, eines binären und eines ternären Gemisches in jeweils 3 unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Die Konzentrationen wurden als NOEC bzw. Bruchteile der NOEC angegeben. Dabei beziehen sich die NOEC-Werte auf eine 1-stündige Inkubationszeit mit 48-stündiger Erholungsphase der Zellen.

In Abb. 12 ist die Wachstumshemmung durch 2,4 D allein, das binäre Gemisch (2,4 D/PCP) und das ternäre Gemisch (2,4 D/PCP/4-Chloranilin) über eine Inkubationszeit von 96 Stunden dargestellt.

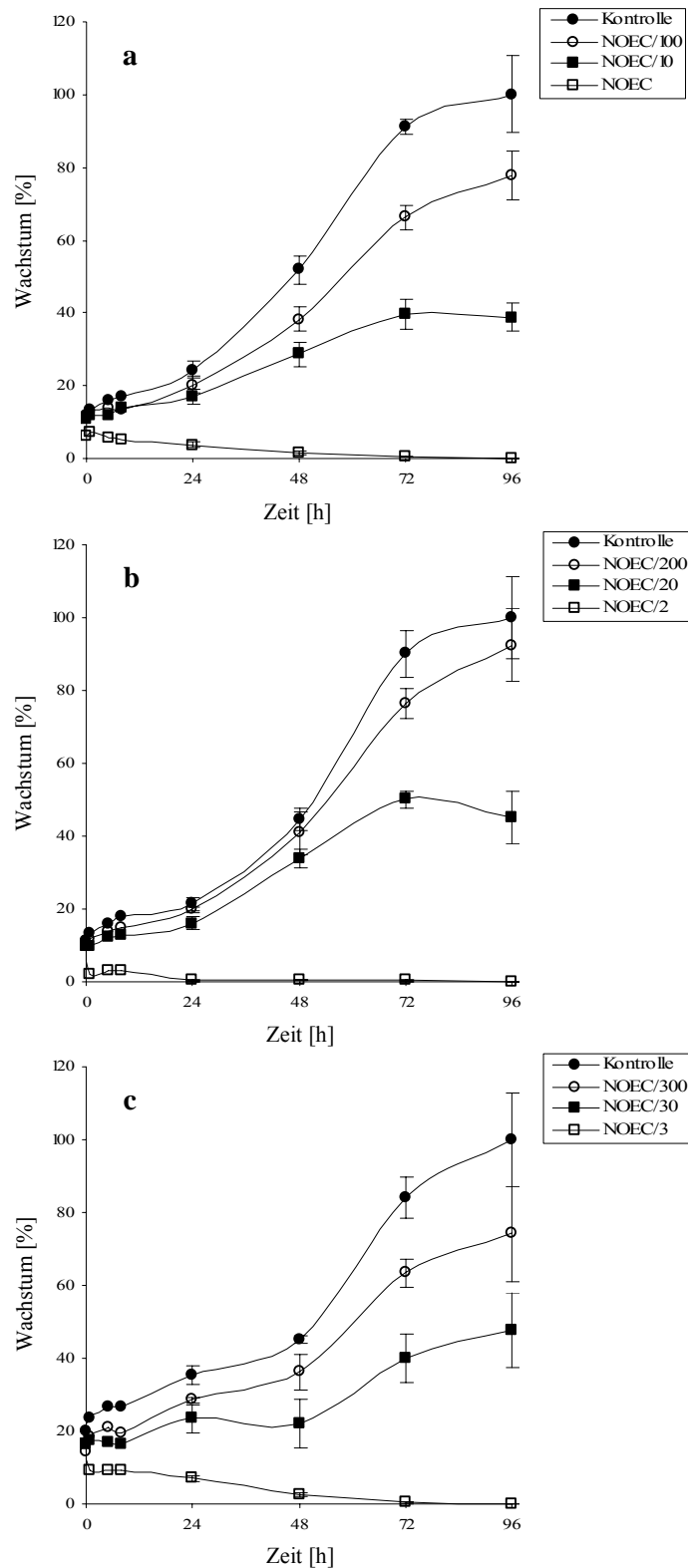


Abb. 12 Toxische Wirkung von (a) 2,4 D, (b) 2,4 D und PCP, (c) 2,4 D, PCP und 4-Chloranilin auf menschliche Fibroblasten über einen Messzeitraum von 96 h. 2,4 D (a) wurde in den Konzentrationen NOEC, NOEC/10 und NOEC/100 eingesetzt. 2,4 D und PCP (b) wurden jeweils in den Konzentrationen NOEC/2, NOEC/20 und NOEC/200 eingesetzt. (c) 2,4 D, PCP und 4-Chloranilin wurden jeweils in den Konzentrationen NOEC/3, NOEC/30 und NOEC/300 eingesetzt. Die NOEC-Werte wurden Vorversuchen entnommen. Dargestellt ist das geometrische Mittel aus einem Versuch mit je 8 Parallelen und Standardabweichungen.

In den dargestellten Untersuchungen nahm die Toxizität mit der Zeit zu. Die NOEC (nach einstündiger Begiftung) unterband jegliches Wachstum, alle Zellen starben nach 24 – 72 Stunden ab. Selbst 1/100 der einstündigen NOEC erzeugte nach 96 Stunden eine Wachstumshemmung. Bei gleicher Gesamtkonzentration der Chemikalien wurde eine gleiche zeitabhängige Toxizität ermittelt, unabhängig von der Anzahl der Komponenten im Gemisch. Dies bedeutet, dass im Gemisch aus 3 Komponenten schon eine Konzentration von 1/300 NOEC ausreichte, um zu einer Wachstumshemmung zu führen. Die maximale Zelldichte (Konfluenz) wurde nach ca. 72 – 96 Stunden erreicht.

3.4. Gentoxische Effekte

3.4.1. Comet-assay

3.4.1.1. Einzelwirkung von Methansulfonsäuremethylester (MMS)

Um in Kombinationsversuchen synergistische Wirkungen zwischen unspezifisch wirksamen, also nicht gentoxische wirkenden Chemikalien mit dem Kanzerogen MMS messen zu können, muss MMS in einer Konzentration eingesetzt werden, in der es allein nur einen geringen DNA-Schaden verursachte. Um diese Konzentration zu ermitteln, wurde ein comet-assay durchgeführt, in dem die Zellen mit steigenden Konzentrationen an MMS inkubiert wurden. Abb. 13 zeigt das Ergebnis.

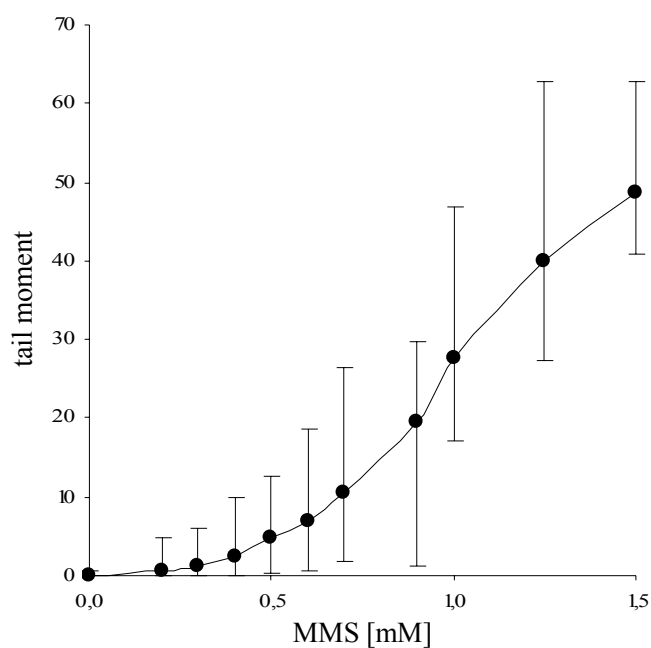


Abb. 13 Gentoxische Wirkung von MMS in steigenden Konzentrationen auf menschliche Fibroblasten nach 1-stündiger Inkubationszeit. Gezeigt ist der Median der tail moments (mit Konfidenzintervallen) eines typischen Versuchs, ermittelt aus jeweils 50 ausgewerteten Zellen.

Aufgrund des in Abb. 13 gezeigten Ergebnisses wurde MMS für die Kombinationsversuche in einer Konzentration von 0,4 mM eingesetzt. Dies ist eine Konzentration, von der eine geringe DNA-Schädigung erwartet werden konnte. Bei allen Kombinationsversuchen wurde immer auch die Wirkung von 0,4 mM MMS allein getestet. Diese Konzentration liegt weit unter der zytotoxischen NOEC von 2,5 mM für MMS

[Hömmе *et al.*, 2000]. Somit war eine gentoxische Wirkung von 0,4 mM MMS als Folge der Zytotoxizität [Hartmann und Speit, 1995] auszuschließen.

Aus vorangegangenen Arbeiten [z.B. Witte *et al.*, 2000; Lueken *et al.*, 2004] und anhand aktueller Literatur [Collins, 2002; Duez *et al.*, 2003] ist bekannt, dass die im comet-assay ermittelten Zellschäden, verursacht durch diverse physikalische und chemische Agenzien, keiner Gauß'schen Normalverteilung folgen. Eine Standardabweichung darf nur berechnet werden, wenn diese auf einer Normalverteilung der Werte beruht. Um dies zu überprüfen, wurde ein Histogramm erstellt, das die Anzahl der ausgewerteten Zellen [%] in Abhängigkeit von den tail moments und der MMS-Konzentration [mM] zeigt. Die prozentuale Verteilung der tail moments stellt Abb. 14 dar.

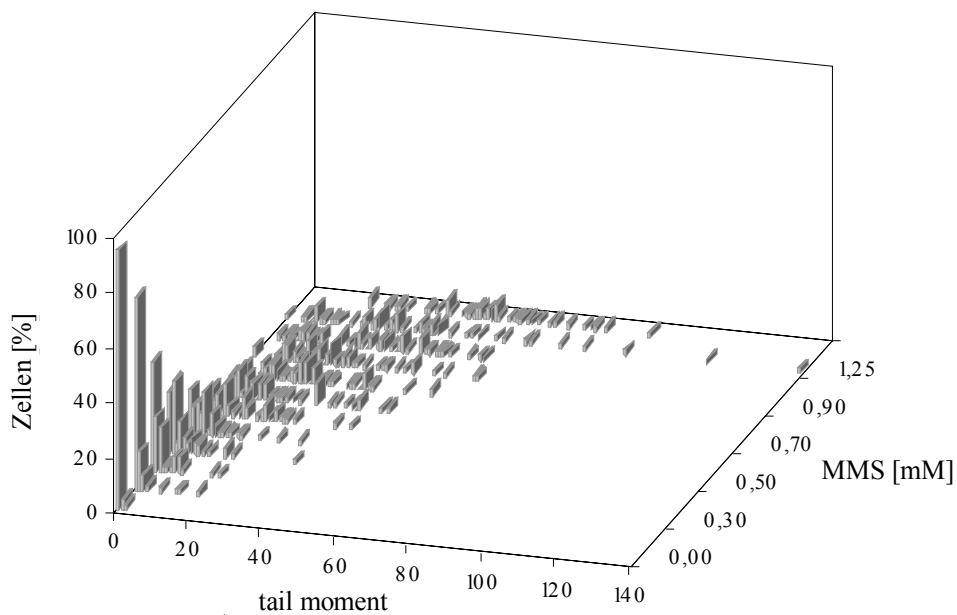


Abb. 14 Prozentuale Verteilung der tail moments. DNA-Schäden einzelner menschlicher Fibroblasten nach 1-stündiger Inkubation mit MMS im Konzentrationsbereich von 0,2 – 1,5 mM. Dargestellt wurden die tail moments von jeweils 50 Zellen pro Konzentration.

Anhand der in Abb. 14 gezeigten prozentualen Verteilung der tail moments wird deutlich, dass die DNA-Schäden mit ansteigenden MMS-Konzentrationen größer werden. Neben Zellen mit geringem Schaden wurden jedoch schon bei geringen Konzentrationen an MMS auch solche mit einem höheren DNA-Schaden gefunden. Mit steigender Schadstoffkonzentration nahm die Spannweite der Messwerte zu, also

die Differenz zwischen dem größten und dem kleinsten Wert innerhalb einer Stichprobe [Sachs, 2003].

Es wurde geprüft, ob die Werte der tail moments einer Normalverteilung folgten. Hierzu wurde der Einstichproben-*t*-Test von Kolmogorov-Smirnov nach Lilliefors angewendet. Gefragt wurde, ob die Nullhypothese H_0 : „die Messergebnisse seien normalverteilt“ auf dem 5 %-Niveau, also im Vertrauensbereich (confidence interval) von 95 %, aufrechterhalten werden konnte.

H_0 musste verworfen werden, denn die tail moments einer Messreihe entstammten nicht derselben Grundgesamtheit ($p < 0,05$). Damit war bewiesen, dass die Werte keiner Gauß'schen Normalverteilung folgten und folglich eine Standardabweichung nicht berechnet werden durfte.

Auch bei der Gruppierung der tail moments in Klassen nach der Formel

$$\text{Klassenbreite } b = V/1 + 3,32 \times \log_{(n)}$$

folgten die Werte keiner Gauß'schen Normalverteilung. Deshalb konnten für alle Messwerte Konfidenzintervalle angegeben werden, nicht aber Standardabweichungen.

3.4.1.2. Kombinationswirkungen zwischen dem Kanzerogen MMS und nicht gentoxisch wirkenden Chemikalien

Es wurde schon früher gezeigt, dass die hier eingesetzten unspezifisch wirksamen Substanzen im comet-assay keine Kometenbildung hervorrufen [Lüken *et al.*, 2004].

