

5. Diskussion

5.1. Einzelne Proben im Keratinozytenatmungstest

5.1.1. Auswertung der Wirkungen der Textilproben

· Textilproben der Firma Klaus Steilmann (S01 - S37)

Die Voruntersuchung der Extrakte, daß heißt die Atmungshemmung bei einer festgelegten Konzentration von 10000 ppm mehrmals zu ermitteln, ist mit relativ wenig Aufwand verbunden und für eine größere Probenzahl zu empfehlen. Durch dieses Grob screening lassen sich erste Aussagen über die Größenordnung der Wirksamkeit der Textilextrakte treffen. Bei den 37 Textilextrakten der Steilmann-Proben zeigte sich eine deutliche Abstufung der ermittelten Hemmung der Atmung. Da fünf der Proben die Basal atmung gering hemmten (0 % bis 15 %), waren für diese im Gegensatz zu den stärker hemmenden Proben keine vollständigen Dosis-Wirkungskurven notwendig. Für fast alle der 37 Steilmann-Proben konnten Aussagen über die potentielle Belastung aufgrund der ermittelten Dosis-Wirkungskurven mit relativ wenig Streuung gemacht werden.

Parallel dazu wurden die Textilextrakte mit Hilfe der GC-MS auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. In jedem Textilextrakt waren eine Vielzahl von Komponenten enthalten, deren Anzahl zwischen 50 und 80 Verbindungen pro Extrakt lag. Der Hauptanteil der identifizierten Verbindungen ist relativ schwach toxisch, so daß kein Zusammenhang zwischen den enthaltenen Komponenten und der Wirkung auf die Atmungshemmung gefunden werden konnte. Auffällig ist, daß in einigen Proben toxische Verbindungen wie Phenol, o-Chloranilin, Dibutylformamid, 4-Chlor-3-methylphenol, Tributylphosphat, Arylamine und Kresole enthalten sind. Aber mit dem Keratinozytenatmungstest konnte keine Korrelation zwischen Atmungshemmung und enthaltenen toxischen Komponenten nachgewiesen werden. Das bedeutet, die Substanzen heben sich in ihrer Wirkung auf die Atmungshemmung auf, die Konzentrationen der Substanzen sind zu gering oder sie werden nicht extrahiert um eine solche starke Wirkung hervorzurufen.

Die Extrakte der Textilien (S13 und S29), die am stärksten hemmten, beinhalten keine auffälligen Verbindungen in außergewöhnlichen Konzentrationen, die nicht auch bei den anderen Extrakten nachgewiesen wurden. Wahrscheinlich sind die Ursachen der gefundenen Hemmungen Kombinationswirkungen der analysierten oder unter der Nachweisgrenze liegenden Substanzen.

Ein Zusammenhang zwischen dem Material der Textilien und ihrer Wirkung konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der gering- bzw. nicht hemmenden Extrakte wurde aus Textilien gewonnen, die aus 100 % Baumwolle bestehen. Auffällig ist, daß die Proben mit der stärksten Hemmung aus 100 % Viskose gewonnen wurden. Obwohl andere gleich behandelte Textilextrakte aus reiner Viskose keine bis geringe Atmungshemmung zeigten. Aus diesem Ergebnis muß man schlußfolgern, daß nicht das Material selbst, sondern unterschiedliche Verarbeitung und Veredlung mit unterschiedlichen chemischen Substanzen die starken Hemmungen auslösten.

· Proben S38 - S40

Wie sich auch im Keratinozytenatmungstest zeigen ließ, bestätigte sich der Verdacht der Firma Steilmann hinsichtlich der Belastung der Proben S38 – S40. Alle drei Textilextrakte lagen mit ihrem IC_{50} -Wert unterhalb des Durchschnitts der anderen von Steilmann zur Verfügung gestellten Proben. Die GC/MS-Analyse ergab jedoch keinen Anhaltspunkt hinsichtlich besonders toxischer Substanzen.

In der Textilprobe S38 sind laut Analyse, welche die Firma Steilmann in Auftrag gegeben hat, 0,2 – 0,3 g/kg Formaldehyd enthalten. Aber selbst diese Konzentration an Formaldehyd reicht nicht aus, um die starke Hemmung dieser Probe zu erklären. Die Firma Steilmann belegte ebenfalls anhand von Zertifikaten, daß der besonders stark hemmende Textilextrakt S38 keine Verbindungen enthält, die gegen die geltenden Bestimmungen verstoßen.

Die starke Belastung dieser Textilien wurde im Epikutantest überprüft. In einem Selbstversuch an mehreren Personen unter hautärztlicher Aufsicht wurde das Ergebnis der Untersuchung an 50 Personen durchgeführt: Es wurden keine allergischen oder reizenden Hautreaktionen beobachtet.

Diese drei Textilien wurden sowohl mit saurem als auch mit basischem Schweißsimulat nach DIN 54020 extrahiert. Da sich jedoch in dem basischen Extrakt weniger Komponenten bzw. in geringerer Konzentration lösten, wurden alle anderen Textilproben nur sauer extrahiert.

Um eine Erklärung für die starke Belastung der Proben zu finden, wurden diese Textilproben gewaschen, danach zeigten die Extrakte der gewaschenen Textilien nur noch geringe bis keine Hemmung. Die gefundene Wirkung ist wahrscheinlich auf Waschmittelreste zurückzuführen, da die Proben bei der Extraktion schäumten. Diese Untersuchungen belegen, daß sich durch gründliches Waschen und Spülen vor dem ersten Tragen der Textilien die Belastungen für den Menschen stark verringern lassen. Durch das Waschen der Textilien werden die Anzahl und die Konzentration der Substanzen zwar geringer, trotzdem verbleiben Tensidreste von Waschmitteln in den Textilien, die ebenfalls eine Atmungshemmung hervorrufen können.

· **Trennung der Probe S40**

Da es durch die Vielzahl der Komponenten der Extrakte keine konkreten Hinweise auf die Ursache der starken Atmungshemmung der Textilproben S38 – S40 gab, wurde der Extrakt S40 durch eine Blight-Dyer-Extraktion und eine anschließende Säulenchromatografie zuerst grob in fünf Fraktionen getrennt, um weitere Messungen und Eingrenzungen der belasteten Fraktionen vornehmen zu können. Dabei zeigte sich, daß alle fünf gewonnenen Fraktionen nur geringe Hemmungen im Keratinozytenatmungstest aufwiesen. Wurden diese fünf Fraktionen wieder vereint, so war eine deutliche Hemmung der Zellatmung zu verzeichnen, die größer als die Summe der einzelnen Werte der Fraktionen war. Dies ist ein eindeutiges Indiz für die Kombinationswirkung der enthaltenen Komponenten.

Entgegen den Vermutungen, die Ursache für die starke Hemmung liege allein in einer chemischen Substanz, die im Textilextrakt enthalten ist, handelt es sich um Kombinationswirkungen. Am Beispiel der Probe S40 wird deutlich, daß mehrere Substanzen, die einzeln keine nennenswerten Schädigungen hervorrufen, in ihrer Gesamtwirkung die Atmung der Keratinozyten stark beeinträchtigen. Hier wird der

entscheidende Vorteil des Keratinozytenatmungstests und der Biotests im allgemeinen gegenüber der chemischen Analytik deutlich, die nur die Konzentrationen der einzelnen Substanzen erfassen, aber keine Rückschlüsse auf Wechselwirkungen mit anderen Substanzen erlauben.

· **Textilproben der Firma Lenzing (L01 - L17)**

Im Gegensatz zur Viskosefabrikation wird bei der Herstellung dieser neuartigen Lyocell-Faser das Lösungsmittel N-Methylmorpholin-N-oxid verwendet, das weniger toxisch ist und sich besser recyceln läßt. Weitere Vorteile gegenüber herkömmlichen Fasern sind z. B. die bessere Färbbarkeit, höherer Tragekomfort und größere Abriebfestigkeit.

Anhand der Ergebnisse im Keratinozytenatmungstest lassen sich sehr gut die Stufen der aufgenommenen Belastungen beim Herstellen der Lyocell-Fasern nachweisen. Von der Rohware bis zum fertigen Endprodukt unterscheiden sich die atmungshemmenden Eigenschaften der Lyocell-Extrakte teilweise sehr stark. Während der unbehandelte Nadelfilz die stärkste Hemmung aufwies, konnte bei der fertigen, gewaschenen Textilie keine Hemmung mehr beobachtet werden. Allein der erste Schritt bei der Verarbeitung des Nadelfilzes läßt die Atmungshemmung der Zellen um eine Größenordnung abnehmen. Auffällig war, daß auch durch Reaktivfärbung die Hemmung der Atmung stark zurückging. Durch die Abstufungen der Atmungshemmung bei den einzelnen Verarbeitungsschritten in der Textilherstellung und -verarbeitung lassen sich die toxischen Auswirkungen mit Hilfe des Keratinozytenatmungstest gut nachvollziehen. Der Unterschied zwischen den japanischen und der österreichischen Qualität ist nur gering. Besonders positiv zu vermerken ist, daß die mehrmals gewaschene Textilie keine Hemmung im Keratinozytenatmungstest verursacht.

Die Extrakte der Lyocell-Proben wurden keiner GC/MS-Analyse unterzogen, da bereits bei den Textilproben der Firma Steilmann keine Korrelation zwischen den Ergebnissen des Atmungstests und der chemischen Analyse gefunden werden konnte. Außerdem konnten keine Substanzen, mit denen die Textilien behandelt wurden, untersucht werden, weil diese dem Betriebsgeheimnis unterliegen und demzufolge nicht bekannt waren.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß der Keratinozytenatmungstest gut geeignet ist, die Toxizität der verschiedenen Behandlungsstufen während der Herstellung und Verarbeitung zu erfassen. Außerdem zeigte sich, daß dagegen geringe Unterschiede bei toxischen Auswirkungen von Faserextrakten verschiedener Herkunft (österreichische und japanische Qualität) bestehen.

· **Textilproben der Firma ecb ONLINE Analystechnik GmbH (O01 – O05)**

Die Textilien, die von der Firma ecb ONLINE Analystechnik GmbH zur Verfügung gestellt wurden, zeigten unterschiedliche Ergebnisse im Keratinozytenatmungstest. Die Extrakte wiesen geringe Hemmung der Basalatmung (Probe O01) bzw. keine Hemmung (Probe O02) und mittelmäßige Hemmung (Probe O03) auf. Die Hemmungen der CCCP-entkoppelten Atmung dieser Proben lag etwas niedriger, da die entkoppelte Atmung etwas empfindlicher ist.

Die Proben O04 und O05, die von den Verbrauchern wegen Hautreizungen reklamiert wurden, zeigten mit mittelmäßiger bis starker Atmungshemmung zwar kleine Unterschiede (1000 – 4000 ppm), lagen jedoch in der gleichen Größenordnung. Als Ursache für die Hautreizungen beim Tragen dieser Textilien kann dies jedoch nicht angesehen werden.

Im Gegensatz zu allen anderen Textilproben zeigte sich bei diesen beiden Proben eine relativ geringe Antimycin A-Hemmung, wahrscheinlich aufgrund von externem Sauerstoffverbrauch durch Substanzen im Textilextrakt. Auch im Fall dieser beiden Proben konnte durch den Keratinozytenatmungstest nachgewiesen werden, welche konkreten Wirkungen Schadstoffe in der Atmungskette auslösen.

· **Proben O08 – O11**

Die Proben O08 bis O11 enthalten laut GC/MS-Analyse das Biozid Kathon®.

Kathon wird hauptsächlich zur Bakterien- und Pilzbekämpfung eingesetzt. Es ist ein Gemisch aus 2-Methyl-, 5-Chlor-2-methyl- oder 2-Octyl-4-isothiazol-3-on. Eine breite Anwendung findet Kathon® auch als biozid wirkender Zusatz unter anderem in der Kosmetik-, Papier- und pharmazeutischen Industrie. Nachgewiesen wurden seine

mutagene Wirkung auf Bakterien sowie seine cytotoxische Wirkung in humanen Fibroblasten. Außerdem ist Kathon® nachweislich ein Kontakt-Allergen [20, 21, 22, 23, 24].

Entgegen der Annahme zeigten die Proben O08 bis O11 keine Hemmungen im Keratinozytenatmungstest. Daraus kann man schließen, daß die Konzentrationen an Kathon® in den Textilproben zu gering sind. Es ist möglich, daß bei der Extraktion der Textilproben sich die Konzentration an Kathon® soweit verringert, daß keine Atmungshemmung mehr nachweisbar ist. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß Kathon in den Konzentrationen, in denen es in den Textilien vorhanden ist, keinen Einfluß auf die Hemmung der Zellatmung hat. Denkbar ist auch, daß Kathon keine bzw. nur geringe Atmungshemmung verursacht und die Toxizität auf anderer Ebene wirkt.

· **Teppichproben (T01-T14)**

Verschiedene Teppiche wurden aufgrund ihres Gehaltes an Permethrin im Keratinozytenatmungstest untersucht.

Der Name der Pyrethroide, zu denen auch Permethrin gehört, leitet sich von Pyrethrum, einem Extrakt aus Chrysanthemen, ab. Er beinhaltet ein Gemisch aus sechs verschiedenen Pyrethroiden. Pyrethrum ist das älteste bekannte Insektizid. In der heutigen Zeit wird eine Vielzahl unterschiedlicher synthetischer und natürlicher Pyrethroide vor allem als Insektizide eingesetzt. Anwendung finden die Pyrethroide beispielsweise in privaten Haushalten, aber auch in Krankenhäusern und in Flugzeugen. Über die Langzeitwirkung dieser Verbindungsklasse ist bisher wenig bekannt. Es wird angenommen, daß sich Pyrethroide und deren Abbauprodukte aufgrund ihrer Lipophilie im Gehirn und im Leber- und Fettgewebe anreichern. Die nerventoxische Wirkung der Pyrethroide beruht vor allem auf der Wirkung auf Natriumkanäle an Zellmembranen. Aber auch Blockierungen der interzellulären Kommunikation nicht nur von Nervenzellen wurden nachgewiesen. Über eine toxische Wirkung von Pyrethroiden auf das Immunsystem sind bisher wenige Untersuchungen gemacht worden. Nachgewiesen ist jedoch ein Zusammenhang mit allergischen Reaktionen. [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32]

In den Teppichextrakten konnte nur das Pyrethroid Permethrin nachgewiesen werden.

Es gehört seit vielen Jahren zu den am häufigsten eingesetzten Mitteln zur Insektenbekämpfung und ist nach wie vor eine der wirksamsten Verbindungen seiner Substanzklasse. [33]

Bis auf eine Ausnahme (T14) ist in allen Teppichproben Permethrin festgestellt worden. Besonders hoch ist die Konzentration in den Proben T05 und T11, wobei letztere Probe aus dem Bundesumweltamt stammt und dort bereits als pyrethroidhaltig bekannt war.

Keine der untersuchten Teppichproben ergab im Keratinozytenatmungstest eine Schädigung der Atmung. Permethrin allein eingesetzt weist einen IC_{50} -Wert der Basalatmung von $70 \mu\text{M}$ auf. Da Permethrin hauptsächlich als Nervengift wirkt, beweist dieses Ergebnis, daß es auch die Zellatmung schädigt. Der Konzentrationsbereich ist ebenfalls vergleichbar mit den in der Praxis verwendeten Konzentrationen. Vergleicht man das Ergebnis der IC_{50} -Werte mit dem gefundenen Gehalt an Permethrin in den Teppichfasern, so entspricht ein IC_{50} -Wert von $70 \mu\text{M}$ einem Wert von 28 mg/l . Da bei der Extraktion der Teppichfasern nach DIN 54020 das Verhältnis von Fasern zu Volumen Schweißsimulat 1:10 war, entspricht dieser IC_{50} -Wert einem tatsächlichen Gehalt von 280 mg/kg . Das würde bedeuten, daß bei einigen der Teppichfasern Atmungshemmungen durch den Gehalt an Permethrin zu beobachten sein müßten. Dies konnte jedoch nicht festgestellt werden. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß durch die Extraktion im wäßrigen Milieu („Schweiß sauer“) die lipophile Substanz Permethrin nicht erfaßt wird.

5.1.2. Auswertung der Wirkungen der Substanzen

Die im Keratinozytenatmungstest untersuchten Substanzen wurden aufgrund unterschiedlicher Gesichtspunkte getestet. Einerseits handelte es sich dabei um krebverdächtige Verbindungen bzw. um Verbindungen, die allergieauslösend oder auf anderen Ebenen toxisch wirken können. Alle diese Verbindungen werden bei der Textilherstellung und -verarbeitung eingesetzt. Zwar ist der Keratinozytenatmungstest nicht in der Lage mutagene, kanzerogene oder allergene Wirkungen zu erfassen, aber er kann als Ergänzung die Auswirkungen auf die primäre Energiegewinnung: die Atmung

der Zellen erfassen. Da die exakten Mechanismen der Allergieauslösung und der Wechselwirkung der Keratinozyten in diesem Prozeß noch nicht vollständig erforscht sind, kann das aus dem Atmungstest erhaltene Ergebnis durchaus relevant für die Einordnung und Beurteilung einer Verbindung sein.

· **Arylamine und Biphenyle**

Eine Reihe von aromatischen Aminen wurden früher bei der Herstellung und Verarbeitung von Textilien verwendet, die heute unter dem Verdacht stehen karzinogen zu wirken. Da diese Arylamine oft in Azofarbstoffen enthalten sind bzw. bei deren Abbau entstehen, werden diese Verbindungen in Deutschland nicht mehr eingesetzt. Trotzdem kann man diese Verbindungen noch in Textilien ausländischer Herkunft finden.

In Tierversuchen, meist an Mäusen und Ratten, wurde die Karzinogenität bereits nachgewiesen. Über die direkten Auswirkungen auf den Menschen gibt es nur vereinzelt Ergebnisse. Einige Untersuchungen an Arbeitern, die solche Chemikalien produzierten, zeigten ein erhöhtes Auftreten von Krebsfällen. [³⁴, ³⁵, ³⁶, ³⁷, ³⁸, ³⁹, ⁴⁰]

Zwanzig verschiedene Arylamine und fünf Biphenylverbindungen wurden von der Firma ecb ONLINE Analysentechnik GmbH für die Untersuchung im Keratinozytenatmungstest zur Verfügung gestellt. Da diese Firma selbst sehr viele Textiluntersuchungen durchführt, wurde dort auch eine „Analytische Schnellbestimmung von gesundheitsgefährdenden Azofarbstoffen in Textilien“ entwickelt. [⁴¹]

Trotz ihrer größtenteils ähnlichen Grundstruktur hemmten die 20 untersuchten Arylamine sehr unterschiedlich die Atmung der HaCaT-Zellen. Das Spektrum lag zwischen sehr starker bis geringer Hemmung. Die fünf untersuchten Biphenyle zeigten alle fast gleich große Atmungshemmungen.

· **Einzelergebnisse**

· **4-Aminobiphenyl (Nr. 1)**

4-Aminobiphenyl wirkt karzinogen im Tiermodell, dies wurde an Mäusen, Ratten, Kaninchen und Hunden nachgewiesen. Bei oraler Aufnahme kommt es zur Bildung von

Blasen- und Leberkrebs. Auch in einigen humanen Studien wird von einem gehäuften Auftreten von Blasenkarzinomen in Verbindung mit 4-Aminobiphenyl berichtet. Nicht nur 4-Aminobiphenyl, sondern auch seine Salze und Metabolite werden der Karzinogenität verdächtigt. [⁴², ⁴³, ⁴⁴]

Im Keratinozytenatmungstest gehört 4-Aminobiphenyl mit einem IC₅₀-Wert der Basalatmung von 260 ± 30 µM zu der Gruppe der am stärksten wirksamen Arylamine. Der IC₅₀-Wert der CCCP-entkoppelten Atmung bestätigt dieses Ergebnis. Aufgrund der hohen Atmungstoxizität sollte man dieser früher häufig eingesetzten Substanz mehr Aufmerksamkeit schenken.

· **Benzidin (Nr. 2)**

Benzidin ist ebenfalls eine Substanz, die bei Menschen wahrscheinlich karzinogen wirkt. Besonders Blasenkrebs wird in diesem Zusammenhang erwähnt. [⁴⁵, ⁴⁶]

Es darf zwar in Deutschland bei der Verarbeitung von Textilien nicht mehr eingesetzt werden, das heißt aber nicht, daß wir nicht auf anderem Wege z. B. als Abbauprodukt anderer Substanzen mit Benzidin in Kontakt kommen können.

Im Vergleich zu den anderen Arylaminen liegt Benzidin mit einem IC₅₀-Wert der Basalatmung von 4400 ± 650 µM im mittleren Bereich der schädigenden Auswirkungen.

· **4-Chlor-o-toluidin (Nr. 3)**

Auch die Verbindung 4-Chlor-o-toluidin zählt zu den chemischen Verbindungen, die verdächtigt werden Krebs zu verursachen. [⁴⁷]

Mit einem IC₅₀-Wert der Basalatmung von 530 ± 50 µM gehört es zu den wirksamsten Arylaminen im Keratinozytenatmungstest. Auch die Hemmung der entkopplerstimulierten Atmung liegt in der gleichen Größenordnung. Das Atmungsprofil dieser Verbindung entspricht genau wie das der anderen Arylamine dem Profil einer Hemmung auf den Elektronentransfer in der Atmungskette.