Zur Kontrolle wurde in jedem Versuch auch die unspezifisch wirksame Einzelsubstanz bzw. das Gemisch der Substanzen erfasst.

Es wurden Gemische aus dem Kanzerogen MMS in Kombination mit 1 bis zu 8 nicht gentoxisch wirkenden Substanzen (s. Tab. 1) untersucht. Die unterschiedlichen Stoffklassen entstammenden, unspezifisch wirksamen Chemikalien unterschieden sich sowohl strukturell als auch in ihrem jeweiligen Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P_{OW}$ -Wert: - 0,77 bis 5,16).

Die unspezifisch wirksamen Chemikalien wurden jeweils in ihrer halben NOEC gelöst und diese Lösung zur Erstellung der Konzentrationsabhängigkeits-Kurven verdünnt. MMS wurde in einer gering gentoxischen Konzentration von 0,4 mM mit den

entsprechenden Verdünnungen der Chemikalien kombiniert. Die Inkubation mit den Gemischen erfolgte für 1 Stunde mit menschlichen Fibroblasten. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 gezeigt.

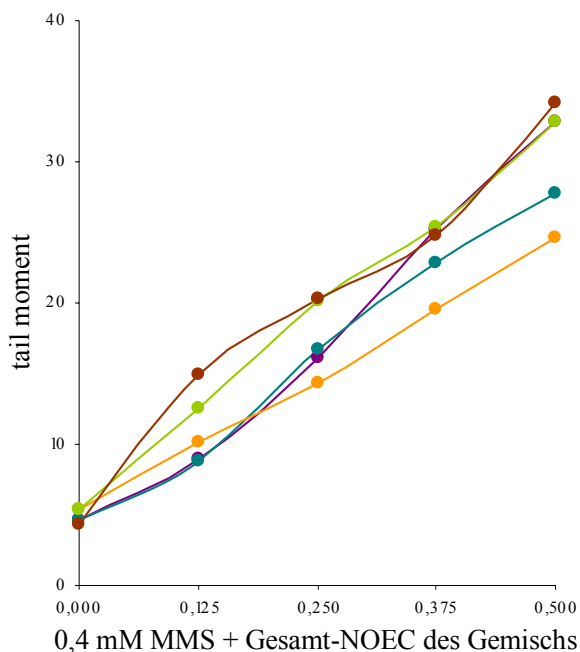


Abb. 15 Gentoxische Wirkung von 0,4 mM MMS in Kombination mit steigenden Konzentrationen von (●) 1 Substanz (PCP) (●) 2 Substanzen (PCP und Methanol) (●) 5 Substanzen (PCP, 2,4 D, 4-Chloranilin, 2,4,6 TCP und Glyphosat) (●) 6 Substanzen (PCP, 2,4 D, 4-Chloranilin, 2,4,6 TCP, Glyphosat und m-Xylol) (●) 8 Substanzen (PCP, 2,4 D, 4-Chloranilin, 2,4,6 TCP, Glyphosat, m-Xylol, 1-Hexanol und Methanol) nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen auf menschliche Fibroblasten. Die Grafik setzt sich aus 3 unabhängigen Versuchen zusammen. Gezeigt sind die Mediane der tail moments. Die Konzentration der Substanzgemische wurde als Gesamt-NOEC angegeben. Die Konfidenzintervalle sind zu Gunsten der Übersichtlichkeit nicht gezeigt und sind analog zu denen in Abb. 13.

Die unspezifisch wirksamen Chemikalien allein verursachten nach 1-stündiger Inkubation keine DNA-Schäden. Für 0,4 mM MMS allein wurden erwartungsgemäß genotoxische Schäden im Bereich von 4,38 – 5,31 tail moments ermittelt.

Für alle Kombinationen der in subtoxischen Konzentrationen eingesetzten unspezifisch wirksamen Chemikalien wurde eine Erhöhung der DNA-schädigenden Wirkung von MMS festgestellt. PCP allein verstärkte die DNA-schädigende Wirkung von MMS in seiner halben NOEC (350 μ M) um 600 %.

Mit ansteigender Gesamtkonzentration der Komponenten im Gemisch stieg die DNA-Schädigung in allen Kombinationsversuchen stetig an. Schon die Konzentration von 0,125 NOEC führte in den Gemischen zu einer 2 – 3-fachen Verstärkung der DNA-schädigenden Wirkung von MMS. Die Gesamtkonzentration der unspezifisch wirksamen Chemikalien von 0,5 NOEC führte in den verschiedenen Kombinationen zu einem Verstärkungseffekt von 400 – 600 %.

Es wurde für alle Messwerte dieser Untersuchung geprüft, ob die Werte der tail moments einer Normalverteilung folgten. Hierzu wurde der Einstichproben-*t*-Test von Kolmogorov-Smirnov nach Lilliefors angewendet. Gefragt wurde, ob die Nullhypothese H_0 : „die Messergebnisse seien normalverteilt“ auf dem 5 %-Niveau, also im Vertrauensbereich (confidence interval) von 95 %, aufrechterhalten werden konnte. H_0 musste verworfen werden, denn die tail moments einer Messreihe entstammten nicht derselben Grundgesamtheit ($p < 0,05$). Damit war bewiesen, dass die Werte keiner Gauß'schen Normalverteilung folgten und folglich eine Standardabweichung nicht berechnet werden durfte.

Aufgrund der ähnlichen Steigung der in Abb. 15 gezeigten Kurven wurde geprüft, ob die Werte einer Konzentration für alle gezeigten Grafen derselben Grundgesamtheit entstammten. Der Kruskal-Wallis-Test für nicht-normalverteilte Daten prüft die Nullhypothese: k Stichproben entstammen derselben Grundgesamtheit. Für die höchste (0,5 Gesamt-NOEC) der 4 Konzentrationen ergab der Test statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), die Nullhypothese wurde abgelehnt, die Werte entstammten nicht derselben Grundgesamtheit.

Abb. 16 stellt die gentoxischen Kombinationswirkungen aus Abb. 15 als NOEC je Komponente der Substanzgemische dar.

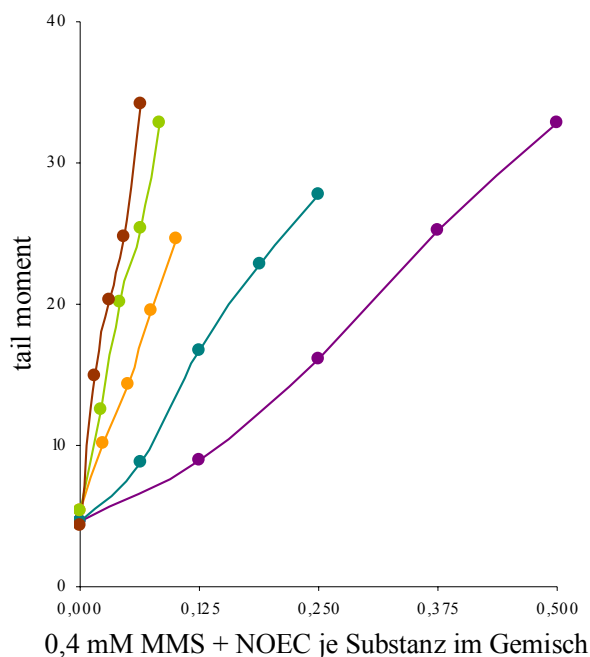


Abb. 16 Gentoxische Wirkung von 0,4 mM MMS in Kombination mit steigenden Konzentrationen von (●) 1 Substanz (PCP) (●) 2 Substanzen (PCP und Methanol) (●) 5 Substanzen (PCP, 2,4 D, 4-Chloranilin, 2,4,6 TCP und Glyphosat) (●) 6 Substanzen (PCP, 2,4 D, 4-Chloranilin, 2,4,6 TCP, Glyphosat und m-Xylol) (●) 8 Substanzen (PCP, 2,4 D, 4-Chloranilin, 2,4,6 TCP, Glyphosat, m-Xylol, 1-Hexanol und Methanol) nach 1-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen auf menschliche Fibroblasten. Die Grafik setzt sich aus 3 unabhängigen Versuchen zusammen. Gezeigt sind die NOEC-Werte je Komponente und die Mediane der tail moments. Die Konfidenzintervalle sind zu Gunsten der Übersichtlichkeit nicht gezeigt und sind analog zu denen in Abb. 13.

Anhand der Darstellung der jeweiligen Substanzgemische in Abhängigkeit von der Anzahl der Komponenten wird deutlich, dass die gentoxische Wirkung pro Komponente mit der Anzahl der Komponenten im Gemisch zunahm. Je mehr Substanzen das Gemisch umfasste, desto geringer war die für einen bestimmten Schaden (z. B. 20 tail moment) erforderliche Konzentration der jeweiligen Einzelsubstanz.

Es wurde geprüft, ob die Werte einer Konzentration für die in Abb. 16 gezeigten Kurven derselben Grundgesamtheit entstammten. Der Kruskal-Wallis-Test für nicht-normalverteilte Daten prüft die Nullhypothese: k Stichproben entstammen derselben Grundgesamtheit. Für die Kombination von MMS mit 1, 3 und 5 Chemikalien ergab

der Test statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), die Nullhypothese wurde abgelehnt, die Werte entstammten nicht derselben Grundgesamtheit. Für die Kombination von MMS mit 6 und 8 Chemikalien ergab der Test keine statistisch signifikante Unterschiede ($p > 0,05$), die Nullhypothese wurde beibehalten, die Werte entstammten derselben Grundgesamtheit. Dies bedeutet, dass die Unterscheidbarkeit der Kurven mit der Zunahme an Komponenten abnimmt. Es muss hier allerdings berücksichtigt werden, dass die eingesetzten Konzentrationen der Einzelsubstanzen (für die Gemische aus 6 bzw. 8 Komponenten) sehr nahe beieinander lagen.

Die Auswertung sehr stark geschädigter DNA ist dann nicht mehr möglich, wenn der Zellkern sich vollständig vom Schweif gelöst hat. Solche nicht auswertbaren Kometen traten auch bei vergleichsweise kleinen Konzentrationen auf, bei denen der Median des tail moments in einem gut auswertbaren Bereich lag. Die Anzahl der nicht auswertbaren Zellkerne nahm mit ansteigender Schadstoffkonzentration zu. Die nicht auswertbaren Kerne sind exemplarisch in Abb. 17 für die Kombination 0,4 mM MMS und PCP in steigenden Konzentrationen gezeigt.

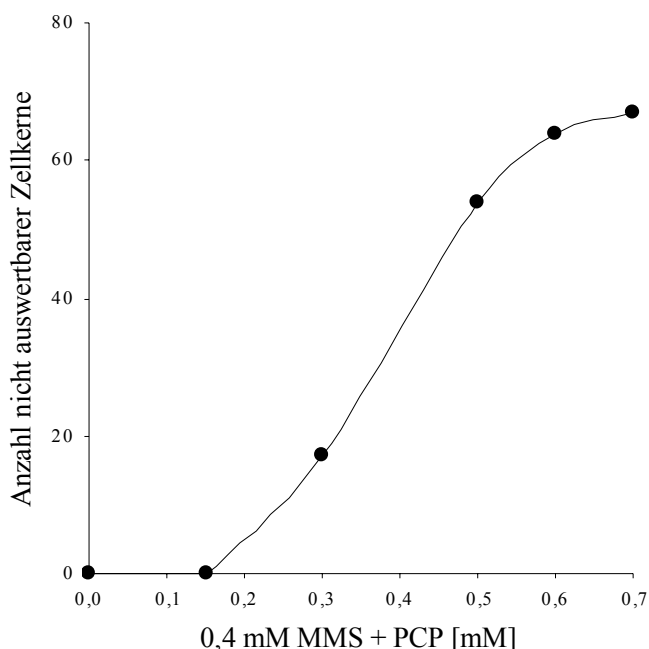


Abb. 17 Die Anzahl der nicht auswertbaren Zellkerne eines Versuchs der Kombination aus 0,4 mM MMS und PCP in ansteigenden Konzentrationen nach 1-stündiger Inkubation der Substanzen mit menschlichen Fibroblasten. Für 0,4 mM MMS allein wurde ein tail moment von 4,38 ermittelt.

PCP erhöhte die DNA-schädigende Wirkung von MMS in subtoxischen Konzentrationen synergistisch. Dies spiegelt die in Abb. 17 gezeigte Grafik der nicht auswertbaren Zellen für die Kombination aus MMS und PCP wider. Je höher die PCP-Konzentration war, desto größer war die Anzahl der nicht auswertbaren Zellen. Die Kurve zeigt einen Sättigungscharakter.

3.4.2. Induktion von Mutationen im HPRT-Mutagenitätstest

Im HPRT-Mutagenitätstest mit der Zelllinie V79 wurde untersucht, ob die zytotoxische Substanz PCP und das Kanzerogen MMS jeweils allein und Kombinationen aus beiden Substanzen Mutationen verursachen. Die Konzentrationen der Testsubstanzen wurden so gewählt, dass die höchsten eingesetzten Konzentrationen eine Überlebensrate von ca. 20 % ermöglichten [OECD RL 476, 1997].

Die Ergebnisse dieser Untersuchung stellen Abb. 18 und Tab. 6 dar.

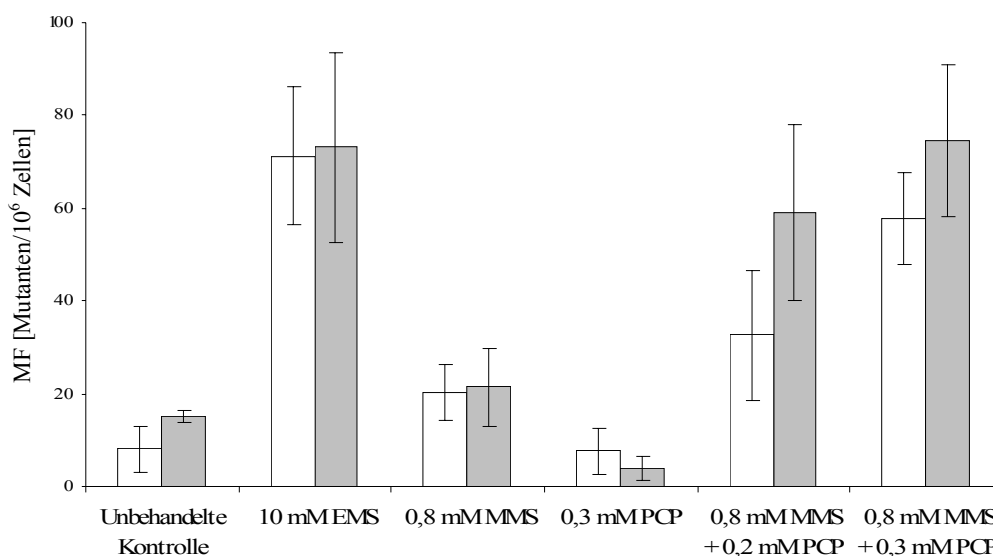


Abb. 18 Mutantenfrequenz (MF) von V79 Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit 0,3 mM PCP und 0,8 mM MMS allein sowie mit 0,2 bzw. 0,3 mM PCP in Kombination mit 0,8 mM MMS. (□) gibt die MF nach 7 und (■) nach 11 Tagen Expressionszeit an. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit SFM inkubiert, die Positivkontrolle mit 10 mM EMS. Dargestellt ist die Mutantenfrequenz (MF), die die Anzahl der Mutanten/10⁶ Zellen widerspiegelt. Der Fehler wurde als Fehlerfortpflanzung der Standardabweichung angegeben.

Tab. 6 Mutagenität von MMS und PCP allein und in Kombination der beiden Substanzen. HPRT-Mutationen in V79 Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit 0,3 mM PCP und 0,8 mM MMS allein sowie mit 0,2 bzw. 0,3 mM PCP in Kombination mit 0,8 mM MMS nach 7 bzw. 11 Tagen Expressionszeit. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit SFM inkubiert, die Positiv-Kontrolle mit 10 mM EMS. Angegeben ist die Mutagenfrequenz (MF), die die Anzahl der Mutanten/10⁶ Zellen widerspiegelt. Zusätzlich wurde in der 1. Spalte die durch die Begiftung erzeugte Toxizität (Verminderung der KBF) aufgeführt.

	7 Tage Expressionszeit					11 Tage Expressionszeit				
	Toxizität durch Begiftung (KBF) [%]	Mutanten / Petrischale	KBF [Anzahl Kolonien]	MF + FF* [%] [Mutanten/10 ⁶ Zellen]	Mutanten/ Petrischale	KBF [Anzahl Kolonien]	MF + FF* [%] [Mutanten/10 ⁶ Zellen]	Mutanten/ Petrischale	KBF [Anzahl Kolonien]	MF + FF* [%] [Mutanten/10 ⁶ Zellen]
Unbehandelte Kontrolle	100	8 ± 5	195 ± 16	8 ± 63%	15 ± 1	204 ± 7	15 ± 8%			
10 mM EMS	80	75 ± 15	197 ± 8	71 ± 21%	103 ± 28	287 ± 12	73 ± 28%			
0,8 mM MMS	51	17 ± 5	164 ± 7	20 ± 30%	18 ± 7	172 ± 16	21 ± 40%			
0,3 mM PCP	41	6 ± 4	154 ± 13	8 ± 67%	3 ± 2	159 ± 14	4 ± 67%			
0,8 mM MMS + 0,2 mM PCP	24	38 ± 16	227 ± 22	33 ± 43%	29 ± 9	100 ± 8	59 ± 32%			
0,8 mM MMS + 0,3 mM PCP	20	27 ± 1	91 ± 15	58 ± 17%	34 ± 7	93 ± 7	75 ± 22%			

* Der Fehler wurde als Fehlerfortpflanzung [FF] angegeben

Nach 7-tägiger Expressionszeit wurde für 0,8 mM MMS allein eine Erhöhung der Mutantenfrequenz (MF) von etwa 160 % im Vergleich zu den Spontanmutationen der unbehandelten Kontrolle festgestellt. Die MF von 0,3 mM PCP allein entsprach der der unbehandelten Kontrolle und hatte in dieser Konzentration somit wie erwartet keine mutagene Wirkung auf die Zellen. In der Kombination von 0,8 mM MMS mit 0,2 mM PCP bzw. 0,3 mM PCP wurde eine MF von 33 bzw. 58 Mutanten/10⁶ Zellen ermittelt. Nach Bradley *et al.* (1981) gilt im HPRT-Mutagenitätstest mit V79 Zellen eine Substanz oder Kombination aus Substanzen dann als mutagen, wenn die Spontanmutationsrate (Mutantenfrequenz der unbehandelten Kontrolle) um das Dreifache überschritten wird. Damit erwies sich die Kombination aus MMS und PCP für beide PCP-Konzentrationen als mutagen, während die eingesetzte MMS-Konzentration allein die Mutagenitätsgrenze knapp nicht erreichte. Vergleicht man, unter Abzug der Spontanmutationsrate, die Mutantenfrequenz von MMS allein mit der der Kombinationen, so bewirkte PCP eine Verdopplung (0,2 mM PCP) bzw. eine Vervierfachung (0,3 mM PCP) der Mutagenität von MMS.

Nach 11-tägiger Expressionszeit entsprach die MF für 0,8 mM MMS allein in etwa der nach 7-tägiger Expressionszeit. Die Spontanmutationen waren deutlich höher als die durch 0,3 mM PCP induzierte MF. Die Kombination aus 0,8 mM MMS und 0,2 mM PCP bzw. 0,3 mM PCP wies mit 59 bzw. 75 Mutanten/10⁶ Zellen ebenso wie nach 7-tägiger Expressionszeit eine mehr als dreifach höhere Mutantenzahl als die unbehandelte Kontrolle auf. Unter Abzug der Spontanmutationsrate erhöhte 0,2 mM PCP die Mutagenität von MMS um den Faktor 7 und 0,3 mM PCP um den Faktor 10.

4. Diskussion

In diesem Forschungsvorhaben wurden toxische Kombinationswirkungen von unspezifisch wirksamen Chemikalien (Narkotika), die den größten Anteil der Umweltchemikalien darstellen, untersucht. Als Ursache für die Toxizität von narkotisch wirkenden Chemikalien werden Membranschädigungen diskutiert, wobei Wechselwirkungen zwischen diesen Chemikalien und den Lipiden der bilayer-Membranen zu Desorientierungen und damit zu Funktionsverlusten in den Membranen führen [Cascorbi und Forêt, 1991; van Wezel und Opperhuizen, 1995; Chaisuksant *et al.*, 1999]. Ein wichtiges Charakteristikum unspezifisch wirksamer Chemikalien ist ihre physikochemische Eigenschaft der Lipophilität, die mit ihrer Toxizität korreliert [Halle, 1991; Saito *et al.*, 1993; Yu, 2001; Lin, 2003]. Nach Hansch und Leo (1979) ist der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P_{OW}$) einer der effektivsten Parameter zur Beurteilung der Toxizität einer einzelnen unspezifisch wirksamen Substanz.

Alle Experimente zur Zytotoxizität wurden anhand des hochsensitiven Endpunktes der Wachstumshemmung (gemessen im optimierten FDA-assay) an menschlichen Fibroblasten durchgeführt.

In den *in vitro* Untersuchungen wurde die Zytotoxizität der Substanzen in Dosis-Effekt-Kurven allein sowie in Gemischen aus 2 – 8 Komponenten ermittelt. Ausgangskonzentration für alle nachfolgenden Versuche zur Zytotoxizität war der NOEC (no observed effect concentration)-Wert der jeweiligen Substanz, definiert als die höchste getestete Konzentration, bei der die Toxizität einer Substanz noch nicht statistisch signifikant vom unbehandelten Kontrollwert abweicht [EPA, 1991; van Leeuwen und Hermens, 1995; van der Hoeven *et al.*, 1997]. Die Gentoxizität der Kombinationen aus unspezifisch wirksamen Chemikalien und der gentoxischen, kanzerogenen Substanz MMS wurde im comet-assay erfasst. Im HPRT-Mutagenitätstest wurden Folgen der synergistischen gentoxischen Kombinationen untersucht.

Nachfolgend werden die zytotoxischen Einzel- und Kombinationseffekte der unspezifisch wirksamen Chemikalien diskutiert. Daran schließt sich die Diskussion um die gentoxische Wirkung der zytotoxischen Substanzen in Kombination mit dem Kanzerogen MMS und um die Mutagenität des Gemisches aus PCP und MMS an.

4.1. Zytotoxische Wirkungen der Einzelsubstanzen

Um eine einheitliche Vergleichsebene für die 8 ausgewählten Umweltchemikalien mit unterschiedlicher Lipophilie zu haben, wurden zunächst die Konzentrationswirkungsbeziehungen der Einzelsubstanzen bestimmt und untersucht, ob es sich bei den eingesetzten Substanzen tatsächlich um unspezifisch wirksame Chemikalien handelt. Für die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen: Methanol, Glyphosat, 2,4 D, 1-Hexanol, 4-Chloranilin, m-Xylol, 2,4,6 TCP und PCP wurden zunächst Dosis-Effekt-Kurven zur Erstellung von Korrelationsgeraden angefertigt.

Zwischen den NOEC-Werten der Einzelsubstanzen und ihrem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten wurde eine statistisch relevante Korrelation nachgewiesen. Die Steigung der Regressionsgeraden betrug $-0,435$ bei $r = 0,97$ und gilt als Nachweis dafür, dass es sich bei den eingesetzten Testsubstanzen nach der allgemein gültigen Definition um „unspezifisch wirksame“ Umweltchemikalien handelte. Ähnliche Steigungen wurden auch von anderen Autoren, sowohl bei *in vivo* als auch bei *in vitro* Experimenten nachgewiesen [Könemann, 1981; Halle *et al.*, 1991; Witte *et al.*, 2000]. Ausgehend davon, dass es sich bei den verwendeten Substanzen um unspezifisch wirksame Chemikalien handelt, haben diese definitionsgemäß die gleichen Wirkmechanismen [Veith und Broderius, 1987] und den gleichen Wirkort [Könemann, 1980; Calamari und Vighi, 1992]. Ihre Toxizität wird auf ihr Anreicherungsverhalten in bilayer-Membranen [Lipnick, 1989; van Wezel *et al.*, 1996] oder auf ihre nicht-selektive Wechselwirkung mit Membranproteinen [Franks und Lieb, 1987; Pösch, 1993] zurückgeführt. Diese Interaktionen zwischen unspezifisch wirksamen Chemikalien und den Membranen führen zu Zellmembranschädigungen [Cascorbi und Forêt, 1991] und somit zu Funktionsverlusten der Membranen.

Die Bestimmung der NOEC-Werte war durch das Auftreten von Hormesis-Effekten erschwert. Für die Einzelsubstanzen wurden nach 1-stündiger Inkubation und 48-stündiger Re-Inkubationsphase charakteristische und reproduzierbare Dosis-Effekt-Kurven der jeweiligen Substanz ermittelt. Nach Williams (1977) wird der Schulterbereich einer Kurve bis zur NOEC mit D_q bezeichnet und der abfallende Teil mit D_o . D_q wird allgemein als ein Konzentrationsbereich betrachtet, in dem sich die Zellen innerhalb eines Zeitraums von der schädigenden Wirkung einer Testsubstanz

u. a. durch hohe Reparaturleistung [Williams, 1977] erholen können, was im toxischen Konzentrationsbereich (D_0 -Bereich) der Kurve aufgrund stetig ansteigender Schadstoffkonzentration nicht mehr gegeben ist [Elkind und Kano, 1959].

Für D_q kann festgestellt werden, dass die Kurvenverläufe der verschiedenen Einzelsubstanzen unterschiedlich sind. Bei einigen der getesteten Substanzen traten gelegentlich und nicht immer reproduzierbar Hormesis-Effekte (griech. *hormo*: arbeiten) auf. Diese wurden in der Toxikologie bis vor kurzem ignoriert und bei der toxikologischen Risikobewertung außer Acht gelassen [Calabrese and Baldwin, 2000, 2003; Hadley, 2003]. Hormesis-Effekte werden als „low dose stimulation“- und „high dose inhibition“-Phänomene beschrieben [Butler, 2004]. Dennoch gibt es unterschiedliche Kurvenverläufe der Hormesis-Effekte, die Calabrese und Baldwin (2003) und Hadley (2003) wie folgt definieren:

„The inverted U-shaped hormetic model“: Dieser Effekt beschreibt eine Stimulation einer ansonsten toxisch wirkenden Substanz im Niedrig-Dosis-Bereich. Allerdings gibt Hadley (2003) zu Bedenken, dass diese Wirkung nicht immer von Vorteil für den Organismus sein muss, denn Tumor-Suppressoren in Niedrig-Dosen können das Tumorstadium fördern oder geringe Dosierungen an Bakteriziden können das Koloniewachstum von Bakterien begünstigen.

„The J-shaped hormetic model“: Eine Dosis-Effekt-Kurve dieser Art beschreibt einen vorübergehenden Abfall mit nachfolgendem Anstieg bis zur NOEC der Substanz. Calabrese (2003) interpretiert diesen Effekt als Überkompensation durch Rezeptoren als Reaktion auf Stress während der Exposition mit einer Substanz.