· **2-Naphtylamin (Nr. 4)**

2-Naphtylamin ist verdächtig, krebserzeugend bei Menschen zu wirken. Im Gegensatz zu diesen Vermutungen konnten in epidemiologischen Studien, bei denen Arbeiter 2-Naphtylamin ausgesetzt waren, keine Hinweise gefunden werden, daß diese Substanz ein karzinogenes Potential besitzt. Bei Kaninchen führt 2-Naphtylamin zu keiner Hautirritation und nur zu einer leichten Reizung der Augen. Untersuchungen zur Karzinogenität bei Mäusen und Hunden mit wiederholten Gaben von 2-Naphtylamin ergaben Leberfunktionsstörungen. In vitro zeigte 2-Naphtylamin in verschiedenen Testsystemen mutagene und chromosomenzerstörende Aktivität. Diese Ergebnisse in vitro stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen in vivo, die keine Mutagenität nachweisen konnten. [⁴⁸]

Die Substanz liegt mit einem IC₅₀-Wert der Basalatmung von 4800 ± 650 µM im mittleren Bereich der schädigenden Wirkungen der Arylamine.

· **o-Aminoazotoluen (Nr. 5)**

Die meisten Azoverbindungen bzw. deren Metabolite sind als gesundheitsgefährdend eingestuft. Deshalb wurde auch in Deutschland der Einsatz von Azofarbstoffen bei der Textilherstellung verboten.

Doch auch auf zelltoxischer Ebene wirkt o-Aminoazotoluen schädigend.

Mit 290 ± 170 µM als IC₅₀-Wert der Basalatmung gehört diese Verbindung zu den sechs Arylaminen, welche die Atmung der Keratinozyten am stärksten hemmen.

· **2-Amino-4-nitrotoluen (Nr. 6)**

Der IC₅₀-Wert der Basalatmung von 2-Amino-4-nitrotoluen mit 2000 ± 190 µM liegt im Vergleich zu den anderen Arylaminen im mittleren Bereich. Die relativ geringe bis mittelmäßige Hemmung der Atmung und die hemmende Wirkung auf das Elektronentransfersystem der Atmung wird auch durch den IC₅₀-Wert der CCCP-entkoppelten Atmung bestätigt. Die Ergebnisse des Keratinozytenatmungstests, die als nicht gefährlich anzusehen sind, sagen jedoch nichts über die kanzerogene oder mutagene Wirkung dieser Substanz aus.

· **p-Chloranilin (Nr. 7)**

p-Chloranilin wird ebenfalls als krebbsverdächtig eingestuft. Bei oraler Aufnahme wird es vom Körper schnell und fast vollständig absorbiert. Diese Verbindung zeigt eine starke Neigung Hämoglobinaddukte zu bilden. Dies dient auch als Nachweis, ob und wieviel p-Chloranilin an einem Arbeitsplatz vorhanden ist. Es zerstört primär die Erythrozyten, aber auch Nierenschädigungen unterschiedlichen Grades wurden bei Ratten beobachtet. Frühere Untersuchungen zeigten, daß p-Chloranilin die Haut und die Augen von Kaninchen reizten, während andere Untersuchungen dies nicht feststellen konnten. In verschiedenen Gentoxizitätstests zeigte p-Chloranilin sowohl positive als auch negative Ergebnisse. Anhand von in vitro Untersuchungen an menschlicher Haut konnte gezeigt werden, daß es von der Haut aufgenommen wird, von abgeschürfter mehr als von intakter. Die dermalen LD₅₀-Werte betragen bei Ratten 335 mg/kg und bei Kaninchen 360 mg/kg. [⁴⁹]

Im Keratinozytenatmungstest zeigte p-Chloranilin mit dem größten IC₅₀-Wert der Basalatmung von 21100 ± 1300 µM die geringste Atmungshemmung der Arylamine.

· **2,4-Diaminoanisol (Nr. 8)**

Eine krebbsauslösende Wirkung wird auch für 2,4-Diaminoanisol vermutet. Bei einigen Tests zeigte die Substanz mutagene Wirkung, bei anderen Mutagenitätstests dagegen keine. Da 2,4-Diaminoanisol auch in vielen Haarfarben enthalten ist, ist die Frage nach der Toxizität dieser Substanz nicht nur für die Untersuchung von Textilinhaltsstoffen interessant. [^{50, 51, 52, 53}]

Beim Keratinozytenatmungstest konnten keine linearen Zusammenhänge zwischen Dosis und Wirkung ermittelt werden. Auch die IC₅₀-Werte bei dieser Verbindung ließen sich nicht exakt bestimmen, weil es nicht möglich war die Substanz in höheren Konzentrationen zu lösen.

· **4,4'-Diaminodiphenylmethan (Nr. 9)**

4,4'-Diaminodiphenylmethan ist nicht nur vermutlich krebserzeugend, sondern wird auch in Verbindung mit der Auslösung von Allergien gebracht. Es wird über die Haut aufgenommen und ruft unter anderem eine Zerstörung der Leber hervor. [^{54, 55, 56, 57, 58}]

Vergleicht man die IC₅₀-Werte im Keratinozytenatmungstest, so zeigt 4,4'-Diaminodiphenylmethan eine mittelmäßige Hemmung der Zellatmung. Der IC₅₀-Wert der Basalatmung von 4,4'-Diaminodiphenylmethan beträgt 1800 ± 190 µM. Bei der verwandten Substanz ohne Aminogruppen Diphenylmethan dagegen beträgt der IC₅₀-Wert 117 ± 6 µM. Offensichtlich haben die beiden Aminogruppen eine abschwächende Wirkung in bezug auf das atmungsschädigende Potential der Verbindung.

· **3,3'-Dichlorbenzidin (Nr. 10)**

3,3'-Dichlorbenzidin wird zur Herstellung von Pigmentfarbstoffen, Textilien und Plastik verwendet. Es wird vom Organismus durch Inhalation, aber vor allem über die Haut aus der Umgebung aufgenommen. In Mäusen, Ratten, Hamstern und Hunden wirkt diese Substanz karzinogen. Es liegen jedoch keine vergleichbaren Daten zur Karzinogenität beim Menschen vor, ebenso gibt es keine Ergebnisse über mögliche Hautreizungen. Geht man von der strukturellen Ähnlichkeit zu Benzidin aus, so kann man vermuten, daß unter anderem auch 3,3'-Dichlorbenzidin Blasenkrebs hervorrufen kann. [^{59, 60, 61, 62, 63, 64}]

Wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit wurde 3,3'-Dichlorbenzidin als Dihydrochlorid gelöst. Mit einem IC₅₀-Wert der Basalatmung von 370 ± 90 µM gehört auch dieses Arylamin zu der Gruppe mit der größten Hemmung im Keratinozytenatmungstest.

Wegen der Probleme bei der Messung schwanken die Werte vor allem bei der CCCP-entkoppelten Atmung, die Wirksamkeit von 3,3'-Dichlorbenzidin wurde jedoch experimentell abgesichert.

· **3,3'-Dimethoxybenzidin (Nr. 11)**

Die Karzinogenität von 3,3'-Dimethoxybenzidin wurde bei Ratten nachgewiesen. Nach mehrmaliger Gabe der Substanz wurde das Auftreten von Tumoren in verschiedenen

Organen, auch auf der Haut festgestellt. Bei einer Verdünnung von 1:10 wurde bei Tierversuchen keine Reizung der Haut und der Augen festgestellt. Ob 3,3'-Dimethoxybenzidin beim Menschen karzinogen wirkt, ist bisher noch nicht nachgewiesen, da die Personen, die dieser Substanz ausgesetzt waren auch gleichzeitig mit anderen Chemikalien Kontakt hatten. [⁶⁵, ⁶⁶, ⁶⁷, ⁶⁸]

Bei Einsatz im Keratinozytenatmungstest wurde ein IC₅₀-Wert der Basalatmung von 1420 ± 110 µM gemessen.

Damit liegt 3,3'-Dimethoxybenzidin im mittleren Schädigungsbereich der untersuchten Arylamine. Für die CCCP-entkoppelte Atmung konnte keine Dosis-Wirkungskurve ermittelt werden.

· **3,3'-Dimethylbenzidin (Nr. 12)**

3,3'-Dimethylbenzidin, auch als o-Tolidin bekannt, ist Bestandteil von einigen Azofarbstoffen. Es wird vom Organismus fast vollständig absorbiert. Unter bestimmten Voraussetzungen wandelt sich die Substanz in vitro in Metabolite um, die an die DNA binden und somit mutagen wirken.

3,3'-Dimethylbenzidin wirkt zwar stark reizend auf die Atmungsorgane, über Augen- und Hautreizungen ist bislang jedoch wenig bekannt.

Bei Ratten wirkt 3,3'-Dimethylbenzidin karzinogen, ruft Tumore in unterschiedlichen Organen hervor, beispielsweise in der Haut und im Blinddarm. Zur Karzinogenität beim Menschen liegen bisher keine Daten vor. [⁶⁹, ⁷⁰, ⁷¹]

Der IC₅₀-Wert der Basalatmung beträgt 1100 ± 90 µM. Im Vergleich zu den anderen Arylaminen liegt 3,3'-Dimethylbenzidin im Bereich mittelmäßiger Hemmung der Keratinozytenatmung.

· **3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan (Nr. 13)**

Die Karzinogenität von 3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan wurde an Ratten und Hunden festgestellt. In einer Studie über Färbereiarbeiter, die über mehrere Jahre u.a. mit

dieser Substanz arbeiteten, wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Karzinomrate und dieser Substanz festgestellt. [^{72, 73, 74}]

Innerhalb der getesteten Arylamine weist 3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan mit einem IC₅₀-Wert der Basalatmung von 1700 ± 660 µM eine mittlere Hemmung im Keratinozytenatmungstest auf.

· **p-Kresidin (Nr. 14)**

p-Kresidin ist karzinogen, dies wurde sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten nachgewiesen. Blasentumore werden gehäuft durch p-Kresidin hervorgerufen. Da keine konkreten Daten vorliegen, wie p-Kresidin beim Menschen wirkt, kann man aufgrund der tierexperimentellen Daten davon ausgehen, daß der Umgang mit dieser Substanz mit einem großen Risiko behaftet ist. [^{75, 76, 77, 78, 79}]

Im Keratinozytenatmungstest hingegen zeigte p-Kresidin nur eine geringe Wirkung. Die Halbhemmungskonzentration der Basalatmung liegt bei 11500 ± 1100 µM. Damit ist p-Kresidin zumindest aus der atmungshemmenden Sicht als wenig wirksam anzusehen.

· **4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin) (Nr. 15)**

Über 4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin) ist bisher wenig bekannt. Wie alle diese Arylamine wird auch bei dieser Substanz angenommen, daß sie bei Menschen und Tieren karzinogen wirken kann.