In dieser Arbeit wurde für Methanol und 2,4 D immer ein „inverted U-shaped hormetic effect“ festgestellt, der bei 4-Chloranilin nur gelegentlich auftrat. Für m-Xylol und 2,4,6 TCP wurde häufig ein „J-shaped hormetic effect“ ermittelt. Die Dosis-Wirkungskurven von Glyphosat, 1-Hexanol und PCP wiesen keinen Hormesis-Effekt auf.

Die jeweiligen Hormesis-Effekte hatten auf die Berechnung von Kombinationseffekten keinen Einfluss, soweit sie nicht die Bestimmung des NOEC-Wertes erschwerten. Dies zeigte auch die gute Korrelation zwischen NOEC und der Lipophilie der

eingesetzten Chemikalien ($r = 0,97$; $p < 0,001$; $s = 0,16$), was per Definition die unspezifische Wirksamkeit der untersuchten Chemikalien belegt.

Für den toxischen Bereich der Dosis-Effekt-Kurven wurden unterschiedliche Kurvenverläufe ermittelt, die sich aufgrund ihrer Steigungen tendenziell in drei Gruppen bündeln lassen: Für Methanol, m-Xylol und 2,4,6 TCP wurde eine durchschnittliche Steigung von $m = -189,18$ und für 1-Hexanol, 4-Chloranilin und PCP eine durchschnittliche Steigung von $m = -76,65$ errechnet, beides im Einstichproben-*t*-Test von Kolmogorov-Smirnov nach Lilliefors statistisch signifikant ($\alpha < 0,05$). Die flachesten Kurven und damit die geringste Toxizität wurden für Glyphosat ($m = -46,49$) und 2,4 D ($m = -32,67$) ermittelt.

Die Steigung einer Kurve, die sich im D_0 -Wert widerspiegelt, ist ein Maß dafür, wie effektiv eine Substanz im toxischen Bereich wirkt, d. h. welche Konzentration benötigt wird, um einen bestimmten Effekt hervorzurufen (z. B. Herabsetzung des Wachstums von 90 % auf 50 %).

Auch die EC_{50} -Werte korrelierten gut mit der Lipophilität der Substanzen ($r = 0,98$; $p < 0,001$; $s = 0,14$). Zunächst erscheint verwunderlich, dass trotz unterschiedlicher Steigungen (D_0 -Werte) der Dosis-Effekt-Kurven für die EC_{50} -Werte eine ebenso gute Korrelation erzielt wurde wie für die NOEC-Werte. Dies ist dadurch zu erklären, dass zum einen der Konzentrationsunterschied zwischen NOEC und EC_{50} -Wert im Vergleich zur NOEC gering ist, zum anderen kommen unterschiedliche Steigungen durch die logarithmische Darstellung der Konzentration bei der Korrelation nicht so stark zum Tragen. In aller Regel werden in der Literatur Korrelationen für Lipophilität/Toxizität ausschließlich als Beleg der unspezifischen Wirksamkeit angegeben. Es wird jedoch nicht berücksichtigt, ob und wie die D_0 -Werte der einzelnen Chemikalien voneinander abweichen. Für alle unspezifisch wirksamen Substanzen, die definitionsgemäß ausschließlich interaktive Wechselwirkungen mit der Zellmembran eingehen, müssten jedoch die Steigungen der ermittelten Kurven gleich sein, weil sie denselben Wirkort und dieselbe Wirkungsweise besitzen [van Raaij, 2005; persönliche Mitteilung]. Es stellt sich hier die Frage, ob es überhaupt möglich ist, dass toxische Substanzen ausschließlich membranaktiv mit einheitlichem Wirkungsmechanismus oder einheitlicher Wirkungsweise agieren, so wie für Narkotika allgemein

angenommen wird [Schultz *et al.*, 1990; Verhaar, van Leeuwen und Hermens, 1992; Escher, 2002]. Sobald die Substanzen die Zellmembran überwunden haben, gibt es in der Zelle selbst vielfältige Interaktionsmöglichkeiten mit lipophilen Substanzen, die ein zweites target darstellen. Stark abfallende Kurven (z. B. für Methanol, m-Xylol und 2,4,6 TCP gemessen), bei denen die Steigung die toxische Potenz der Substanz widerspiegelt, weisen auf einen Einfluss eines zweiten toxischen Ereignisses in der Zelle hin, zusätzlich zur Membranschädigung. Unter diesen Umständen ist die Definition für „unspezifisch wirksame“ Chemikalien:

- Wirksamkeit ausschließlich auf Membranebene als einzigem target der Zelle
- Konzentrationsadditivität in Gemischen
- reversible Effekte

nur noch aufrecht zu erhalten, wenn ausschließlich der subtoxische Kurvenbereich bis zur NOEC (D_q) betrachtet wird und/oder zusätzliche Wirkorte und Wirkmechanismen eine völlig untergeordnete Rolle an der gesamten toxischen Wirkung der Substanzen einnehmen. Die Gleichheit der Steigungen wäre jedoch ebenfalls ein wichtiger Nachweis für die unspezifische Wirksamkeit von Chemikalien und sollte als Kriterium mit berücksichtigt werden.

4.2. Zytotoxische Kombinationseffekte

4.2.1. Kombinationseffekte in Abhängigkeit von der Konzentration

Es wurden die toxischen Kombinationswirkungen der unter 4.1 genannten Umweltchemikalien unterschiedlicher chemischer Substanzklassen in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanzen *in vitro* untersucht. Dabei wurden Kombinationen vom binären bis zum Gemisch aus 8 Komponenten erfasst. Zur besseren Beurteilung der Kombinationswirkungen der Gemische wurden innerhalb eines Versuchs (bei bis zu 5 Komponenten) neben der Kombinationskurve auch alle Einzelkurven erstellt. Dadurch, dass alle Daten in einem Versuch ermittelt wurden, konnte eine Minimierung der Fehler erreicht werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass alle Kombinationen auch unterhalb der Toxizitätsschwellen (NOEC-Werte) der sie enthaltenden Komponenten eine toxische Gesamtwirkung verursachten. Dies ist für unspezifisch wirksame Chemika-

lien und Gemische mit ähnlich wirkenden Schadstoffen bekannt [Jacobi *et al.*, 1995; Witte *et al.*, 2000], wenn es auch vereinzelt bestritten wird [z. B. Lin *et al.*, 2004]. So wird behauptet, dass das Gesetz der Additivität (zumindest *in vivo*) nur in toxischen Konzentrationen der Einzelsubstanzen Geltung hat [z. B. Pfeil, 2005]. Von der Theorie der Additivität und des Synergismus ist eine solche Begrenzung jedoch nicht ableitbar [z. B. Altenburger, 2005; Könemann und Pieters, 1996]. Gemische aus 2 Komponenten verstärkten die Toxizität der Einzelsubstanzen, und es zeigte sich, dass die Gemische deutlich toxischer waren als die jeweilige Substanz allein. Jacobi und Witte (1995) hatten im MTT-assay ähnliche Resultate erzielt: In menschlichen Fibroblasten wurden in subtoxischen Konzentrationen der Einzelkomponenten in Abhängigkeit von der Anzahl der Komponenten im Gemisch und deren Lipophilität additive bis synergistische Kombinationswirkungen gemessen.

Die Bewertung der aufgetretenen Kombinationseffekte erfolgte in Anlehnung an die Isobologramm-Methode [Berenbaum, 1985] durch Summation der Toxic Units (TU) [Nirmalakhandan *et al.*, 1997]. Es ergaben sich für die EC₃₀- bis EC₅₀-Werte für alle binären Substanzgemische synergistische Effekte. Die Kombination aus den stark hydrophilen Substanzen Methanol und Glyphosat wies höhere M-Werte auf als alle anderen Kombinationen, was auf eher additive Effekte schließen lässt. Beide Chemikalien stellen hydrophile Verbindungen dar, die in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt werden mussten, um zu einer zytotoxischen Wirkung zu gelangen. Für die EC₃₀- bis EC₅₀-Werte der Substanzgemische aus 3 – 8 Komponenten wurden durchweg synergistische Effekte nachgewiesen. Synergistische Kombinationseffekte werden zumeist für Gemische mit „unähnlicher Wirkung“ [Plackett und Hewlett, 1952; Chen *et al.*, 2002; Feron *et al.*, 2002] festgestellt oder für Stoffgemische in hohen Konzentrationen, deren Einzelsubstanzen verschiedene, spezifische Wirkorte und Wirkmechanismen haben [van Zorge, 1996].

Man geht davon aus, dass die Komponenten in einem Gemisch aus narkotisch wirkenden Chemikalien mit der Zellmembran als einzigem Wirkort konzentrationsadditiv [Groten, 2000; Chen und Lu, 2002; Dyer, 2002; Borgert *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004] sind, weil die Toxizität des Gemischs äquivalent zur Summe der Toxizität der Einzelkomponenten ist [Könemann 1980, 1981; Hermens 1989] und die definierten

Voraussetzungen für Additivität gegeben sind, nämlich gleicher Wirkort und gleiche Wirkmechanismen der Komponenten [Calamari und Vighi, 1992].

Jacobi *et al.* (1996) und Witte *et al.* (2000) zeigten u. a. anhand der Zytotoxizität, dass Kombinationseffekte von „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien positiv mit deren Lipophilität korrelieren und erklärten die zytotoxischen Kombinationswirkungen durch Membranschädigungen: Lipophile Xenobiotika akkumulieren in der Zellmembran und können schon in geringen Konzentrationen zu Störungen in der Membranstruktur und -funktion führen [Sandermann, 1993]. Dabei kommt es zu Veränderungen der Fluidität der bilayer-Membranen und zu Störungen der integralen Proteine hinsichtlich ihrer Lokalisation und Funktion [Antkowiak, 2001]. Cascorbi und Forêt (1991) zeigten, dass die lipophile Substanz PCP schon in kleinsten Konzentrationen die Zellmembran in menschlichen Fibroblasten schädigt: Die IC₂₀ (inhibitory concentration) für die Hemmung des Glukosetransports in die Zelle wurde nach 1-stündiger Inkubation mit PCP schon bei einer Konzentration von 13 µM erreicht, die IC₂₀ für die Na⁺/K⁺-ATPase-Hemmung mit 26 µM. In den vorliegenden Versuchen wurden erheblich höhere Konzentrationen an PCP (und anderer lipophiler Substanzen) eingesetzt, so dass sicher von einer Membranschädigung auszugehen ist. Die Folge einer Membranschädigung könnte in einer Herabsetzung der Barrierefunktion z. B. für Xenobiotika liegen.

Eine erniedrigte Barrierefunktion der Zellmembran durch lipophile Substanzen führt dazu, dass hydrophile Verbindungen mit geringer Membrangängigkeit die Membran passieren können [Jacobi und Witte, 1995]. Die synergistische Verstärkung der Kombinationen ist folglich durch interaktive Kombinationswirkungen aufgrund der unterschiedlichen Lipophilität der Komponenten zu erklären. Die lipophilen Moleküle fungieren durch ihre membranschädigende Wirkung als „Türöffner“ [Witte, 2000] für die hydrophilen Verbindungen, die im Zellinnern interaktiv mit intrazellulären Molekülen reagieren können. Mit dieser Hypothese wären wiederum die unterschiedlichen Steigungen (D₀-Werte) der Kombinationskurven zu erklären. Neben der Membran kämen auch verschiedene intrazelluläre targets für die einzelnen „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien in Frage und können so zu synergistischen Kombinationswirkungen beitragen. Mit diesem Befund

- unterschiedliche Steigungen im D₀-Bereich
- Aufnahme der Substanzen in die Zelle

- irreversible Schädigung der Zellen (s. Versuche zur Zeitabhängigkeit)
- ist der Begriff und das Konzept der unspezifischen Wirkungsweise von Narkotika und deren additiven Kombinationswirkungen anzuzweifeln. Witte und Jacobi wiesen schon 1995 darauf hin, dass durch die Anwendung des Konzepts der Konzentrationsadditivität das Risiko von „unspezifisch wirksamen“ Chemikaliengemischen insbesondere in untoxischen Einzelkonzentrationen möglicherweise beachtlich unterschätzt wird.

Je mehr Komponenten das Gemisch enthielt, umso geringer waren die erforderlichen Konzentrationen der einzelnen Komponenten, um einen bestimmten Effekt zu erzielen. Somit ist die Extrapolation der Kombinationseffekte von toxischen zu subtoxischen Konzentrationen für komplexe Gemische kaum möglich [Groten, 2000].

Die allgemein gültige Terminologie für toxische Wirkungen von Substanzgemischen – Additivität, Synergismus, Antagonismus – [Berenbaum, 1985] bilden die Grundlage für die Vorhersagekonzepte der Kombinationswirkungen. Die hier dargestellten synergistischen Wirkungen aller untersuchten Substanzgemische stellen Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen dar. Es muss angezweifelt werden, ob Untersuchungen zum Mechanismus von Kombinationswirkungen überhaupt *in vivo* möglich sind. Mikroorganismen bzw. ein ganzes Tier stellen ein komplexes System dar, in dem vielfältige Interaktionsmöglichkeiten (z. B. Metabolismus der Fremdstoffe, Aufnahmekinetiken, biologische Halbwertszeiten) möglich sind, die klare Aussagen zum Wirkmechanismus behindern oder überhaupt nicht möglich machen. Hinzu kommt, dass bei allen Untersuchungen von Kombinationswirkungen eine sehr große Probenzahl benötigt wird, die in *in vitro* Zellsystemen durchaus realisierbar ist. So können innerhalb kurzer Zeit viele Ergebnisse, ethisch völlig unbedenklich erarbeitet werden.

4.2.2. Kombinationseffekte in Abhängigkeit von der Zeit

Es wurden Experimente in Abhängigkeit von der Zeit durchgeführt, um Unterschiede zwischen Einzel- und Kombinationswirkungen zu beobachten. Hierzu wurde eine Einzelbegiftung mit 2,4 D durchgeführt, sowie eine Begiftung mit dem binären Gemisch 2,4 D, PCP und dem ternären Gemisch 2,4 D, PCP, 4-Chloranilin. Die Ergebnisse zeigen, dass bei gleicher Gesamtkonzentration der Umweltchemikalien eine

gleiche zeitabhängige Toxizität ermittelt wurde, unabhängig von der Anzahl der Komponenten im Gemisch. Mit zunehmender Inkubationszeit nahm die Toxizität der Substanzen auf die Zellen zu. So bewirkte eine 72-stündige Begiftungszeit einen stärkeren Effekt als eine 100fach höhere Konzentration nach einer Stunde Inkubation. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Extrapolation von akuter zu chronischer Exposition schwierig ist. Allerdings gibt es in Zellkulturexperimenten Ansätze, die Aussagen über Inkubationszeiten von bis zu sechs Wochen erlauben, die somit als „chronische Einwirkung“ gelten können [Clothier *et al.* (1997)]. Hierbei werden die Zellen unter Gifteinwirkung nach Erreichen der Konfluenz trypsiniert und unter gleicher Gifteinwirkung weiterkultiviert. So fanden Clothier *et al.* (1997) eine höhere Sensitivität von Mausfibroblasten-Kulturen (3T3) bei chronischer Begiftung in subtoxischen Konzentrationen verschiedener Substanzen, als dies bei der Messung der akuten Toxizität der Fall war. Gleichzeitig wurde der Verlust des exponentiellen Wachstums beobachtet, bei veränderter Zellmorphologie. Auch in dieser Arbeit wurde bei den Untersuchungen zur Inkubation der menschlichen Fibroblasten mit Testsubstanzen in Abhängigkeit von der Zeit (s. Abb. 12) ein verändertes Aussehen der Zellen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Zudem trat die Sättigung des Zellwachstums in Abhängigkeit von der toxischen Konzentration auf deutlich niedrigerem Niveau ein, als bei der unbehandelten Kontrolle.

Bislang liegen keine systematischen Untersuchungen über unspezifisch und spezifisch wirksame Chemikalien hinsichtlich ihrer Langzeitwirkung vor. Zwar gab es schon seit langem Versuche, Zusammenhänge zwischen Toxizität und Einwirkzeiten der Noxen zu erfassen, jedoch mündete dies nicht in einem einheitlichen Konzept. Insbesondere wurden Zusammenhänge zwischen Schadstoffkonzentration und Einwirkzeit untersucht. Die Verallgemeinerung von Haber (1924), dass die Toxizität das Produkt aus Konzentration und Zeit ($c \times t = \text{konstant}$) darstellt - wie auch weitere mathematische Ableitungen [Bliss, 1940; Druckrey *et al.*, 1967] - waren aufgrund sehr vieler Ausnahmen nicht haltbar [Rozman, 2000]. Auch bei den wenigen eigenen Untersuchungen lagen Abweichungen von Harbers $c \times t$ Produkt vor, wobei hier der Zeitfaktor unterbewertet war (z. B. Vergleich von 1/10 NOEC mit 1/100 NOEC). Ursache für die Abweichungen sind in der Toxikokinetik, sowie in der Expositionsfrequenz zu suchen [Rozman, 2000]. Die Validierung von Langzeitresultaten hinsichtlich der chronischen Toxizität von Chemikalien und Substanzgemischen sollte

daher einhergehen mit der Klärung deren komplexer Toxikokinetik [Scheers *et al.*, 2001; Zeliger, 2003]. Hier besteht dringender Forschungsbedarf.

4.3. Gentoxische Kombinationseffekte

Die „Türöffner“-Hypothese als Erklärung für synergistische Kombinationswirkungen von „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien wurde anhand der Mischung einer gentoxischen Substanz mit narkotisch wirkenden Chemikalien untersucht. Dazu wurde MMS als DNA-alkylierende, stark hydrophile ($\log P_{OW} = 0,66$) Substanz eingesetzt, die nur in geringem Maße von der Zelle aufgenommen werden sollte, worauf auch ihre vergleichsweise geringe Zytotoxizität (NOEC 2,5 mM) beruht. Mit der DNA-schädigenden Eigenschaft von MMS besteht ein zweites target für MMS mit einer messbaren Schädigung. Sollte die „Türöffner“-Hypothese zutreffen, so müsste hier eine verstärkende Wirkung auftreten.

Die „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien entstammten verschiedenen Stoffklassen und unterschieden sich hinsichtlich ihrer Struktur und Lipophilität. Im comet-assay wurde untersucht, ob das Kanzerogen MMS in seiner DNA-schädigenden Wirkung durch Gemische aus „unspezifisch wirksamen“, nicht gentoxisch wirkenden Chemikalien verstärkt werden kann. In den Kombinationsversuchen wurde eine Erhöhung der DNA-schädigenden Wirkung von MMS sowohl durch die lipophile Chemikalie PCP allein als auch durch die Gemische der „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien festgestellt. Die Chemikalien zeigten in den nicht zytotoxischen Konzentrationen allein weder als Einzelsubstanzen noch in den entsprechenden Kombinationen vom binären bis zum Gemisch aus 8 Komponenten eine gentoxische Wirkung. Dies bedeutet, dass die im comet-assay ermittelten DNA-Schäden ein primäres Schadenseignis durch das Kanzerogen MMS darstellten und nicht auf die Zytotoxizität der „unspezifisch wirksamen“ Substanzen zurückzuführen waren [Witte *et al.*, 2000]. Damit muss nach Berenbaum (1985) in der vorliegenden Versuchsanordnung jede Erhöhung der DNA-schädigenden Wirkung als synergistisch bezeichnet werden, da die „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien selbst keine DNA-schädigende Wirkung besitzen.

Es zeigte sich, dass PCP in Konzentrationen unterhalb seiner zytotoxischen NOEC die DNA-schädigende Wirkung von MMS verstärkte, und zwar in seiner halben NOEC (350 μM) um 600 %. Folglich wird eine interaktive Wirkung der beiden Substanzen in der Zelle vermutet, die auf unterschiedlichen Wirkorten beruht. Als interaktive Wirkung kann auch eine Reaktion der beiden Substanzen untereinander angesehen werden. In diesem Falle müsste ein Reaktionsprodukt entstehen, das eine höhere toxische Wirkung hat als MMS allein. Diese Möglichkeit wurde bereits in der AG Witte überprüft. Dabei wurde an isolierter superhelikaler PM2 DNA die DNA-schädigende Wirkung von MMS allein und in Kombination mit PCP gemessen. Die durch MMS entstandenen AP-Stellen (apurinisch oder apyrimidinisch) wurden durch AP-Endonukleasen aus menschlichen Fibroblasten in Strangbrüche überführt. Es zeigte sich, dass die durch MMS induzierten Strangbrüche durch PCP in den in Zellkulturen eingesetzten Konzentrationen nicht erhöht, in höheren Konzentrationen sogar effektiv verringert wurden [Witte, unveröffentlicht]. Mit diesem Ergebnis kann ausgeschlossen werden, dass die synergistische Kombinationswirkung PCP/MMS aufgrund einer chemischen Reaktion zwischen den beiden Chemikalien zustande kam. Es kann weiterhin geschlossen werden, dass zelluläre Ursachen für den beobachteten Synergismus verantwortlich sind.

Cascorbi und Forêt (1991) zeigten, dass die lipophile Substanz PCP schon in kleinsten Konzentrationen die Zellmembran in menschlichen Fibroblasten schädigt. Im comet-assay wurden erheblich höhere Konzentrationen an PCP eingesetzt, so dass sicher von einer Membranschädigung auszugehen war. Somit könnte das hydrophile MMS die Zellmembran aufgrund der erniedrigten Barrierefunktion erleichtert passieren. Diese erhöhte Aufnahme von MMS in die Zelle würde die verstärkte DNA-Schädigung erklären, die sich in einem Anstieg des tail moments äußerte. Es ist davon auszugehen, dass zwischen MMS und PCP Wechselwirkungen auf Membranebene auftreten mit der Folge, dass Störungen in der Membran zu einer erhöhten Aufnahme von MMS und somit zu einer verstärkten DNA-Schädigung führen. In diesem Fall ist der synergistisch DNA-schädigende Effekt das Ergebnis einer durch PCP-bedingten Membranschädigung. Bestätigung dieser Hypothese zeigen die Arbeiten von Witte *et al.* (2000), die belegen, dass der synergistisch DNA-schädigende Effekt von MMS mit nicht gentoxisch wirkenden Chemikalien mit der Lipophilität

der nicht gentoxisch wirkenden Substanzen zunimmt. In dieser Arbeit wurden für alle Substanzgemische ($n \geq 2$) synergistische Effekte nachgewiesen.

Mit ansteigender Gesamtkonzentration der Komponenten im Gemisch stieg die DNA-Schädigung in den Kombinationen aus MMS und 1 – 8 „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien stetig an. Unabhängig von der Anzahl der Substanzen im Gemisch wurde bei derselben Gesamtkonzentration der Komponenten und konstanter MMS-Konzentration etwa die gleiche gentoxische Wirkung ermittelt. Schon die Konzentration von 0,125 Gesamt-NOEC führte in den Gemischen zu einer 2 – 3 fachen Verstärkung der DNA-schädigenden Wirkung von MMS. Die Gesamtkonzentration der Substanzen von 0,5 NOEC führte in den verschiedenen Kombinationen zu einem Verstärkungseffekt von 400 – 600 %. Im Gegensatz zu den binären Gemischen [Witte *et al.*, 1999, 2000] konnte keine $\log P_{OW}$ -abhängige Kombinationswirkung gemessen werden. Möglicherweise genügt ein lipophiler Partner im Gemisch.

Es wurden Histogramme zur prozentualen Verteilung der tail moments für die DNA-Schäden von MMS allein (s. Abb. 14) und in Kombination mit den „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien (Daten nicht gezeigt) angefertigt. Eine statistische Analyse der Verteilungen zeigte, dass die DNA-Schäden keiner Gauß'schen Normalverteilung folgten, wie schon in vorangegangenen Arbeiten für H_2O_2 festgestellt worden war [Schewe, 2002; Schmidt, 2003]. Die Voraussetzung für normalverteilte Daten ist, dass die Verteilung lediglich von einem Parameter abhängig ist. Schmidt (2003) führte die Nicht-Normalverteilung darauf zurück, dass es im comet-assay zu einer Überlagerung von zwei Ereignissen kam, nämlich der Schadens- und der Reparaturkinetik. Im alkalischen comet-assay werden sowohl direkte Schäden erfasst als auch durch Reparatur bedingte zusätzliche DNA-Schäden, z. B. Inzisionen, hervorgerufen durch Endonukleasen. Für jede Schadstoffkonzentration entstand ein individuelles Verteilungsmuster der tail moments, wobei keines der Histogramme einer Normalverteilung folgte. Eine Annäherung des Verteilungsmusters der DNA-Schäden an eine Gauß'sche Normalverteilung war in sehr hohen Schadstoffkonzentrationen der Kombinationen mit einem großen tail moment festzustellen. Möglicherweise ist hier der Anteil an Reparatur-bedingten Inzisionen so gering, dass er am gemessenen tail moment nur einen sehr geringen Anteil hatte.

4.4. HPRT-Mutagenitätstest

Einige MMS-bedingte DNA-Schäden (insbesondere O⁶-Methylguanin) wirken mutagen, so dass aufgrund eines durch die Kombinationen erhöhten DNA-Schadens mit einer erhöhten Mutantenfrequenz gerechnet werden muss. Im HPRT-Mutagenitätstest verstärkte das in weniger als ihrer halben NOEC eingesetzte PCP (200 µM – 300 µM) die Mutagenität des Kanzerogens MMS, das in einer gering genotoxischen Konzentrationen von 0,5 mM eingesetzt wurde, signifikant. Die Konzentrationen entsprachen in etwa denen, die auch im comet-assay eingesetzt wurden. MMS erzeugte hierbei nur eine minimale Wirkung (etwa 5 tail moment), die durch 0,5 NOEC PCP um den Faktor 10 verstärkt wurde (s. Abb. 18). Dieser Verstärkungsfaktor wurde auch im HPRT-Test nach 11-tägiger Expressionszeit erreicht.

Mutagen wirkende Substanzen stellen in der Regel Kanzerogene dar. Kanzerogene werden prinzipiell anders bewertet als nicht kanzerogene toxische Stoffe. So existieren für sie z. B. keine unwirksamen Konzentrationen. Das Gefährdungspotenzial von „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien wird als gering eingeschätzt. Wenn aber „unspezifisch wirksame“ Chemikalien die mutagene Wirkung von Kanzerogenen - wie hier für MMS gezeigt - erhöhen, und damit möglicherweise deren Kanzerogenität erhöhen, so ist dies von entscheidender Bedeutung. Nicht nur Kanzerogene müssen in der Kombination als stärker wirksam eingestuft werden. Unspezifische Wirkungen von Chemikalien verwandeln sich in der Kombination mit Kanzerogenen in spezifische Wirkungen und müssen somit in einer Risikobetrachtung anders eingestuft werden.

4.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Folgenden wird ein Überblick über Schlussfolgerungen aus den erzielten Ergebnissen gegeben, sowie den daraus resultierenden Forschungsbedarf.

- Es erscheint im Sinne der Risikobetrachtung weniger sinnvoll, in aufwändigen Untersuchungen zu bestimmen, ob Komponenten in einem Gemisch additiv oder synergistisch wirken. Von entscheidender Bedeutung ist jedoch, dass in subtoxischen Konzentrationen der Einzelsubstanzen eine Gesamtoxizität auftritt, die von der Anzahl der Komponenten im Gemisch abhängt. Dies bedeutet,

dass, die Anzahl von Chemikalien, denen der Mensch sich und seine Umwelt aussetzt, soweit wie möglich reduziert werden sollte (z. B. Pestizide, Zusatzstoffe in Nahrungsmitteln).