Im Keratinozytenatmungstest zeigt diese Verbindung eine hohe Hemmung der Zellatmung und gehört damit zu der Gruppe der stark hemmenden Arylamine (150 ± 35 µM). Dieses Ergebnis zeigt, daß man auf 4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin) besonderes Augenmerk richten sollte.

· **4,4'-Oxydianilin (Nr. 16)**

Über die Karzinogenität bei Menschen liegen keine gesicherten Daten vor. Bei Mäusen und Ratten jedoch wurden nach Gabe von 4,4'-Oxydianilin Tumore vor allem in der Leber beobachtet. [^{80, 81, 82, 83}]

Im Keratinozytenatmungstest beträgt der IC₅₀-Wert der Basalatmung 1900 ± 200 µM. Somit ist 4,4'-Oxydianilin ein mittelmäßig atmungshemmendes Arylamin. Von der CCCP-entkoppelten Atmung konnte keine Dosis-Wirkungskurve ermittelt werden, weil die erhaltenen Werte nicht aussagekräftig sind.

· **4,4'-Thiodianilin (Nr. 17)**

4,4'-Thiodianilin wirkt als karzinogene Substanz bei Mäusen und Ratten. Untersuchungen über die Karzinogenität beim Menschen sind noch nicht durchgeführt worden, dennoch ist 4,4'-Thiodianilin als eine potentiell karzinogene Substanz anzusehen [^{84, 85, 86}].

Die Atmungshemmung liegt im Vergleich aller Arylamine im mittelmäßig gehemmten Bereich. Der IC₅₀-Wert der Basalatmung beträgt 1200 ± 230 µM. Die Halbhemmungskonzentration der CCCP-entkoppelten Atmung liegt zwar eine Größenordnung darunter, beträgt aber bezogen auf die Basalatmung ca. 66% davon. Dies entspricht dem Atmungsprofil der anderen getesteten Arylamine.

· **o-Toluidin (Nr. 18)**

o-Toluidin wird ebenfalls verdächtigt karzinogen zu sein. Verschiedene Untersuchungen an Färbereiarbeitern, die mit unterschiedlichen Färbemitteln und ihren Intermediaten, u.a. mit o-Toluidin, in Berührung kamen, zeigten ein gehäuftes Auftreten von Blasen tumoren. Jedoch kann o-Toluidin nicht als einzige Ursache dafür angesehen werden, da die Personen, bei denen die Blasen tumore auftraten, auch mit anderen Chemikalien, die der Karzinogenität verdächtigt werden, in Berührung kamen. In Tierversuchen an Ratten und Mäusen wurden nach Gabe von o-Toluidin Leber- und Blasen tumore diagnostiziert. [^{87, 88}] Mit einem IC₅₀-Wert der Basalatmung von 14000 ± 2100 µM ist o-Toluidin im Keratinozytenatmungstest eine sehr gering hemmende Substanz.

· **2,4-Toluylendiamin (Nr. 19)**

Bei 2,4-Toluylendiamin ist die Wahrscheinlichkeit, daß diese Substanz bei Menschen karzinogen wirkt, sehr hoch. Zwar liegen keine Humanuntersuchungen vor, aber die Ergebnisse an Mäusen und Ratten zeigen eine eindeutige Karzinogenität. Nach oraler

Gabe treten vorrangig Lebertumore auf. In hohen Konzentrationen ist 2,4-Toluylendiamin auch toxisch für Fische und Algen. Bei Tests an Kaninchen konnte ebenfalls eine Reizung der Augen und der Haut festgestellt werden. [^{89, 90, 91, 92, 93}]

Im Keratinozytenatmungstest konnten keine exakten IC₅₀-Werte bestimmt werden. Das lag daran, daß die Werte auch bei Wiederholungsmessungen stark schwankten und die Substanz in höheren Konzentrationen nicht mehr löslich war.

· **2,4,5-Trimethylanilin (Nr. 20)**

Die Karzinogenität von 2,4,5-Trimethylanilin wurde an Ratten und Mäusen nachgewiesen, die Mutagenität an einem Leuchtbakterienstamm. Da von der direkten Wirkung auf den Menschen keine Daten vorliegen, kann nur der Verdacht, daß diese Substanz bei Menschen karzinogen wirkt, geäußert werden. [^{94, 95, 96}]

Im Keratinozytenatmungstest beträgt der IC₅₀-Wert der Basalatmung dieser Verbindung 9300 ± 770 µM. 2,4,5-Trimethylanilin weist somit eine sehr geringe Atmungshemmung auf. Auch der IC₅₀-Wert der CCCP-entkoppelten Atmung mit rund 80% der Basalatmung bestätigt dieses Ergebnis. In der Atmungskette wird wie bei allen Arylaminen der Elektronentransfer gehemmt.

· **Biphenyle**

Biphenylverbindungen werden u.a. als fungizide und antibakterielle Wirkstoffe in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt. So werden Zitrusfrüchte üblicherweise mit Biphenyl-2-ol (o-Phenylphenol bzw. OPP) behandelt. Dabei zeigte sich, daß gerade diese Substanz bei Ratten und Mäusen karzinogen wirkt. Aber auch andere Biphenylverbindungen wirken toxisch. An Rattenhepatozyten wurden die cytotoxischen Effekte von Biphenyl, Biphenyl-2-ol und Biphenyl-3-ol (m-Phenylphenol) untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß diese Verbindungen in bestimmten Konzentrationen den Zelltod hervorrufen, ausgelöst durch das Fehlen von intrazellulärem ATP und Gluthathion. Es zeigte sich außerdem, daß die para-Hydroxylgruppe im Gegensatz zur ortho-Hydroxylgruppe der Biphenyle eine höhere Toxizität hervorruft. Vergleichende Genotoxizitäts- und

Teratogenizitätsuntersuchungen von Biphenyl und Biphenylether zeigten stärkere Wirkungen des Ethers. [⁹⁷, ⁹⁸, ⁹⁹, ¹⁰⁰, ¹⁰¹, ¹⁰²]

Besondere Beachtung sollte man trotzdem Biphenyl-2-ol (o-Phenylphenol) schenken. Bisher wurde zwar kein Zusammenhang mit dem Auslösen von Allergien beobachtet, aber diese Substanz wird sehr häufig in Textilien eingesetzt. Es ist eins der am meisten verwendeten Carrier zum Färben von Polyesterfasern und deren Mischgeweben. Der Großteil der Substanz verbleibt nach dem Färben in der Textilie und kommt so mit der Haut in Kontakt. Die Einsatzmenge an Biphenyl-2-ol in der Textilindustrie ist in Deutschland rückläufig. Viele Textilien werden jedoch in nicht-europäischen Ländern mit nicht umgesetzten bzw. ohne Richtlinien zum Einsatz von Chemikalien bei der Textilverarbeitung und -veredlung hergestellt. Biphenyl-2-ol kommt in einigen Kleidungsstücken in Konzentrationen vor, in denen es auch vollständige und dosisabhängige Hemmungen der Atmung verursacht, vorausgesetzt, daß sich durch die Extraktion nach DIN der gesamte Biphenyl-2-olanteil gelöst hat. Vermutlich stehen die hautreizenden und entzündungsauslösenden Wirkungen der Substanz in Zusammenhang mit diesen Hemmungen.

Eine Vielzahl von importierten Textilien wurde von der Firma ecb ONLINE Analysetechnik GmbH speziell auf den Gehalt an Biphenyl-2-ol untersucht. Von 8000 untersuchten Textilproben enthielten 169 Proben Biphenyl-2-ol im Konzentrationsbereich von 1 – 800 mg/kg. Aber nicht nur in Polyestergemischen, wo Biphenyl-2-ol als Carrier zum Färben dient, sondern auch in anderen Faserarten war diese Substanz enthalten. [¹⁰³, ¹⁰⁴] Wahrscheinlich sind beim Transport die Textilien mit Biphenyl-2-ol belastet worden, beispielsweise durch Lagerung in der Nähe von Südfrüchten.

Auch in anderen Biotestverfahren konnten die schädigenden Wirkungen von Biphenyl-2-ol nachgewiesen werden (siehe S.66 „Vergleich verschiedener Biotestparameter von Biphenyl-2-ol“).

· **Zusammenhänge zwischen Struktur und Hemmwirkung**

Vergleicht man die Arylamine mit ihren chlorierten Abkömmlingen, so liegen die IC₅₀-Werte der chlorierten Verbindungen um ein bis zwei Größenordnungen niedriger. Es

zeigte sich bei den chlorierten Substanzen in diesen Fällen eine deutlich stärkere Hemmung im Keratinozytenatmungstest. Die Tabelle 26 zeigt den Vergleich der IC₅₀-Werte der Basalatmung von chlorierten und nichtchlorierten Arylaminen.

Tabelle 26: Vergleich der IC₅₀-Werte der Basalatmung von chlorierten und nicht chlorierten Arylaminen

Unchlorierte Verbindung	IC₅₀-Wert (Basalatmung)	chlorierte Verbindung	IC₅₀-Wert (Basalatmung)
Benzidin (Nr. 2)	4400 µM	3,3'-Dichlor-benzidin (Nr. 10)	370 µM
o-Toluidin (Nr. 18)	14000 µM	4-Chlor-o-toluidin (Nr. 3)	446 µM
4,4'-Diamino-diphenylmethan (Nr. 9)	1800 µM	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin) (Nr. 15)	150 µM
3,3'-Dimethyl-4,4'-diamino-diphenylmethan (Nr. 13)	1700 µM	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin) (Nr. 15)	150 µM

Die Substanzen 4,4'-Diaminodiphenylmethan (Nr. 9), 4,4'-Oxydianilin (Nr. 16) und 4,4'-Thiodianilin (Nr. 17) unterscheiden sich in ihrer Struktur nur an einer Stelle (Kohlenstoff-Brücke zwischen den Phenylringen). Dort ist der Kohlenstoff durch Sauerstoff bzw. Schwefel substituiert.

Die Unterschiede bei diesen verwandten Arylaminen sind im Keratinozytenatmungstest nur gering, die IC₅₀-Werte liegen alle im gleichen Bereich. Die Tabelle 27 zeigt den Vergleich der IC₅₀-Werte der Basalatmung.

Tabelle 27: Vergleich der IC₅₀-Werte der Basalatmung von verwandten Arylaminen

Verbindung	IC₅₀-Wert (Basalatmung)
4,4'-Diaminodiphenylmethan (Nr. 9)	1800 µM
4,4'-Oxydianilin (Nr. 16)	1900 µM
4,4'-Thiodianilin (Nr. 17)	1200 µM

Ausgehend von der Biphenylstruktur wird der Einfluß einer bzw. zweier Aminogruppen untersucht. Offensichtlich zeigen die Verbindungen mit Aminogruppen eine geringere

Hemmung der Atmung gegenüber den aminogruppenfreien Verwandten. Betrachtet man Biphenyl, so zeigt schon die Verbindung mit nur einer Aminogruppe eine geringere Schädigung, bei zwei Aminogruppen liegt die Hemmung der Atmung um eine Größenordnung niedriger. Die Tabelle 28 zeigt den Vergleich der IC₅₀-Werte der Basalatmung.