- Bislang wurden Kombinationswirkungen aus nicht gentoxischen und gentoxischen Substanzen nur dann wissenschaftlich geprüft, wenn der Verdacht auf interaktive Wechselwirkungen bestand (Beyersmann, 2002; Waisberg *et al.*, 2003). Den Kombinationen aus Kanzerogenen/Narkotika wurde bislang kaum eine Bedeutung beigemessen. Für Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Kombination mit „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien wurden synergistische Kombinationswirkungen gezeigt, und zwar sowohl für binäre Gemische (Lüken *et al.*, 2000) als auch für Gemische aus bis zu 5 Komponenten (Stratis, 2002). Die Verstärkungseffekte waren hier noch weitaus stärker als für MMS/nicht gentoxisch wirkende Substanzen. Auch für das mutagene Tetrachlorhydrochinon (TCHQ) wurden in Kombination mit nicht gentoxisch wirkenden Substanzen synergistische Wirkungen gemessen (Witte *et al.*, 2000). Die Kombinationseffekte mit dem hydrophilen Mutagen 4-Nitrochinolin-1-oxid (4-NQO) zeigten hingegen keine deutlichen, einheitlichen Effekte (Witte *et al.*, 2000). Möglicherweise spielt hier der intrazelluläre Metabolismus des DNA-schädigenden Agens eine Rolle. Prinzipiell besteht Forschungsbedarf, Kombinationswirkungen von Gemischen aus spezifisch wirkenden und unspezifisch wirkenden Komponenten aufzuklären.
- Die Überprüfung der Definition und der Mechanismen der unspezifischen Wirksamkeit erscheint notwendig. Insbesondere müssen folgende Fragen geklärt werden:
 - Was bedeutet die den Narkotika zugeschriebene Eigenschaft der „reversiblen Wirkung“? Da jede Substanz letal wirken kann, muss sich die reversible Wirkung auf einen gering toxischen Bereich beschränken.
 - Was besagt es, dass der einzige Wirkort von „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien die Membran darstellt? Da ausschließlich die Membran den Wirk-ort für „unspezifisch wirksame“ Chemikalien bezeichnet, dürften diese Chemikalien nicht ins Zytoplasma gelangen. Möglicherweise gilt auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit.

- Eine weitere Überprüfung der D₀-Werte von „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien im Zellexperiment scheint unumgänglich zu sein. Sollten hier Unterschiede auftreten, so bedeutet auch dies, dass die unspezifische Wirksamkeit für toxische Konzentrationsbereiche nicht gültig ist.

- Vermehrte Untersuchungen zur Toxizität von Gemischen in zeitabhängigen Langzeitversuchen mittels Zellkulturmethoden sind unerlässlich. Hierzu ist die konsequente Weiterentwicklung und Etablierung tierversuchsfreier Testmethoden erforderlich, vor dem Hintergrund der „Validation Management Group – Non-Animal Assays“ (VMG-NA) bei der OECD mit der Einschätzung, dass eine dringende Notwendigkeit besteht, relativ kostengünstige und schnelle *in vitro* Testmethoden zur Prüfung von Chemikalien zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Es wurden zyto- und gentoxische Kombinationswirkungen von Gemischen aus 2 – 8 unspezifisch wirksamen Chemikalien (Narkotika) und die Kombination von unspezifisch wirksamen Chemikalien mit dem Kanzerogen Methansulfonsäuremethylester (MMS) *in vitro* in humanen dermalen Fibroblasten untersucht. Als zytotoxischer Endpunkt wurde der sensitive Parameter der Wachstumshemmung festgelegt, ermittelt im FDA-assay. Als gentoxischer Endpunkt wurde die DNA-Schädigung mit Hilfe des comet-assays (single cell gel electrophoresis) gemessen. Abschließend wurden die Mutationsraten von Gemischen aus MMS und Pentachlorphenol (PCP) mit Hilfe des HPRT-Mutagenitätstests in V79 Zellen (permanente Hamsterlungenzellen) ermittelt.

Die Ausgangshypothese dieser Arbeit war, dass lipophile unspezifisch wirksame Chemikalien Membranveränderungen hervorrufen, die eine erleichterte Aufnahme von hydrophilen Substanzen in die Zelle ermöglichen und somit deren toxische Wirkung verstärken. Als Charakteristikum für unspezifisch wirksame Chemikalien gilt die Korrelation zwischen der Lipophilität der Chemikalien und ihrer Zytotoxizität.

Für die eingesetzten Chemikalien (Pentachlorphenol (PCP), 2,4,6 Trichlorphenol (TCP), m-Xylol, 4-Chloranilin, 1-Hexanol, 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D), Glyphosat und Methanol) wurde eine gute Korrelation zwischen ihrer Toxizität mit ihrer Lipophilität, sowohl für die NOEC-Werte ($r = 0,97$; $p < 0,001$; $s = 0,16$) als auch für die EC_{50} -Werte ($r = 0,98$; $p < 0,001$; $s = 0,14$), festgestellt.

Substanzgemische aus unspezifisch wirksamen Chemikalien, deren einzelne Komponenten in subtoxischen Konzentrationen eingesetzt wurden, verursachten zytotoxische Kombinationswirkungen. Die Toxizität der Gemische war identisch, wenn die Summe der effektiven Konzentrationen aller Komponenten im Gemisch gleich war. Dies bedeutet, je komplexer das Gemisch war, desto geringere Konzentrationen der einzelnen Komponenten waren erforderlich, um denselben Effekt zu erreichen.

Für alle Gemische aus bis zu 8 Komponenten wurden synergistische Effekte nachgewiesen. Lediglich die Kombination aus den stark hydrophilen Substanzen Metha-

nol und Glyphosat wies etwas höhere M-Werte auf, was auf eher additive Effekte schließen lässt. Dies Ergebnis widerspricht der allgemeinen Vorstellung, dass unspezifisch wirksame Chemikalien additiv wirken. Es wurde die Definition und Wirkung von unspezifisch wirksamen Chemikalien hinterfragt.

Die Toxizität der Gemische nahm mit der Zeit zu. Es wurden für eine 72-stündige Inkubationszeit weniger als 1/100 der Konzentrationen benötigt, die nach 1-stündiger Inkubation, mit nachfolgender 24-stündiger Schadstoff-freier Wachstumsphase, vergleichbare wachstumshemmende Effekte hervorriefen. Dies galt sowohl für die gemessenen Einzelsubstanzen als auch für das binäre und das ternäre Gemisch. Die für die 1-stündige Inkubation ermittelten NOEC-Werte führten nach 72-stündiger Inkubation nicht nur zu keinem Wachstum, sondern zu einem totalen Vitalitätsverlust.

Alle im Zytotoxizitätstest eingesetzten Chemikaliengemische, die selbst nicht genotoxisch waren, verstärkten die DNA-schädigende Wirkung des Kanzerogens MMS um den Faktor 4 – 6. Je mehr Komponenten das Gemisch umfasste, desto geringer war die Konzentration jeder einzelnen Komponente, um einen bestimmten genotoxischen Effekt zu erzielen (z. B. 25 tail moment).

Im HPRT-Mutagenitätstest verstärkte PCP in subtoxischen Konzentrationen die mutagene Wirkung des Kanzerogens MMS bis zu Faktor 10.

Die erzielten Ergebnisse zu zyto- und genotoxischen Kombinationswirkungen stimmen mit der Ausgangshypothese überein, dass interaktive Wechselwirkungen von „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien eine erhöhte Aufnahme von hydrophilen Substanzen in die Zelle zur Folge haben. Vor diesem Hintergrund müssen Gemische, die neben „unspezifisch wirksamen“ Chemikalien eine (hydrophile) genotoxische Verbindung enthalten, neu bewertet werden.

Summary

Cyto- und genotoxische Kombinationseffekte von Mischungen aus 2 bis 8 nicht-spezifisch wirkenden Chemikalien (Narcotika) wurden in Kombination mit dem Karzinogen Methylmethansulfonat (MMS) in Human-dermalen Fibroblasten untersucht. Die Wachstumsinhibition wurde durch den FDA-Assay als empfindliches zytotoxisches Endpunkt bestimmt. Genotoxizität wurde durch die Single-Cell-Gel-Elektrophorese, auch bekannt als "Comet Assay", gemessen. Die Mutagenität von MMS allein und in Kombination mit einem nicht-spezifisch wirkenden Chemikalien wurde mit dem HPRT-Assay in V79-Zellen (Chinesische Hamsterzellen) getestet.

Die Hypothese dieser Arbeit geht davon aus, dass lipophile nicht-spezifisch wirkende Chemikalien zu Verzerrungen innerhalb der Zellmembran führen, die eine erhöhte Aufnahme von hydrophilen Substanzen in die Zelle ermöglichen, was deren toxisches Potenzial verstärkt. Nicht-spezifisch wirkende Chemikalien sind durch die Korrelation von Lipophilie und Toxizität charakterisiert.

Eine gute Korrelation von Lipophilie und Toxizität wurde für die Chemikalien (Pentachlorophenol (PCP), 2,4,6-Trichlorophenol (TCP), m-Xylol, 4-Chloroanilin, 1-Hexanol, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), Glyphosat und Methanol) in der Studie festgestellt. Dies war für die NOEC (No Observed Effect Concentration) Werte ($r = 0,97$; $p < 0,001$; $s = 0,16$) sowie für die IC₅₀ (inhibitorische Konzentration) Werte ($r = 0,98$; $p < 0,001$; $s = 0,14$) der Fall.

Mischungen aus nicht-spezifisch wirkenden Chemikalien, die jeweils in nicht-toxischen Konzentrationen vorliegen, verursachen zytotoxische Kombinationseffekte. Die Toxizitäten der Mischungen waren identisch, wenn die Summe der einzelnen effektiven Konzentrationen aller Komponenten innerhalb der Mischung gleich war. Dies bedeutet, dass je komplexer eine Mischung ist, desto niedriger ist die benötigte Konzentration jedes einzelnen Agens, um denselben toxischen Effekt zu erzielen.

Für alle Mischungen (mit bis zu 8 Komponenten) wurden synergistische Effekte beobachtet. Eine Ausnahme bildete die Kombination der stark hydrophilen Substanzen Methanol und Glyphosat, die etwas höhere M-Werte zeigten, was auf einen additiven Effekt hindeutet.

This result contradicts the common notion that mixtures of non specific acting chemicals exert additive effects. It shows, that this phenomenon is rather the exception (for strongly hydrophilic substances) than the rule.

The toxicity of the compounds increased with the time of incubation. Less than 1/100th of the concentrations of a one hour incubation were needed in a 72 hour incubation to produce a comparable growth inhibiting effect. Noec values (after a one hour incubation) of single substances, binary, or ternary mixtures, resulted in a total inhibition of growth and vitality loss after a 72 hour incubation.

All non genotoxic chemicals used in the cytotoxicity tests enhanced the DNA damaging effect of the carcinogen MMS by a factor of 4 to 6. The more components the mixture was comprised of, the lower the concentrations of each single component was necessary to provoke the same genotoxic effect, here measured as “tail moment” in the comet assay.

In the HPRT mutation-test PCP amplified the mutagenic effect of the carcinogenic MMS in subtoxic concentrations up to a factor of 10.

The presented results on cyto- and genotoxic combination effects confirm the original hypothesis that non specific acting chemicals cause an increased uptake of hydrophilic substances into the cell. Against this background, mixtures containing non specific acting chemicals and additionally a (hydrophilic) genotoxic substance have to be reappraised.