Tabelle 28: Vergleich der IC₅₀-Werte der Basalatmung von verwandten Biphenylen

Verbindung ohne Aminogruppen	IC₅₀-Wert (Basalatmung)	Verbindung mit Aminogruppe(n)	IC₅₀-Wert (Basalatmung)
Biphenyl	117 µM	4-Aminobiphenyl (Nr. 1)	260 µM
		Benzidin (Nr. 2)	4400 µM
Biphenylmethan	117 µM	4,4'-Diaminodiphenylmethan (Nr. 9)	1800 µM
Biphenylether	108 µM	4,4'-Oxydianilin (Nr. 16)	1900 µM

Der Einfluß der Methylgruppen scheint ebenfalls eine Bedeutung für das Ergebnis unterschiedlicher Hemmwerte zu haben. Die Verbindungen mit Methylgruppen haben im Vergleich zu ihren Homologen ohne Methylgruppen niedrigere IC₅₀-Werte, d.h. höhere Hemmwirkungen. Die Unterschiede sind teilweise gering bzw. um Größenordnungen verschieden. Die Tabelle 29 zeigt den Vergleich der IC₅₀-Werte der Basalatmung.

Tabelle 29: Vergleich der IC₅₀-Werte der Basalatmung von verwandten Arylaminen

Verbindung ohne Methylgruppen	IC₅₀-Wert (Basalatmung)	Verbindung mit Methylgruppe(n)	IC₅₀-Wert (Basalatmung)
p-Chloranilin (Nr. 7)	21100 µM	4-Chlor-o-toluidin (Nr. 3)	530 µM
2,4-Toluyldiamin (Nr. 19)	>10000 µM	2,4,5-Trimethylanilin (Nr. 20)	9300 µM
Benzidin (Nr. 2)	4400 µM	3,3'-Dimethyl-benzidin (Nr. 12)	1100 µM

Die unterschiedlichen IC_{50} -Werte der Arylamine sind nicht ausschließlich auf ihre Strukturunterschiede zurückzuführen. Es können noch andere Faktoren, wie unterschiedliche Löslichkeit, Membranpermeabilität usw. eine Rolle spielen.

· **Andere Substanzen**

· **Kresole**

Die drei Kresolisomere werden u.a. in der Pflanzenproduktion verwendet. Die biologische Halbwertszeit der Kresole liegt unterhalb von 2 Tagen (gemessen im Flußwasser). Eine Untersuchung an Rattenleberzellen ergab, daß p-Kresol das toxischste der drei Isomere ist. Im Gegensatz zu o-Kresol und m-Kresol war es in diesem Test 5- bis 10-fach toxischer. Es zeigte sich, daß p-Kresol in ein reaktives Mediat, dessen genaue Struktur noch nicht geklärt wurde, umgewandelt wird und dann an ein Slice-Protein gebunden wird. [¹⁰⁵, ¹⁰⁶, ¹⁰⁷, ¹⁰⁸]

p-Kresol ist ein Feststoff im Gegensatz zu seinen beiden flüssigen Isomeren. Diese Tatsache deutet auf andere physikalische Eigenschaften hin.

Im Keratinozytenatmungstest zeigen sich zwischen den Kresolen deutliche Unterschiede. Während es zwischen o- und m-Kresol nur geringe Abstufungen gibt, lag der IC_{50} -Wert von p-Kresol in einer völlig anderen Größenordnung. Die IC_{50} -Werte von p-Kresol liegen über 17 mM und damit so hoch, daß sie sich nicht mehr exakt bestimmen ließen. Im Keratinozytenatmungstest war p-Kresol wesentlich unwirksamer als o- und m-Kresol. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit den Ergebnissen an den Rattenleberzellen. Dies ist aber auch ein Anzeichen dafür, daß p-Kresol einen anderen Toxizitätsmetabolismus als o- und m-Kresol hat.

· **Formaldehyd**

Formaldehydexpositionen können verschiedene Ursachen haben, nicht nur durch Kleidung, auch durch die Umgebungsluft, die wiederum aus den Möbeln, Wandverkleidungen, Desinfektionsmitteln usw. Formaldehyd aufnehmen kann. Die

Auswirkungen zeigen sich auf verschiedenen Ebenen, z. B. durch Allergien und Asthma bis hin zur Tumorbildung. Die Toxizität von Formaldehyd ist zwar bekannt, jedoch gibt es teilweise widersprüchliche Meinungen. [^{109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118}]

Beispielsweise wurde die Karzinogenität von Formaldehyd durch Inhalation an Mäusen, Ratten und Hamstern untersucht. Bei den Ratten konnte die Karzinogenität nachgewiesen werden, während sich der Befund bei Hamstern nicht bestätigen ließ. Die Untersuchungen an Mäusen waren widersprüchlich. Formaldehyd induziert Mutationen in Pilzen und Bakterien. Die cytotoxischen und karzinogenen Wirkungen sind damit verbunden, der Mechanismus ist noch unbekannt. Einerseits ist die Schädigung von Formaldehyd an Tierversuchen nachgewiesen, andererseits ist es normales Zwischenprodukt im Zellstoffwechsel und dient als Baustein für verschiedene körpereigene Stoffe. Bei Menschen wurden epidemiologische Untersuchungen an Arbeitern durchgeführt, die Formaldehyd ausgesetzt waren. Es zeigte sich ein kausaler Zusammenhang zwischen Formaldehydexposition und Krebshäufigkeit. Da jedoch zu wenig Studien vorliegen, die über die genauen Zusammenhänge Aussagen treffen, kann man die karzinogene Wirkung von Formaldehyd auf den Menschen nur vermuten. [^{119, 120, 121, 122}]

In den letzten Jahren ist Formaldehyd aus Textilien als Ursache für Kontaktallergien genannt worden. [¹²³]

Stoffe die, wie z. B. Dihydroxyharnstoff, die beim Waschen und Bügeln Formaldehyd freisetzen, werden bereits seit Jahrzehnten in der Textilverarbeitung zur Herstellung knitterfreier Baumwollstoffe und Polyester-Baumwollstoffe verwendet. [¹²⁴]

Der Keratinozytenatmungstest erfaßt nur die atmungshemmenden Auswirkungen von Formaldehyd. Sowohl bei der Basalatmung als auch bei der entkopplerstimulierten Atmung zeigt sich Formaldehyd als eine mittelmäßig hemmende Substanz.

· **Glyoxal**

Glyoxal ist als wenig toxische bis mindergiftige Verbindung einzuordnen, dies wurde in Tierversuchen an unterschiedlichen Spezies nachgewiesen. Bei Kaninchen rief Glyoxal keine Hautreizungen, aber Reizungen am Auge hervor, die teilweise zu nekrotischen Veränderungen führten. Beim Menschen hingegen reizt Glyoxal die Haut. In einer Reihe

von in vitro-Tests wirkt Glyoxal mutagen. Dagegen erbrachten die in vivo-Tests unterschiedliche Ergebnisse. Bei Ratten ist die Substanz mutagen und kann als Promotor bei der Tumorbildung wirken. [¹²⁵, ¹²⁶]

Denkbar ist, daß die Aldehydgruppen sowohl von Glyoxal als auch von Formaldehyd mit Aminogruppen verschiedener Proteine in der Zelle reagieren. Durch diese Wechselwirkung könnte eine mutagene bzw. kanzerogene Wirkung hervorgerufen werden.

Das Ergebnis des Keratinozytenatmungstests zeigt, daß Glyoxal im Vergleich mit anderen Substanzen eine relativ geringe Toxizität besitzt. Dies korreliert auch mit den oben genannten Tierversuchsergebnissen.

· Vergleich von Formaldehyd und Glyoxal

Seit einiger Zeit wird darüber diskutiert, ob Glyoxal ein geeignetes Ersatzmittel für Formaldehyd aufgrund seiner geringeren Toxizität darstellt.

Formaldehyd und Glyoxal sind strukturell sehr ähnliche Moleküle. Jedoch weist Formaldehyd mit seinem um Größenordnungen niedrigeren IC₅₀-Wert sowohl bei der Basalatmung als auch bei der entkopplerstimulierten Atmung eine höhere Hemmwirkung auf die Atmung der HaCaT-Zellen auf. Der Keratinozytenatmungstest hat damit ein weiteres Argument geliefert, Glyoxal als Ersatzstoff für Formaldehyd einzusetzen. Die Tabelle 30 zeigt die Gegenüberstellung der IC₅₀-Werte von Formaldehyd und Glyoxal.

Tabelle 30: Vergleich der IC₅₀-Werte von Formaldehyd und Glyoxal

Substanz	IC ₅₀ -Wert (Basalatmung)	IC ₅₀ -Wert (entkoppelte Atmung)
Formaldehyd	1,27 ± 0,09 mM	0,68 ± 0,1 mM
Glyoxal	62,8 ± 4,4 mM	17,2 ± 4,2 mM

· 1,1,1-Trichlorethan

1,1,1-Trichlorethan ist ein relativ kleines, dreifach chloriertes Molekül. Es weist eine geringe Toxizität auf, wenn es Versuchstieren oral, durch Inhalation oder Hautkontakt appliziert wird. Hauptsächlich wirkt es auf das Nervensystem, aber auch geringe Leberschädigungen wurden in Tierversuchen festgestellt. Die Mutagenität von 1,1,1-Trichlorethan wurde in Bakterien untersucht. Daten von Säugerzellen liegen nicht vor. Ebenso unbekannt sind Langzeitwirkungen von 1,1,1-Trichlorethan. Der prinzipielle Effekt auf den Menschen besteht in der Depression des zentralen Nervensystems. Außerdem wurden Fälle von Sklerose mit 1,1,1-Trichlorethan in Verbindung gebracht. [¹²⁷, ¹²⁸, ¹²⁹]

Im Keratinozytenatmungstest ist 1,1,1-Trichlorethan eine stark hemmende Substanz. Da diese Verbindung häufig auch im Abwasser vorkommt, ist die Frage der Wassergefährdung ebenfalls relevant. Aus diesem Grund wurde 1,1,1-Trichlorethan an Fischen getestet. Der LC₅₀-Wert (96h) beträgt 55 mg/l, das sind weniger als die Hälfte des IC₅₀-Wertes der Basalatmung mit 120 mg/l. Vergleicht man diese beiden Testergebnisse miteinander, so ist für diese Substanz der Keratinozytenatmungstest der unempfindlichere.