6. Literatur

Abernethy S G, Mackay D, and McCarty L S (1988): "Volume Fraction" correlation for narcosis in aquatic organisms: The key role of partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. **7**, 469 – 481

Altenburger R (2005): Mehrfachrückstände von Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln. Teil II: Mehrfachrückstände aus Sicht unterschiedlicher Interessengruppen. Vortrag: „Darstellung der Situation aus Sicht der NGOs“. Zweites BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung)-Forum Verbraucherschutz (9. – 10.11.2005)

Altenburger R, Nendza M and Schüürmann G (2003): Mixture Toxicity and its Modeling by Quantitative Structure-Activity Relationship. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. **22**, No. 8, pp. 1900 – 1915

Altshuler K B, Hodes C S, Essigmann J M (1996): Intrachromosomal probes for mutagenesis by alkylated DNA bases replicated in mammalian cells: a comparison of the mutagenicities of O⁴-methylthymine and O⁶-methylguanine in cells with different DNA repair backgrounds. *Chemical Research in Toxicology*, Vol. **9** (6), 980 - 987

Antkowiak B (2001): How do anaesthetics work? *Naturwissenschaften* 88: 201 - 213

Aujard C and Trinca G (1985): The effect of MNNG on KB cells. Cell sensitivity to lethal effect of the drug as a function of the cell age and of the nature of the culture medium. *Chemical – Biological Interactions*, Vol. **54**, 349 – 361

Axelrod D, Davis D L, Hajek R A, Jones L A (2001): It's Time to Rethink Dose: The Case of Combining Cancer and Birth and Developmental Defects. *Environmental Health Perspectives*, Vol. **109**, 6

Barrett J C (1993): Mechanisms of multistep carcinogenesis and risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, Vol. **100**, 9 - 20

Bayreuther K, Rodemann H P, Hommel R, Dittmann K, Albiez M and Francz I (1988): Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Vol. **85**, 5112 – 5116

Berenbaum M C (1985): The expected effect of combination of agents: A general solution. In: Journal of Theoretical Biology, Vol. **114**, 413 - 431

Berg K, Hansen M B, Nielsen S E (1990): A new sensitive bioassay for precise quantification of interferon activity as measured via the mitochondrial dehydrogenase function in cells (MTT-method). APMIS **98** (2): 156 – 162

Beyersmann D (2002): Effects of carcinogenic metals on gene expression. Toxicology Letters, Vol. **127** (1-3): 63-8

Bliss C I (1939): The toxicology of poisons applied jointly. Annuals of Applied Biology, 26, 585 – 615

Bliss C I (1940): The relationship between exposure, time, concentration and toxicity in experiments on insecticides. Annuals of the Entomologic Society of Amerika, 33, 721 - 766

Boerrigter M E, Mullaart E, Berends F, Vijg J (1991): Induction and disappearance of DNA strand breaks and/or alkali-labile sites in human lymphocytes exposed to N-ethyl-N-nitrosourea. Carcinogenesis, Vol. **12** (1), 77- 82

Bohrenfreund E, Babich H and Martin-Alguach N (1988): Comparisation of two *in vitro* cytotoxicity assays – the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. Toxicology *In Vitro*, Vol. **2** (1), 1 – 6

Borgert C J, Quill T F, McCarty L S, Mason A M (2004): Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? Toxicology and Applied Pharmacology, Vol. **201** (2): 85 - 96

Bradley M O, Bhuyan B, Francis M C, Langenbach R, Peterson A and Hubermann E (1981): Mutagenesis by chemical agents in V-79 chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. *Mutation Research*, Vol. **87** (2), 81 – 142

BUND (2006): Hintergrundpapier von BUND (Bund für Umwelt- und Naturschutz Deutschland) und DNR (Deutscher Naturschutzring) zur Reform der EU-Chemikalienpolitik. „Chemikalien und die menschliche Gesundheit“. Im Internet eingesehen am 28.01.2006

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) (2004): REACH. Magazin für eine moderne Chemie. Referat Öffentlichkeitsarbeit, Berlin

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) (2006): REACH anpacken! – Neues Chemikalienrecht sicher anwenden. Presse-Information 004/2006

Butler R (2004): Hormesis – Richard Butler explains the theory of horme. *Journal of the Society of Chemical Industry*, Vol. **3**, 10 – 11

Butte W (2005): Praktikumsskript „Physikalische Chemie 1“, Institut für reine und angewandte Chemie, Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg

Cairns jr C (1992): „The Threshold Problem in Ecotoxicology“, Vol. **1**, pp. 3 – 16

Calabrese E J and Baldwin L (2000): Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Human & Experimental Toxicology*, **19**, 2 - 31

Calabrese E J and Baldwin L (2003): Toxicology rethinks its central belief. *Nature* **421**, 691-692; doi: 10.1038/421691a

Calamari D, Vighi M (1992): A proposal to define quality objectives for aquatic life of mixtures of chemical substances. *Chemosphere* 25: 531 – 542

Carpenter D O, Arcaro K and Spink D C (2002): Understanding the Human Health Effects of Chemical Mixtures. Environmental Health Perspectives, Vol. **110**, Supplement 1, pp. 25 - 42

Carp S A, Kobel W, Doe J (2000): Health risk of low-dose pesticides mixtures: A Review of the 1985 – 1988 Literature on Combination Toxicology and Health Risk Assessment. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, Vol. **3**, 1 - 25

Cascorbi I und Forêt M (1991): Interactions of xenobiotics on the glucose transport system and Na⁺/K⁺-ATPase of human skin fibroblasts. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. **21**, 38-46

Cassee F R, Groten J P, van Bladeren P J and Feron V J (1998): Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. Critical Reviews in Toxicology, Vol. **28** (1), 73 - 101

Chaisuksant Y, Yu Q, Connell D W (1999): The internal critical level concept of nonspecific toxicity. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. **162**, 1 – 41

Chen Chung-Yuan, Lu Cheng-Liang (2002): An analysis of the combined effects of organic toxicants. The Science of the Total Environment 289, 123 – 132

Clothier R H, Beed M, Samson R and Ward R (1997): An *In Vitro* Approach to the Evaluation of Repeat Exposure in the Prediction of Toxicity. New *In Vitro* Models. Toxicology *In Vitro*, Vol. **11**, 679 - 682

Collins A R (2002): The comet assay. Principles, applications and limitations Methods in Molecular Biology, Vol. **203**, 163 - 177

Crouch S P M, Kozłowski R, Slater K J, Fletcher J (1993): The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. In Journal of Immunological Methods, Vol. **160**, 81- 88

Dierickx P J, Ekwall B (1992): Long-term cytotoxicity testing of the first twenty MEIC chemicals by determination of the protein content in human embryonic lung cells. *ATLA* 20, 285 – 289

Dierickx P J, Ekwall B (1993): Long-term cytotoxicity testing of the MEIC chemicals 21 – 50 by determination of the protein content in human embryonic lung cells. *AATEX* 2, 33 - 36

Ditsch N, Untch M, Wiegrebe W, Kurbacher C M, Langer E, Crohns C (2003): Bessere Erfolge durch individualisierte Chemotherapie. *Pharmazeutische Zeitung*, 20

Druckrey H R, Preussmann R, Ivankovic S, Schmähl D (1967): Organotrophe carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Zeitschrift für Krebsforschung*, 69, 103 - 201

Duez P, Dehon G, Kumps A and Dubois J (2003): Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis*, Vol. **18**, 2 pp. 159 – 166

Dyer R S (2002): Chemical mixtures and health effects at Superfund sites. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Vol. **205**, 149 – 153

Eisele Y (2002): Wasserstoffperoxid-induzierte DNA-Schäden in Abhängigkeit der Zellwachstumsphase und Zelldichte in menschlichen Fibroblasten. Leistungsnachweis, Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg

Ekwall B, Clemendson C, Crafoord B, Ekwall Ba, Hollander S, Walum E, Bondesson I (1998): MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part V. Rodent and human toxicity for the 50 referense chemicals. *ATLA* 26, 571 616

Ekwall B, Clemendson C, Ekwall Ba, Ring P, Romert L (1999): EDIT: a new multicenter to develop and evaluate batteries of *in vitro* tests for acute and chronic systemic toxicity. *ATLA* 27, 339 - 349

Elkind M M und Kano E (1959): X-ray damage and recovery in mammalian cells. *Nature*, 184: 1293 – 1295

EPA (US Environmental Protection Agency) (1986): Guidelines for Mutagenicity Risk Assessment. *Federal Register*, 51, No. 185, 34006-34012

EPA (US Environmental Protection Agency) (2002): Guidance on cumulative risk assessment of pesticide chemicals that have a common mechanism of toxicity. Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency, Washington, D. C.

Escher B I, Eggen R I, Schreiber U, Schreiber Z, Vye E, Wisner B, Schwarzenbach R P (2002): Baseline toxicity (narcosis) of organic chemicals determined by *in vitro* membrane potential measurements in energy-transducing membranes. *Environmental Science and Technology*, 36 (9): 1971 – 9

EU-Regulation (EC) No. 396/2005 of the European parliament and of the council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, *Official Journal of the European Union* L 70/1, 16.03.2005

European Inland Fisheries Advisory Committee (EIFAC) (1987): Revised Report on Combined Effects on Freshwater Fish and Other Aquatic Life of Mixtures of Toxicants in Water. EIFAC Technical Paper No. 37. FAO, Rome

Fairbairn D, Oliver P L und O'Neill K L (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, Vol. 339, 37 – 59

Feron V J, Groten J P (2002): Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food and Chemical Toxicology* 40, 825 - 839

Franks N P, Lieb W R (1987): What is the molecular nature of general anaesthetic target sites? *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 169 - 174

Geyer H, Politzki G, Freitag D (1984): Prediction of ecotoxicological behaviour of chemicals: relationship between n-octanol/water partition coefficient and bioaccumulation of organic chemicals by alga *Chlorella*. *Chemosphere* 13 (2), 269 - 284

Glatt H (1993): HPRT-Genmutationstest in V-79-Zellen des chinesischen Hamsters. In: **Fahrig R** (Hrsg.): Mutationsforschung und genetische Toxikologie, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 243 - 262

Goldenberg G J, Lyons R M, Lepp J A and Vanstone C L (1971): Sensitivity to nitrogen mustard as a function of transport activity and proliferative rate in L5178Y lymphoblasts. *Cancer Research*, Vol. 31, 1616 – 1619

Greenpeace e.V.: Krautter M (2005): Mehrfachrückstände von Pestiziden in Lebensmitteln – Zeit für Maßnahmen. Zweites BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung)-Forums Verbraucherschutz (9. – 10.11.2005): Mehrfachrückstände von Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln

Grimme H L, Altenburger R, Bödeker W, Faust M (1996): Kombinationswirkungen in der aquatischen Toxikologie. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 8 (3) 150 - 158

Groten J P (2000): Mixtures and interactions. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 38 (1 Supplement): 65 – 71

Haber F (1924): Zur Geschichte des Gaskrieges. In: Fünf Vorträge aus den Jahren 1920 – 1923. Verlag Julius Springer, Berlin, 77 - 92

Hadley C (2003): What doesn't kill you makes you stronger. *EMBO reports* 4, 10, 924 - 926

Halle W, Baeger I, Ekwall B, Spielmann H (1991): Correlation between *in vitro* cytotoxicity and octanol/water partition coefficient of 29 substances from the MEIC program. *ATLA* 19, 338 - 343

Hansch C, Leo A and Hoekman D (1995): Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. ACS Professional Reference Book. American Chemical Society

Hansen M B, Nielsen S E, Berg, K (1989): Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. In Journal of Immunological Methods, Vol. **119** (2): 203 – 210

Hartmann A, Speit G (1995): Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). Mutation Research, Vol. **346** (1), 49 - 56

Hartmann A, Speit G (1997): The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). Toxicology Letters, Vol. **90**, 183 – 188

Hermens J, Canton H, Janssen P, De Jong R (1984): Quantitative structure-activity relationships and toxicity studies of mixtures of chemicals with anaesthetic potency: acute lethal and sublethal toxicity to *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology 5: 143 – 154

Hertzberg R C, Macdonell M M (2002): Synergy and other ineffective mixture risk definitions. The Science of the Total Environment, 288 (1 – 2): 31 – 42

Hewitt R R, Harless J, Lloyd, 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

Hömme M, Jacobi H, Juhl-Strauss U, Witte I (2000): Synergistic DNA damaging effects of 4-nitroquinoline-1-oxide and non-effective concentrations of methyl methanesulfonate in human fibroblasts. Mutation Research 461, 211 - 219

Holz I (2003): Europa aktuell – Was verbirgt sich hinter REACH? Europa einfache.V., www.europa-digital.de

Hrdy J, Bartzatt, R (2004): Analysis of a homologous series of mono-alkylating methansulfonate antineoplastic agents utilizing pattern recognition techniques. Journal of Undergraduate Chemistry Research, Vol. **3** (3), P 107 – 114

Husøy T, Syversen T and Jenssen J (1993): Comparisation of four *in vitro* cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurement. Toxicology *In Vitro*, **7** (2), 149 – 154

Jacobi H und Witte I (1995): Additive und synergistische Kombinationswirkungen von Xenobiotika in subtoxischen Konzentrationen auf menschliche Fibroblasten. UWSF – Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie **7** (5) 256 – 260

Jacobi H, Leier G und Witte I (1996): Correlation of lipophilicity of xenobiotics with their synergistic effects on DNA synthesis in human fibroblasts. Chemosphere, Vol. **32** (7), 1251 - 1259

Kangas L, Grönroos M and Nieminen A L (1984): Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating agents in vitro. Medical Biology, Vol. **62**, 338 – 343

Kishida K and Otori T (1980): Quantitative study on the relationship between transcorneal permeability of drugs and their hydrophobicity. Japanese Journal of Ophthalmology, Vol. **24** (3), 251 - 259

Könemann H (1980): Structure-activity relationships and additivity in fish toxicities of environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. **4**: 415 – 421

Könemann H (1981): Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: A proposal for a quantitative approach and experimental results. Toxicology 19, (1981) 229 – 238

Kühn-Birett: Merkblätter Gefährliche Arbeitsstoffe. 46 erg. Lfg. 12/89

Kurbacher C M, Grecu O M, Stier U, Gilster T J, Janat M-M, Untch M, Konecny G, Bruckner H W, Cree I A (2003): ATP Chemosensitivity Testing in Ovarian and Breast Cancer: Early Clinical Trials. In: Recent Results in cancer Research, Vol. **161**, 221-230

Larsson R, Nygren P (1989): A rapid fluorometric method for semiautomated determination of cytotoxicity and cellular proliferation of human tumor cell lines in microculture. In Anticancer Research, Vol. **9** (4), 1111 – 1119

Lin Zhifen, Zhong Ping, Yin Kedong, Wang Liansheng, Yu Hongxia (2003): Quantification of joint effect for hydrogen bond and development of QSARs for predicting mixture toxicity. Chemosphere, Vol. **52**, 1199 - 1208

Lin Zhifen, Du Jianwei, Yin Kedong, Wang Liansheng, Yu Hongxia (2004): Mechanism of concentration addition toxicity: they are different for nonpolar narcotic chemicals, polar narcotic chemicals and reactive chemicals. Chemosphere, Vol. **54**, 1691 - 1701

Lipnick R L (1989): Narcosis, electrophile and proelectrophile toxicity mechanisms: application of SAR and QSAR. Environmental Toxicology and Chemistry, 8: 1 - 12

Loeb L A (1985): Apurinic Sites as Mutagenic Intermediates. Cell 40, 483 – 484

Loewe S (1953): The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneim.-Forsch./Drug. Res.*, 3, 285 – 290