5.1.3. Andere Proben im Keratinozytenatmungstest

· Hydrosalin

Der Wasserzusatz in Schwimmbädern Hydrosalin zeigte im empfohlenen Einsatzbereich von 0,03% im Keratinozytenatmungstest keine Schädigung. Diese Substanz war die einzige der getesteten Substanzen und Extrakte, die ihre Wirkung nicht sofort nach Zugabe in die Meßkammer ausübte. Erst nach drei Minuten konnte eine konstante Wirkung beobachtet werden. Dies spricht dafür, daß sich Hydrosalin bei Kontakt mit Wasser verändert bzw. eine Reaktion eingeht. Da vom Hersteller keine Angaben zur chemischen Struktur gemacht wurden, konnten auch keine Vermutungen über eventuelle Reaktionsmechanismen gemacht werden.

Hydrosalin ist ein Beispiel dafür, daß die Prüfung auch anderer nichttextiler Proben durch den Keratinozytenatmungstest sinnvoll und möglich ist.

· Kosmetikinhaltsstoffe

Kosmetika kommen mit der Haut bei Anwendung in unmittelbarem Kontakt. Aus diesem Grund scheint der Keratinozytenatmungstest gut geeignet und ergänzend möglich für die Toxizitätserfassung, obwohl es schon eine ganze Reihe von Biotests zur Messung der Toxizität für Kosmetika gibt. [¹³⁰,¹³¹,¹³²]

Die Ergebnisse des Keratinozytenatmungstests der fünf untersuchten Proben liefern keine vernünftigen Aussagen über die Toxizität dieser getesteten Kosmetikinhaltsstoffe. Aufgrund zu starker Schwankungen der Atmungshemmung bei einer Festkonzentration lassen sich keine Schlußfolgerungen zur Stärke der Schädigung ziehen. Sicherlich sind diese fünf Proben nicht repräsentativ für alle Kosmetikinhaltsstoffe, da vom Hersteller auch keine genauen Angaben über die Auswahlkriterien, Herkunft, chemische Struktur und Zusammensetzung gemacht wurden. Prinzipiell ist der Keratinozytenatmungstest jedoch durchaus geeignet zur Testung von Kosmetika.

· **Abwasser**

Die Untersuchung von Gerbereiabwasserproben ergab Abstufungen in der Hemmwirkung der Atmung von Keratinozyten. Besonders die unbehandelte Gerbereiabwasserprobe 66.14 weist im Vergleich zu den anderen Abwasserproben eine starke Hemmung auf. Da der Leuchtbakterientest viel sensitiver bei diesen Proben reagierte, ist der Keratinozytentest für die Untersuchung von Abwässern nicht 100 %ig als geeignet anzusehen und ein anderer Biotest wäre empfehlenswerter. Außerdem sind Algen, Fische oder andere Wasserorganismen sinnvollere Testobjekte zur Feststellung der Wasserqualität als Keratinozyten.

· **Die Proben O06 (Softener) und O07 (Printpasta)**

Weitere zwei Proben, die von der Firma ecb ONLINE Analysetechnik GmbH zur Verfügung gestellt wurden, sind Textilveredlungsstoffe. Über die genaue Herkunft und die chemische Zusammensetzung wurden keine Angaben gemacht. Es wurden von beiden Proben die Dosis-Wirkungskurven und die IC_{50} -Werte für die Basalatmung ermittelt. Die Probe O06 ist geringfügig stärker hemmend als die Probe O07. Bei der CCCP-entkoppelten Atmung war jedoch die Streuung der Werte zu groß, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten.

Da keine Angaben über die Konzentrationen vorlagen, mit denen der Softener und die Printpasta üblicherweise eingesetzt werden, ist es nicht möglich, Aussagen über die Endkonzentration in der Textilie zu treffen. Daher lassen sich auch keine Abschätzungen über die möglichen Schadwirkungen dieser Proben ausgehend von den Ergebnissen des Keratinozytenatmungstests treffen.

• **Buch-Extrakt**

Beim Papierherstellen und Drucken werden eine Vielzahl von Chemikalien verwendet, mit denen der Benutzer von Presseerzeugnissen in Berührung kommt und die unter Umständen toxisch wirken können. Biotests sind prinzipiell geeignet für die Erfassung einer möglichen Schädigung durch solche Stoffe. [¹³³,¹³⁴]

Das „Wörterbuch für Grundschul Kinder“ des Cornelsen Verlages, das hier untersucht wurde, wurde 1996 in der ersten Auflage gedruckt und sollte in größerem Umfang an den Schulen eingesetzt werden. Bei diesem Buch handelt es sich um ein Kinderbuch mit orangefarbenem Plastikumschlag.

Nach Auslieferung im Raum Osnabrück wurden bei einigen Kindern, die mit diesem Buch in Berührung kamen, Hautreizungen festgestellt. Um die Ursachen für diese Hautreizungen zu finden, sind chemisch-analytische Verfahren eingesetzt worden, parallel dazu sollten Inhaltsstoffe des Buches mit Hilfe des Keratinozytenatmungstests überprüft werden.

Der IC_{50} -Wert konnte für die Basalatmung abgeschätzt und für die entkoppelte Atmung berechnet werden. Unbestritten ist, daß dieses Buch als unbelastet im Keratinozytenatmungstest einzustufen ist. Da beim Papierherstellen und -bedrucken viele flüchtige organische Substanzen verwendet werden, könnten diese wahrscheinlich für die Beschwerden der Kinder verantwortlich sein. Durch die Extraktion im wäßrigen Medium („Schweiß sauer“) werden gerade diese Substanzen nicht oder nur in geringer Konzentration erfaßt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den nichthemmenden Verlauf der Untersuchungen ist, daß der Auslöser der aufgetretenen Hautreizungen, die dieses Buch verursachte, nicht atmungsschädigend im Keratinozytenatmungstest wirkt.

5.2. Biotestmethoden

Eine Vielzahl von Tests, wie z. B. der DRAIZE-Test, werden zur Überprüfung von Schadstoffen und ihrer Wirkungen bei Menschen und Tieren eingesetzt [135]. Um ein Testverfahren zu etablieren, muß man auch auf andere vergleichbare Testmethoden eingehen. Dazu gehören sowohl der Vergleich der Wirkungsprinzipien von anderen in vivo bzw. in vitro Testverfahren als auch der Vergleich der erhaltenen Werte. Der Vergleich von Zytotoxizitätsmessungen an verschiedenen Zellarten und in vivo Daten legt den Schluß nahe, daß kultivierte Keratinozyten für die Feststellung von Irritationen von Substanzen beim Menschen gut geeignet sind. Ebenso wurde herausgefunden, daß die Sensitivität in vitro höher ist als in vivo. [136, 137]

Einige ausgewählte Beispiele für andere Testmethoden sollen im folgenden mit dem Keratinozytenatmungstest verglichen werden.

• DRAIZE-Test

Der DRAIZE-Test gehört zu den ältesten Verfahren um das Ausmaß der Toxizität von bestimmten Substanzen zu bestimmen. Dabei werden als Testobjekte Kaninchen verwendet. In ein Auge des Tieres wird die zu untersuchende Substanz verbracht. Das andere Auge dient als Kontrolle. Nach einer bestimmten Einwirkzeit (ca. 1 Stunde bis zu 1 Woche) wird die Reaktion der verschiedenen Bestandteile des Auges (Horn-, Regenbogen- und Bindehaut) festgestellt. Dabei wird in Rötung, Schwellung, Sekretabsonderung bzw. Trübung und betroffene Fläche unterschieden. Die Bewertung erfolgt über ein Punktesystem. Die Nachteile des DRAIZE-Test sind die hohe Anzahl benötigter Kaninchen, um zu einer auswertbaren Dosis-Wirkungsbeziehung zu gelangen und die physische Belastung der Versuchstiere. Weitere Nachteile sind die lange Einwirkzeit der Substanzen, die Verwendung lebender Tiere und die eingeschränkte Möglichkeit der Übertragung der gewonnenen Ergebnisse vom Tier auf den Menschen.

Obwohl es eine Reihe von Alternativmethoden gibt, wird dieser Test traditionell bedingt noch relativ häufig, z. B. in der Kosmetikindustrie angewandt. [138, 139]

Vergleicht man alternative Testmethoden mit dem DRAIZE-Test, so zeigen sich diese sogar teilweise sensitiver. [¹⁴⁰, ¹⁴¹]

Da Textilschadstoffe in erster Linie über die Haut aufgenommen werden, hat insbesondere der Keratinozytenatmungstest gegenüber der Methode nach DRAIZE den Vorteil, daß menschliche Hautzellen im Mittelpunkt des Testes stehen. Auch der zeitliche und finanzielle Aufwand ist geringer für die Messung beim Keratinozytenatmungstest im Gegensatz zum DRAIZE-Test.

• AMES-Test

Eine ganze Reihe der bei der Textilherstellung verwendeten Chemikalien stehen unter dem Verdacht mutagen zu wirken. Zur Erfassung dieser Wirkung von Substanzen wird der AMES-Test angewendet. Bei diesem Testverfahren werden die Textilien vier Stunden bei Raumtemperatur in DMSO extrahiert, und diese Extrakte in verschiedenen Verdünnungsstufen mit den AMES-Bakterienstämmen (*salmonella typhimurium*, TA 98 und TA 100) in Kontakt gebracht. Übersteigt die Spontanmutationsrate des mit dem Textilextrakt in Berührung stehenden Teststammes die des Kontrollstammes um mehr als das Doppelte, so ist von der Mutagenität der untersuchten Probe auszugehen. Dieses Ergebnis ist jedoch nur bei Vorliegen reproduzierbarer Dosis-Wirkungsbeziehung des Textilextraktes gesichert.

Zur Untersuchung der Textilien im Keratinozytenatmungstest wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Zur Anwendung kamen Schweißextrakte (DIN 54020) und DMSO-Extrakte. Die Schweißextrakte ergaben durchweg keine Hinweise auf Mutagenität, während die DMSO-Extrakte mutagen wirkten. Dadurch wurde auf eine Schweiß- bzw. Wasserunlöslichkeit der verwendeten mutagenen Substanzen geschlossen. [¹⁴²]

Beide Tests lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen. Beim Keratinozytenatmungstest wird die Wirkung auf die Zellatmung als allgemein zytotoxischer Parameter, beim AMES-Test die Veränderung der Mutationsrate als Parameter für die Mutagenität gemessen. Da in beiden Tests unterschiedliche Schadwirkungen untersucht werden, ergänzen sie sich jedoch gut.

• DMS-Test

Auf der Suche nach Alternativmethoden zu der bisherigen Prüfung auf Schadstofffreiheit von Textilien wurde ein weiteres biologisches Testverfahren, der DMS-Test entwickelt. Bei diesem Test mißt man die Hemmung der Reaktion von Dimethylsulfid aus Dimethylsulfoxid in Bakterienstämmen. Die zerkleinerte Textilie wird in einem Ultraschallbad extrahiert. Der Extrakt, der die wasserlöslichen Komponenten erfaßt, wird konserviert um mitgeschleppte Mikroorganismen abzutöten. Danach werden die DMS-Test-Bakterien mit definierter Keimzahl in eine Nährstofflösung mit Dimethylsulfoxid gegeben und mit der Probe versetzt. Nach einer zwanzigstündigen Inkubationszeit bei 25°C wird gaschromatographisch die Menge an leichtflüchtigem Dimethylsulfid gemessen. Der ermittelte Meßwert gibt das Ausmaß der Hemmung der Schadstoffe in der Textillösung im Vergleich zur Kontrolle an.

Im Vergleich mit etablierten Tests an Daphnien und an Goldorfen bei der Messung von Schwermetallionen zeigte sich, daß der DMS-Test wesentlich empfindlicher reagierte. Die Untersuchungen an unterschiedlichen Textilien zeigten Abstufungen in den Ergebnissen, wobei bei den als „Öko-Tex-Standard“ gekennzeichneten Textilien keine Hemmungen gefunden wurden. [¹⁴³]

Um die Ergebnisse mit dem Keratinozytenatmungstest direkt zu vergleichen, müßten die Textilextrakte nach DIN 54020 hergestellt werden. Zu beachten wäre weiterhin, daß die Messung einer Reaktionshemmung bestimmter Bakterienstämme gegenüber der Messung der Atmungshemmung von menschlichen Hautzellen die Vorgänge beim Tragen von Textilien nur bedingt widerspiegelt. Welcher Biotest sich jedoch in Zukunft durchsetzen wird, bleibt abzuwarten und ist nicht zuletzt auch von den Kosten und dem Arbeitsaufwand abhängig.

• MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Mitochondrienfunktionstest. Hier wird ausgenutzt, daß ein gelber wasserlöslicher Farbstoff (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in die Zellen der Fibroblastenzelllinie 3T3 eindringen kann und dort durch intakte Mitochondrien, die ein Membranpotential besitzen, reduziert wird, was zu einer stark

violetten Färbung führt. Diese Reaktion zeigen nur intakte Zellen. Die Zellen werden mit Substanzlösungen verschiedener Konzentrationen vierundzwanzig Stunden inkubiert. Anschließend wird der Farbstoff zugegeben und nach einer Einwirkungszeit von zwei Stunden der Gehalt an reduziertem Farbstoff im Vergleich zur Kontrolle photometrisch bestimmt. Dieser Test wurde bereits zum orientierenden Screening verschiedener Chemikalien an HaCaT-Zellen angewendet. [144]

Bei der Untersuchung von Tensiden wurde gezeigt, daß ein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des MTT-Tests und denen des Keratinozytenatmungstests besteht. [145] Wahrscheinlich liegen ähnliche Wirkungsmechanismen zugrunde: Die Substanzen müssen sowohl durch die Zellmembran, als auch durch die Mitochondrienmembran diffundieren um eine Schädigung zu erzielen.

Der MTT-Test ist in einigen Zellzuchtlaboratorien schon etabliert und mit relativ wenig Aufwand zu handhaben. Die Kosten liegen für beide Tests ungefähr in der gleichen Größenordnung, während der zeitliche Aufwand für den Keratinozytenatmungstest etwas höher liegt, da beim MTT-Test mehrere Proben gleichzeitig gemessen werden können. Der MTT-Test zeigte sich empfindlicher als der Keratinozytenatmungstest. Dies ist jedoch nicht unbedingt ein Vorteil, denn die Ergebnisse müssen in vernünftiger Relation gesehen werden.

• Leuchtbakterientest

Dieses standardisierte Verfahren (DIN 38412; Teil 34) wird hauptsächlich zur Untersuchung kommunaler und industrieller Abwässer genutzt. Dazu wird die Leuchtbakterienkultur mit der Probenlösung versetzt, die Abnahme der Leuchtintensität nach einer Kontaktzeit von 30 Minuten mittels Luminometer bestimmt und mit einem Kontrollansatz verglichen. Die so bestimmte relative Leuchtintensitätshemmung dient als Maß für die Belastung der Abwässer. Als Modellorganismus dient Photobakterium phosphoreum NRRL B - 11177.

Sowohl bei den Leuchtbakterien als auch bei den HaCaT-Zellen dient eine lebenswichtige Funktion der Zelle (Leuchten bzw. Atmung) als Kriterium für das Ausmaß der allgemein zytotoxischen Wirkung von zugesetzten Substanzlösungen bzw. Extrakten und ihren

Verdünnungen. Obwohl ein Photobakterium und eine menschliche Hautzelle nicht sehr viele Gemeinsamkeiten haben, wurden einige Textilextrakte bzw. Substanzlösungen ebenfalls im bereits standardisierten Leuchtbakterientest untersucht, um eventuelle Korrelationen zu prüfen.

• **Daphnientest**

Ein weiteres standardisiertes Testverfahren (DIN 38412; Teil 11) zur Abwasseruntersuchung ist der Daphnientest. Als Modellorganismus dient der Kleinkrebs *Daphnia magna* STRAUS. Als Maß für die Wirkung von Wasserinhaltsstoffen dient die Angabe der Konzentration bzw. Verdünnungsstufe des Testgutes, in der nach Ablauf der Testzeit von 24 Stunden 50 % der Daphnien schwimmunfähig geworden sind.

Der Daphnientest ist wie der Leuchtbakterientest hauptsächlich für die Untersuchung von Abwässern geeignet und beide sind im Gegensatz zum Keratinozytenatmungstest Langzeittests. Als Maß für die allgemein zytotoxische Wirkung von zugesetzten Substanzlösungen dient die optisch leicht überprüfbare lebensnotwendige Schwimmfähigkeit der Daphnien. Für die Simulation der Tragesituation von Textilien ist dieser Test natürlich wenig geeignet. Dennoch wurden einige Textilextrakte und Substanzen im Daphnientests geprüft und mit dem Keratinozytenatmungstest verglichen.

• **Vergleich einiger Textilien im Keratinozytenatmungstest, Leuchtbakterien- und Daphnientest**

Da alle drei verwendeten Biotests die allgemein zytotoxischen Wirkungen der Textilextrakte erfassen, wurde anhand einiger Textilproben ein direkter Vergleich der Ergebnisse des Keratinozytenatmungstests mit den anderen Biotests vorgenommen. Die Herkunft der Textilproben ist sehr unterschiedlich (Firma Steilmann, Firma Jurichem, Virchow-Klinikum), um ein breites Spektrum erfassen zu können. Mit Ausnahme zweier Proben zeigte sich der Keratinozytenatmungstest empfindlicher. Es empfiehlt sich verschiedene Biotests als Ergänzung und nicht als konkurrierende Tests zu verwenden, da sie auf unterschiedlichen Wirkungsmechanismen basieren. Im Falle der Untersuchung von Textilextrakten ist der Keratinozytenatmungstest am geeignetsten. Für die

Abwasseruntersuchung dagegen sind Kleinkrebse und im Wasser lebende Bakterien bessere Modellorganismen als humane Keratinozyten.

Tabelle 31: IC₅₀- bzw. EC₂₀-Werte einiger Textilproben im Keratinozytenatmungs-, Leuchtbakterien- und Daphnientest

Probe	IC ₅₀ -Wert des Keratinozytenatmungstests [ppm]	EC ₅₀ -Wert des Leuchtbakterientests [ppm]	EC ₂₀ -Wert des Daphnientests [ppm]
S38	44	11700	2200
S39	160	55000	16700
S40	7200	>50000	8300
11s	80000	31200	12500
12s	22000	10000	16700
Jurichem rot	8500	>50000	-
Jurichem mittelblau	14000	>50000	16700
Kittel neg.	7500	10500	25000
Kittel pos.	9000	16200	16700

(*) Beim Daphnientest bezieht sich der EC₂₀-Wert auf die Konzentration, bei der nach Testablauf von 24 h 20% der Daphnien schwimmunfähig sind. Die Leuchtbakterien- und Daphnientests wurden am LFU Schönwalde von Frau Dr. Knöpke durchgeführt

· Vergleich einiger Substanzen im Keratinozytenatmungstest und Daphnientest

Um den Keratinozytenatmungstest mit einem etabliertem Biotest zu vergleichen, wurden die IC₅₀-Werte der Basalatmung den EC₅₀-Werten aus dem Daphnientest gegenübergestellt.

Tabelle 32: IC₅₀-Werte des Keratinozytenatmungstests und die EC₅₀-Werte des Daphnientests

Substanz	EC ₅₀ - Daphnientest	IC ₅₀ – Keratinozytenatmungstest (Basalatmung)
o-Kresol	30,3 mg/l	243 mg/l
m-Kresol	11,4 mg/l	175 mg/l
p-Kresol	1,4 mg/l	> 1800 mg/l
1,1,1-Trichlorethan	33,0 µg/l	120 mg/l
Formaldehyd	8,3 mg/l	38 mg/l
Glyoxal	754 mg/l	117 mg/l

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Tests miteinander, so kann man bei diesen Substanzen den Daphnientest als den empfindlicheren der beiden Biotestverfahren betrachten, jedoch konnte kein Korrelationsfaktor zwischen beiden Tests ermittelt werden. Die einzige Ausnahme ist Glyoxal, es reagiert im Keratinozytenatmungstest wirksamer.

Innerhalb der Kresolgruppe liegen die Ergebnisse von o- und m-Kresol bei beiden Tests in der gleichen Größenordnung und m-Kresol ist mit seinem niedrigeren IC₅₀-Wert in beiden Fällen etwas wirksamer als o-Kresol. Nur p-Kresol bildet eine Ausnahme. Während es im Daphnientest das wirksamste der drei Kresole ist, zeigt es im Keratinozytenatmungstest die geringste Hemmwirkung, ein weiterer Hinweis auf einen anderen Toxizitätsmetabolismus.

· Vergleich verschiedener Biotestparameter von Glyoxal

Anhand des Beispiels Glyoxal soll der IC₅₀-Wert der Basalatmung des Keratinozytenatmungstests mit den EC₅₀-Werten des Leuchtbakterien- und des Daphnientests bzw. mit dem LC₅₀-Wert des Goldorfontests verglichen werden. Die Tabelle 33 zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Biotests für Glyoxal. [¹⁴⁶]

Tabelle 33: Verschiedene Biotestparameter von Glyoxal

Test	Parameter	Wert
Keratinozytenatmungstest	IC ₅₀ (Basalatmung)	117 mg/l
Leuchtbakterientest	EC ₅₀ (5min)	754 mg/l
Daphnientest	EC ₅₀ (24h)	430 mg/l
Goldorfontest	LC ₅₀ (48h)	680 mg/l

Vergleicht man die Werte der einzelnen Tests miteinander, so stellt sich der Keratinozytenatmungstest mit dem geringsten Halbwert bei Glyoxal als der empfindlichste dieser Biotests dar. Obwohl Glyoxal im Keratinozytenatmungstest sofort nach Zugabe zu den Zellen wirkt, ist die schädigende Wirkung stärker als in den anderen Tests deren Einwirkzeit länger ist. Einerseits könnte die Permeabilität der Zellmembran der HaCaT-Zellen höher sein als die der anderen Testorganismen. Andererseits kann die

atmungshemmende Wirkung von Glyoxal auch viel größer sein als die der Leuchtfähigkeitshemmung bzw. der Schwimffähigkeitsbeeinträchtigung.