Longnecker M P, Klebanoff M A, Zhou H, Brock J W (2001): Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestational-age babies at birth. *The Lancet*; 358 (9276), 110 - 4

Lovell DP, Thomas G, and Dunbow R (1999): Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet studies. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, Vol. **19**, 109 – 119

Lueken A, Juhl-Strauss U, Krieger G, Witte I (2004): Synergistic DNA damage by oxidative stress induced by H₂O₂ and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. *Toxicology Letters*, Vol. **147**, 35 - 43

McElroy W D (1951): Properties of the reaction utilizing adenosine triphosphate for bioluminescence. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. **191**: 547 – 557

Nabholz M, Miggiano V, Bodmer W (1966): Genetic analysis with human-mouse somatic cell hybrids. *Nature* **223**: 358 – 363

Naito S, Ono Y, Somiya I, Inoue S, Ito K, Yamamoto K und Kawanishi S (1994): Role of active oxygen species in DNA damage by pentachlorophenol metabolites. *Mutation Research*, **310**, 70 - 88

Neyman J (1950): *First Course in Probability and Statistics*. New York 1950, Chapter V: Elements of the Theory of Testing Statistical Hypotheses; Part 5.2.2

Nirmalakhandan N, Xu S, Trevizo C, Brennan R, Peace J (1997): Additivity in microbiol toxicity of nonuniform mixtures of organic chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. **37**, 97-102

OECD Guideline 476 for the testing of chemicals. *In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test*. Adopted: 21st July 1997

OECD Richtlinie 2004/73/EG der Kommission vom 29. April 2004 zur neunundzwanzigsten Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt (ABl. Nr. L 152 vom 30.04.2004 S. 1-314)

Östling O und Johanson K J (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. **123**, 291-298

Otte P F, Kijzen J G , Otte F A , Swartjes, F A and Versluijs C W (2001): Evaluation and revision of the CSOIL parameter set. RIVM report 711701021

Petty R D, Sutherland L A, Hunter, E M Cree I A (1995): Comparison of MTT and ATP-based Assays for the Measurement of Viable Cell Number. Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, Vol. **10**, 29 – 34

Pfeil R (2000): Mehrfachrückstände von Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln. Teil I: Darstellung der Problematik aus Sicht der Behörden. Vortrag: „Gesundheitliche Bewertung von Mehrfachrückständen“. Zweites BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung)-Forum Verbraucherschutz (9. – 10.11.2005)

Pösch G (1993): Combined effects of drugs and toxic agents. Modern evaluation in theory and practice. Springer, Wien, New York

Rippen (2000): Handbuch Umweltchemikalien, 50. Erg. Lfg. 3/2000

Robbins J H (1978): Significance of repair of human DNA: evidence from studies of Xeroderma pigmentosum. Journal of the National Cancer Institute, Vol. **61**: 645 - 655

Rosenkranz H S, Klopman G (1993): Structural evidence for a dichotomy in rodent carcinogenesis: Involvement of genetic and cellular toxicity. Mutation Research, Vol. **303**, 83 - 89

Rotman B and Papermaster B W (1966): Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. Biochemistry, Vol. **55**, 134 – 141

Rozman K K (2000): The role of time in toxicology or Haber's $c \times t$ product. Toxicology 149, 35 - 42

Sachs L (2003): Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Saito H, Koyasu J, Yoshida K, Shigeoka T, Koike S (1993): Cytotoxicity of 109 chemicals to goldfish GFS cells and relationships with 1-octanol/water partition coefficients. *Chemosphere*, Vol. **26** (5), 1015 – 1028

Sandermann H, jr. (1993): Induction of lipid-protein mismatch by xenobiotics with general membrane targets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Acta 1150, 130 - 133

Scheers E M, Ekwall Ba, Dierickx P J (2001): *In vitro* long-term cytotoxicity testing of 27 MEIC chemicals on Hep G2 cells and comparison with acute human toxicity data. *Toxicology in Vitro* 15, 153 - 161

Schmidt D (2003): Untersuchung zur Verteilung von Wasserstoffperoxid-induzierten Schäden in menschlichen Zellen. Diplomarbeit, Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg

Schultz T W, Arnold L M, Wilke T, Moulton M P (1990): Relationship of quantitative structure-activity for normal aliphatic alcohols. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. **19**: 243 – 253

Sharpe R M (2003): The ‘oestrogen hypothesis’ – where do we stand now? *International Journal of Andrology*; 26 (1): 2 – 15

Shrivastava R, John G W, Rispat G, Chevalier A and Massingham R (1991): Can the *In Vivo* Maximum Tolerated Dose be Predicted Using *In Vitro* Techniques? A Working Hypothesis. *ATLA* **19**, 393 - 402

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. *Experimental Cell Research*, Vol. **175**, 184-191

Slater T F, Sawyer B und Sträuli U (1963): Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Acta 77, 383-393

Stratis A (2002): Zyto- und gentoxische Kombinationswirkung von oxidativem Stress und komplexen Umweltchemikaliengemischen auf menschliche Fibroblasten. Diplomarbeit, Biologie, Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg

Tice R R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J and Sasaki Y F (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. **35**, 206 – 221

Tichý M, Borek-Dohalský V, Rucki M, Reitmajer J, Feltl L (2002): Risk assessment of mixtures: possibility of prediction of interaction between chemicals. International Archives of Occupational and Environmental Health, 75 (Suppl.): 133 – 136

Timchalk C (2004): Comparative inter-species pharmacokinetics of phenoxyacetat acid herbicides and related organic acids; Evidence that the dog is not a relevant species for evaluation of human health riskassessment. Toxicology **200** (1), 1 - 19

van der Hoeven N, Noppert F, Leopold A (1997): How to measure no effect. Part 1: Towards a new measure of chronic toxicity in ecotoxicology. Introduction and workshop results. Environmetrics 8: 241 - 248

van Leeuwen C J, Hermens J L M (eds.) (1995): Risk assessment of chemicals: an introduction. Kluwer, Dordrecht

van Raaij M T M [2005]: persönliche Mitteilung anlässlich des zweiten BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung)-Forums Verbraucherschutz (9. – 10.11.2005): Mehrfachrückstände von Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln

van Wezel A, Cornelissen G, van Miltenburg K, Opperhuizen A (1996): Membrane burdens of chlorinated benzenes lower the main phase transition temperature in dipalmitoyl-phosphatidylcholine vesicles: implications for toxicity by narcotic chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. **15**: 203 – 212

van Zorge J A (1996): Exposure to mixtures of chemical substances: is there a need of regulations? Food and Chemical Toxicology, Vol. **34** (11 – 12): 1033 - 6

Veith G D, Broderius S J (1987): Structure-toxicity relationships for industrial chemicals causing type (II) narcosis syndrome. In: K L E Kaiser (Ed) QSAR in Environmental Toxicology – ii. Reidel Publication Company, Dordrecht pp 385 – 91

Verhaar H J M, van Leeuwen C J, Hermens H J L M (1992): Classifying environmental pollutants. 1: Structure-activity relationships for prediction of aquatic pollutants. Environmental Toxicology – ii. Reidel Publication Company, Dordrecht pp 385 – 391

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D (2003): Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. Toxicology. 192 (2-3): 95-117

Weinbach E C (1954): The effect of pentachlorophenol on oxidative phosphorylation. Journal of Biological Chemistry, Vol. **210**, 545 - 550

Wezel, van A P, Opperhuizen A (1995): On the mechanism of cogenotoxic action between ingested amphibole asbestos fibres and benzo(a)pyrene: II. Tissue specificity studies using comet assay. Cancer Letters, Vol. **139** (2), 173 – 176

Williams J R (1977): Role of DNA repair in cell inactivation, ageing, and transformation: a selective review, a speculative model. Advances in Genetics, Vol. **7**: 162 – 210

Witte I (1995): Mechanismen toxischer Kombinationswirkungen. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das Lehrgebiet Biochemie, Carl von Ossietzky-Universität, Oldenburg

Witte I, Jacobi H und Juhl-Strauss U (1995): Correlation of synergistic cytotoxic effects of environmental chemicals in human fibroblasts with their lipophilicity. Chemosphere, Vol. **31** (9), 4041 - 4049

Witte I, Jacobi H, Juhl-Strauss U (2000): Krebsrisiken durch Gemische aus Umweltchemikalien und erbgutschädigenden Stoffen. Abschlussbericht BMBF-Vorhaben 07 GTX 03/6, 67 Seiten

Yu Hong-Xia, Lin Zhi-Fen, Feng Jian-Fang, Xu Tie-Lian, Wang Lian-Sheng (2001): Development of quantitative structure-activity relationship in toxicity prediction of complex mixtures. *ACTA Pharmacologica Sinica*, Vol. **22** (1): 45 – 49

Zeliger H I (2003): Toxic Effects of Chemical Mixtures. *Archives of Environmental Health*, Vol. **58**, No.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Irene Witte danke ich herzlich für die Vergabe des Themas meiner Doktorarbeit, die Möglichkeit, in optimal eingerichteten Laboren zu arbeiten, die freundliche, verständnisvolle Betreuung und Ansprechbarkeit während der Labor- und Schreibtischzeiten und alle wohlwollenden Hinweise und Anregungen. Ich hatte die Gelegenheit, nicht nur thematisch, sondern auch menschlich viel zu lernen.

Frau Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg danke ich für die Übernahme der Zweiten Gutachterin.

Der Hans-Böckler-Stiftung danke ich für das freundlich gewährte Stipendium im Rahmen des Promotionskollegs der Universitäten Oldenburg und Bremen und die vielfältigen Möglichkeiten zur Weiterbildung und –qualifikation.

Meinem Promotionsreferenten Werner Fiedler danke ich herzlich für seine verständnisvolle, hilfsbereite und unkomplizierte Betreuung während meiner Promotionszeit. Allen Mitgliedern des Promotionskollegs danke ich für thematisch weiterführende und dennoch gemütliche Kollegtreffen.

Den Mitarbeitern der AG Biochemie danke ich für das freundliche Arbeitsklima, in dem konstruktives, motiviertes Arbeiten möglich war und Freude gemacht hat. Danke an Elke Frahmann und Marita Weerts-Eden, die mich zu Beginn geduldig in alle Laborarbeiten einwiesen. Ganz besonders danke ich Kathrin Henrichs für die optimale Zusammenarbeit, die stete Diskussionsbereitschaft zu welchem Thema auch immer und die Gabe, doch noch etwas Positives zu entdecken, wenn ich schon aufgeben wollte. Und ich danke dir für deine Freundschaft, Kathrin!

Meinen lieben Kollegen Harald Ertl, Simone Geyer, Kathrin Henrichs und Marcus Nachtkamp danke ich für drei schöne, gemeinsame Jahre in freundschaftlicher Verbundenheit. Wir haben viel gearbeitet, diskutiert und zu Papier gebracht. Wir haben viel gelacht und gemeinsam gefeiert. Und wir haben viel geschafft! Hat Spaß gemacht, mit euch zu arbeiten!

Kathrin Henrichs und Klaudius Sommer danke ich für das akribische Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit, alle guten Hinweise und Ratschläge, die mir ein aufrichtiges Interesse am Thema und der Arbeit zeigten. Bei Simone Geyer möchte ich mich für die Unterstützung bei der Erstellung der statistischen Auswertung der Ergebnisse bedanken. Frau Dr. Ursula Juhl-Strauß und Georgia Klein danke ich für ihre Hilfestellungen und Korrekturen bei der summary.

Danke allen Freunden, besonders meinem Vater Horst Metzger, meinem Sohn Christoph Sommer, meinen Freundinnen Uta Mohr und Patricia von Pein, und meinen lieben Freunden Etta und Dr. Heinz Alheidt, die immer an meinen Erfolg geglaubt haben. Ein besonderer Dank an Marion Ebbersmeyer, auf deren zuverlässige Hilfe und Unterstützung Zuhause, ich mich stets verlassen konnte und die mir zudem vermittelte, alles gerne für uns und unsere Tiere zu tun.

Und ich danke dem Mann an meiner Seite: Klaudius Sommer, der mich vom schwierigen Beginn bis zur Fertigstellung meiner Promotion bei allen erforderlichen Arbeiten geduldig unterstützte und nicht müde wurde, mir sein umfangreiches Wissen um die Datenverarbeitung freundlich, kenntnisreich und hilfsbereit zu vermitteln. Diese Arbeit konnte nur mit meinem Mann an meiner Seite, seiner Unterstützung und liebevollen Zuwendung zustande kommen. Danke, dass du da bist!

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen einer anderen wissenschaftlichen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat.

Oldenburg, 28. Februar 2006

Heike Sommer

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Heike Sommer
Geburtstag, -ort 09.10.1961, Celle
Familienstand verheiratet, ein Sohn (26 Jahre)

Schulbildung

1968 - 1972 Grundschulen Ahnsbeck und Lachendorf
1972 - 1979 Hölty Gymnasium Celle
Erweiterter Sekundarabschluss I
1990 - 1993 Oldenburg Kolleg
Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1979 - 1981 Ausbildung zur Fleischereifachverkäuferin
Gesellenbrief

Berufspraxis

1982 - 1989 Ausübung des Berufs der Fleischereifachverkäuferin

Studium

1994 - 2002 Studium der Biologie (Diplom)
Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg
Diplom-Biologin

Promotion

2002 - 2006 Promotionsstipendiatin der Hans-Böckler-Stiftung
Graduiertenkolleg der Universitäten Oldenburg und
Bremen
AG Biochemie, Frau Prof. Dr. I. Witte
Thema: Zyto- bzw. gentoxische Wirkschwellen von
Gemischen aus 2 – 8 Umweltchemikalien in
Abhängigkeit von der Lipophilität der Kom-
ponenten

Februar 2006 Abgabe der Dissertation