· **Vergleich verschiedener Biotestparameter von Biphenyl-2-ol**

Wie der Vergleich mit dem Leuchtbakterien- und dem Daphnientest zeigt, ist der Keratinozytenatmungstest bei dieser Substanz eine Größenordnung. Obwohl eine sehr starke Hemmung der Zellatmung zu verzeichnen ist, ist die Wirkung auf die Kleinstorganismen deutlich stärker. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die Toxizität von Biphenyl-2-ol ziehen. Zwar ist Biphenyl-2-ol größtenteils wasserunlöslich, kann aber nicht nur in Textilien, sondern auch durch den vielseitigen Einsatz im Abwasser vorkommen. Daher sind die Ergebnisse dieser Biotests von großer Relevanz für andere Lebensbereiche. Auf jeden Fall ist die Verbindung Biphenyl-2-ol stark zellschädigend und daher sollte ihr mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden.

Tabelle 34: IC₅₀/EC₅₀-Werte von Biphenyl-2-ol in verschiedenen Biotests

IC₅₀-Wert des Keratinozytenatmungstests (Basalatmung)	EC₅₀-Wert des Leuchtbakterientests (30 min.)	EC₂₀-Wert des Daphnientests (24 h)
154 µM	18 µM	16 µM

(*) Beim Daphnientest bezieht sich der EC₂₀-Wert auf die Konzentration, bei der nach Testablauf von 24 h 20% der Daphnien schwimmfähig sind. Die Leuchtbakterien- und Daphnientests wurden am LFU Schönwalde von Frau Dr. Knöpke durchgeführt

· **Künstliche Hautmodelle**

Künstliche Hautmodelle stellen eine mögliche Alternative zu Tierversuchen bei der Resorption von Kosmetika und Textilinhaltsstoffen dar. Mit diesem Modell kann man wahrscheinlich die realen Verhältnisse beim Tragen von Textilien am besten simulieren.

Eine mögliche Ersatzhaut besteht aus gezüchteten Keratinozyten, die auf Gewebe: isoliertem Korium oder in Kollagen eingebetteten Fibroplasten wachsen. Diese Keratinozyten verhornen an der Luft-Medium-Grenze. Nur die Barrierefunktion ist bis zum jetzigen Forschungsstand geringer, als bei der normalen gesunden Haut des

Menschen. Die Zusammensetzung der künstlich gezüchteten Haut ist verändert, beispielsweise entstehen weniger Ceramide. Die Permeabilität im Vergleich zu den bisher verwendeten in vivo Verfahren ist ebenfalls verschieden. Die Differenzen, die bei der Permeabilität von Wirkstoffen durch die Haut von Schweinen, Ratten und Mäusen im Vergleich zum Menschen entstehen, beruht auf der Tatsache, daß die verschiedenen Organismen eine verschiedene Hautdicke und unterschiedliche Anzahl von Haarfollikeln auf ihrer Außenhaut besitzen. [147]

Geeignet scheint das Kunsthautmodell besonders für die Erfassung allergischer Hautreaktionen, die vom Keratinozytenatmungstest nicht erfaßt werden können. [148, 149]

Das Hautäquivalent ist als in vitro Modell für Toxizitätsbestimmungen von applizierten Substanzen gut anwendbar. [150]

Die Entwicklung künstlicher Hautmodelle muß aber noch weiter betrieben und optimiert werden, so daß die Schadstoffmessung an Keratinozyten aus einer stabilen Zelllinie erfolgen kann, welches zu besser auswertbaren und vergleichbaren Ergebnissen führen würde.

· **Epikutantest**

Ein bereits 1895 eingeführtes Verfahren zur Bestimmung der Schadwirkungen von Substanzen ist der Epikutantest (Patch-Test). Der Mensch selbst dient als Versuchsobjekt. Es werden kleine Pflaster mit einer geringen Menge der zu testenden Substanzlösung auf die Haut, meist auf die Rückenpartie, verbracht. Die Testdauer liegt zwischen einem Tag und einer Woche. Das Ablesen der Ergebnisse erfolgt 20 bis 60 Minuten nach Entfernen der Pflaster, im Zweifelsfalle nochmals nach 24 Stunden. Dabei können Rötungen der Haut in unterschiedlicher Stärke auftreten.

Der Epikutantest ist kein absolut sicherer Test. Es wird nur eine kleine Hautpartie ausgewählt, so daß eine positive bzw. negative Reaktion nicht notwendigerweise auf den ganzen Körper übertragbar ist. Der Test ist einfach und ohne apparativen Aufwand durchführbar. Außerdem wird er direkt beim Menschen angewandt, damit entfällt die eingeschränkte Übertragbarkeit der Testergebnisse anderer Biotests vom Tier auf den Menschen. Nachteilig ist, daß der Epikutantest stark von der individuellen, genetisch

bedingten Disposition abhängt. Er hat in den meisten Fällen nur für die getesteten Personen Gültigkeit, da die meisten Chemikalien ein sensibilisierendes Potential besitzen und jede Haut unterschiedlich irritabel ist. Die Ergebnisse des Epikutantests sind außerdem abhängig von der Widerstandsfähigkeit, daß heißt der Dicke und Beschaffenheit des Hautgewebes an der Kontaktstelle. [¹⁵¹]

Mit dem Keratinozytenatmungstest läßt sich der Epikutantest nur bedingt vergleichen. Beim Epikutantest werden außer der Atmungshemmung der Hautzellen noch weitere Auswirkungen, wie beispielsweise Zell-Zell-Wechselwirkungen erfaßt.

5.3. Vor- und Nachteile des Keratinozytenatmungstests

Die Keratinozytenzelllinie HaCaT ist das Testobjekt dieses Biotests. Wegen der Nutzung humaner Keratinozyten ist eine hohe Übereinstimmung mit der tatsächlichen Wirkung von Textilien auf die menschlichen Hautzellen gegeben. Die Schweißextraktion nach DIN 54020 stellt eine gute Tragesimulation dar.

Im Keratinozytenatmungstest werden im Gegensatz zur reinen chemischen Analytik auch Kombinationswirkungen erfaßt. Dies erlaubt Aussagen über die Konzentrationsangaben von enthaltenen Verbindungen hinaus. Damit kann auch die Wirkung von Substanzen unterhalb ihrer individuellen Nachweisgrenze erfaßt werden.

Außer der generellen Aussage über die Hemmung einer Probe in diesem Test, lassen sich auch abgestufte Bewertungen über den Grad der Atmungshemmung machen. Durch Zugabe von verschiedenen Standardwirkstoffen wie Oligomycin, CCCP und Antimycin A können Rückschlüsse gezogen werden, welcher Teilschritt der Atmungskette gehemmt wird.

Mögliche Fehler- bzw. Störquellen für den Keratinozytenatmungstest sind andere sauerstoffverbrauchende Prozesse, die nicht zur Atmung der HaCaT-Zellen gehören. Nach Zugabe von Antimycin A kann dieser Sauerstoffverbrauch jedoch eliminiert werden.

Ist der Sauerstoffverbrauch pro Zeiteinheit nach Zugabe der Probe nicht konstant, so können nur bedingt Rückschlüsse auf die atmungsschädigende Wirkung gezogen werden, wie das Beispiel der Probe Hydrosalin zeigte.

Das Atmungsprofil der HaCaT-Zellen ist entscheidend für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Es muß gewährleistet sein, daß die Eigenschaften und Lebensfunktionen der Keratinozyten gleiche Bedingungen für den Atmungstest liefern. Es zeigte sich, daß in ca. 6 h Meßzeit das Profil relativ konstant bleibt und danach langsam abnimmt. Doppel- oder Mehrfachwerte sind meist nicht erforderlich, zur Überprüfung aber empfehlenswert.

Durch die unterschiedlichen Inhaltsstoffe der Textilproben verändert sich der pH-Wert des Schweißsimulates während der Extraktion. Durch Einstellung des pH-Wertes und der Osmolarität des fertigen Extrakts wird sichergestellt, daß die Zellen nicht durch eventuelle Osmolaritäts- oder pH-Wertdifferenzen geschädigt werden, sondern nur die toxischen Wirkungen der zu untersuchenden Proben erfaßt werden.

Nachteilig gegenüber echter Haut macht sich bemerkbar, daß keine Erfassung allergischer oder mutagener Reaktionen möglich ist, sondern nur Wirkungen auf die Zellatmung analysiert werden.

Da isolierte und nicht im Zellverband vorliegende Keratinozyten verwendet werden, kann bei der Messung die Barrierefunktion, wie sie bei natürlicher Haut vorkommt, nicht erfaßt werden. Die Barrierefunktion der Haut ist altersabhängig, körperregionsspezifisch und individuell unterschiedlich. Durch Verletzungen kann ihre Schutzfunktion beeinträchtigt sein. Durch die Verwendung isolierter Zellen ist die Empfindlichkeit des Keratinozytenatmungstests gegenüber menschlicher Haut sogar erhöht.

Mit dem Keratinozytenatmungstest können potentielle Schadstoffe identifiziert werden. Durch die Zusammenarbeit mit der Firma ecb ONLINE Analysetechnik GmbH, die selbst analytische Textiluntersuchungen durchführten, wurde man auf Biphenyl-2-ol aufmerksam. Diese Substanz kommt relativ häufig in Textilien vor und ruft in den verwendeten Konzentrationen meßbare Hemmungen der Keratinozytenatmung hervor.

Die Belastungen bei der Herstellung und Veredlung von Textilien können mittels Keratinozytenatmungstest nachgewiesen werden. Am Beispiel der Herstellung der

Lyocell-Faser wurde die atmungshemmende Wirkung der Faser durch die technologischen Prozesse aufgezeigt.

Es kann festgestellt werden, daß die Anwendungsmöglichkeiten des Keratinozyten-atmungstest vielfältig sind. Er kann für die Testung aller Proben genutzt werden, die mit der menschlichen Haut in Kontakt kommen: z. B. Textilien, Kosmetika, Lederwaren, äußerlich angewendete Arzneimittel.

Der große Vorteil dieses Tests ist die Alternative zum Tierversuch und sein Einsatz zur Ergänzung der chemischen Analyse. Parallel dazu sind weitere Biotests zur Erfassung möglichst vielfältiger Toxizitätsparameter empfehlenswert.