

**Aus dem
Institut für Toxikologie der Bayer Schering Pharma AG, Berlin**

**Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Untersuchung des DNA-Addukt Bildungspotentials
von ausgewählten Pharmazeutika**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Claudia Ehrentraut
Tierärztin aus Bielefeld**

**Berlin 2008
Journal-Nr.: 3250**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. H. Fink
Zweiter Gutachter: Herr Prof. Dr. W. Kuhnz
Dritter Gutachter: PD Dr. Michael Veit

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dna, binding, dna adducts (MeSH), rats, liver, kidneys, culture techniques,
phosphorus radioisotopes (MeSH), thin layer chromatography, steroids

Tag der Promotion: 04. Dezember 2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-563-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Coverbild © nicolasjoseschirado - Fotolia.com

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

mens und **buch** verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@mensundbuch.de – www.mensundbuch.de

Meinen Eltern

Inhalt

Abkürzungen	III
1 Einleitung	1
1.1 Untersuchung des Fremdstoffmetabolismus in <i>in vitro</i>-Modellen	5
1.1.1 Vor- und Nachteile der üblichen <i>in vitro</i>-Systeme für Lebermetabolismusuntersuchungen	6
1.1.2 Gewebeschnitte	9
1.1.2.1 Gewebeschnitte in der Vergangenheit	9
1.1.2.2 Der Krumdieck-Tissue-Slicer	10
1.1.2.3 Der Brendel/Vitron Tissue Slicer	11
1.1.2.4 Schnittinkubation	11
1.1.2.5 Charakteristika kultivierter Leberschnitten	16
1.1.2.6 Anwendung von Leberschnitten in der Toxikologie und Pharmakologie	18
1.2 DNA-Addukte, ein erster Schritt der Krebsentstehung	21
1.2.1 Methoden zur Detektion von DNA-Addukten	22
1.2.2 Trennung der DNA-Addukte	24
2 Fragestellung: Arzneimittel – potentielle Adduktbildner?	25
2.1 Substanzauswahl:	27
2.2 Substanzaufteilung anhand von IARC Kategorien, DEREK Beurteilungen und Literatur	28
3 Material und Methoden	31
3.1 Tiere	31
3.1.1 Ratten	31
3.1.2 Affen	31
3.2 Wasser	31
3.3 Herstellung und Inkubation von Leberschnitten	32
3.3.1 Kulturmedium und Lösungen.....	32
3.3.2 Geräte.....	32
3.3.3 Herstellung der Leber- bzw. Nierenschnitte.....	33
3.3.4 Inkubation der Leberschnitte mit Testsubstanzen.....	35
3.3.5 Bestimmung des intrazellulären Kaliumgehaltes.....	36
3.4 DNA-Isolierung	37
3.4.1 Chemikalien	37
3.4.2 Geräte	38
3.4.3 Herstellung der Lösungen	38
3.4.4 Isolierung der DNA.....	42
3.4.4.1 Hydrolyse der Zellproteine.....	43
3.4.4.2 RNase-Behandlung	43
3.4.4.3 DNA-Extraktion	43
3.4.4.4 DNA-Fällung	43
3.4.5 Photometrische DNA-Quantifizierung	44
3.4.6 Reinheitskontrolle der DNA	44
3.5 DNA-Hydrolyse und Adduktanreicherung	45
3.5.1 Chemikalien	45
3.5.2 Geräte	45
3.5.3 Herstellung der Lösungen	46
3.5.4 Hydrolyse der DNA	48
3.5.5 Anreicherung.....	49
3.5.5.1 Behandlung der Nukleotide mit Nuklease P1	49
3.5.5.2 Butanolextraktion	50
3.6 Technik des ³²P-Postlabeling	52
3.6.1 Chemikalien	52
3.6.2 Geräte	52
3.6.3 Herstellung der Lösungen	52
3.6.4 Arbeiten mit [- ³² P]-ATP.....	53
3.6.5 Markierung der Nukleotide mit [- ³² P]-ATP.....	54

3.7	Chromatographie der Addukte.....	55
3.7.1	Chemikalien	55
3.7.2	Geräte	55
3.7.3	Herstellung der Puffer	56
3.7.4	Vorbereitung der Polyethylenimin (PEI)-Cellulose-Platten	56
3.7.4.1	Reinigung der PEI-Cellulose-Platten	56
3.7.4.2	Markierung und Beschriftung der Platten	57
3.7.4.3	Lagerung der PEI-Cellulose-Platten	58
3.7.5	Dünnschichtchromatographie der Addukte.....	58
3.7.6	Eindimensionale Dünnschichtchromatographie des Markierungsansatzes	61
3.7.7	Quantifizierung der Addukte.....	63
3.7.7.1	Radioluminographie der Chromatogramme	63
3.7.7.2	Visualisierung der DNA-Addukte	64
3.7.7.3	Auswertung der DNA-Adduktspots	65
3.8	Testsubstanzen	68
3.8.1	Auswahlkriterien	68
3.8.2	Einteilung.....	68
3.8.2.1	IARC (International Agency for Research on Cancer)	68
3.8.2.2	DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Toxicological Knowledge)	71
3.9	Kontrollsubstanzen.....	72
4	Ergebnisse	73
4.1	Bestimmung des DNA-Adduktlevels von ausgewählten Pharmazeutika	73
4.1.1	Ergebnisse der Gruppe 1	74
4.1.1.1	IARC 1	74
4.1.1.2	IARC 2A.....	97
4.1.1.3	IARC 2B.....	109
4.1.2	Ergebnisse der Gruppe 2	114
4.1.3	Ergebnisse der Gruppe 3	134
5	Diskussion.....	183
5.1	DNA-Addukte - ein erster Schritt der Krebsentstehung	200
5.2	Methodendiskussion.....	205
5.2.1	Altersbedingte Einflüsse auf die Adduktbildung.....	207
5.2.2	Fütterungsbedingte Einflüsse auf die Adduktbildung	207
5.2.3	Geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Adduktbildung	207
5.2.4	Speziesspezifische Einflüsse auf die Adduktbildung	208
5.3	Fazit.....	209
6	Zusammenfassung	212
7	Summary	214
8	Zitierte Literatur	216
9	Anhang	227
9.1	Danksagung.....	227
9.2	Selbständigkeitserklärung.....	228

Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AM	Arzneimittel
AMG	Arzneimittelgesetz
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BROD	7-Benzoxyresorufin O-Debenzylase
CA	Chromosomenaberrationstest
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CPA	Cyproteronacetat
CYP	Cytochrom Peroxidase
d.h.	das heisst
DL	Dominant Letaltest
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Dynamische Organkultursystem (dynamic organ culture system)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
EROD	7-Ethoxyresorufin O-Deethylase
Fa.	Firma
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GSH	Gesamtglutathion
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HNO	Hals Nasen Ohren
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hprt	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
INH	Isonikotinsäure Hydrazid
INS	Isonikotinsäure
IP	Imaging Plate
k.D.	keine publizierten Daten
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KH	Krebs-Henseleit-Puffer
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar
MBq	Mega Becquerel
μCi	Mikro Curie
MeV	Mega Elektronen Volt
mg	Milligramm

MG	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
min	Minute
MK	Mikrokerntest
ML	Mouse-Lymphoma-Test
mM	Millimolar
MN	Mikrococcus Nuklease
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometer
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid)
mV	Millivolt
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NTP	National Toxicology Program
nm	Nanometer
PAKs	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PEI	Polyethylenimin
PNK	Polynukleotidkinase
PROD	Pentoxy-Resorufin O-Dealkylase
PSL	Photostimulierte Lumineszenz
RAL	Relative Adduct Labeling
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
RTECS	Registry of toxic effects of chemical substances
SCE	Schwesterchromatidaustausch (Sister Chromatid Exchange)
sec	Sekunde
SPDE	Milzphosphodiesterase (Spleen Phosphodiesterase)
U	Einheiten (Units)
UDS	Unscheduled DNA Synthesis
U/min	Umdrehungen pro Minute
WPW	Wolff-Parkinson-White (Syndrom)
z.A	zum Ansetzen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Chemische Elemente und Verbindungen sind nach internationalem Standard abgekürzt.

1 Einleitung

In der Umwelt des Menschen befinden sich in großer Zahl künstlich erzeugte aber auch natürlich vorkommende Substanzen, welche Veränderungen der Erbsubstanz hervorrufen können.

Diese genotoxischen Substanzen stammen aus verschiedensten Substanzklassen und sind in vielen Anwendungsgebieten zu finden, z.B. als Lebensmittelinhaltsstoffe, in Pflanzenschutzmitteln, in Kosmetika, in Verunreinigungen von Luft und Wasser, sowie in **Arzneimitteln**.

Im Laufe des Lebens nimmt ein Mensch verschiedenste dieser genotoxischen Substanzen auf, die im Körper über Enzymsysteme metabolisiert werden können und sich zum Teil auch erst durch diese Metabolisierung zum schädlichen Agens entwickeln.

Der Fremdstoffmetabolismus, der die lipophilen Stoffe in hydrophile, ausscheidungsfähige Stoffe umwandelt, verläuft überwiegend in zwei Reaktionsschritten, nämlich der Phase I- und Phase II-Reaktion (Abbildung 1).

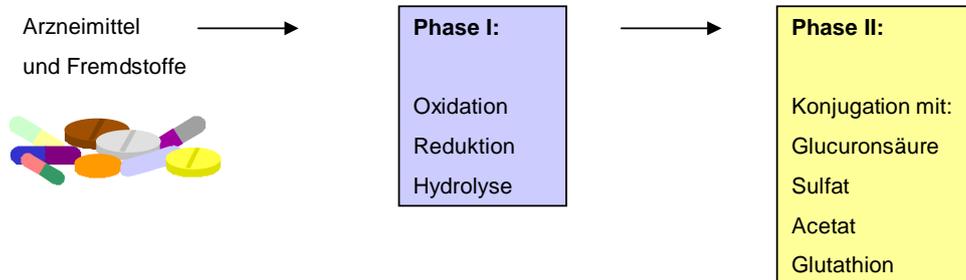


Abbildung 1: Biotransformation von Arzneimitteln und Fremdstoffen, (nach Estler, 1995)

Als Phase I-Reaktionen werden die Biotransformationsreaktionen bezeichnet, bei denen das Fremdstoffmolekül oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert wird. Von besonderer Bedeutung für die Biotransformation sind Oxidationsreaktionen, an denen Oxidasen, Monooxygenasen und Dioxygenasen beteiligt sind. Oxidasen oxidieren durch Entzug von Wasserstoff bzw. Elektronen. Durch Monooxygenasen wird ein Sauerstoffatom von einem Sauerstoffmolekül in den Fremdstoff eingebaut und das andere zu Wasser reduziert. Dioxygenasen führen dagegen beide Atome des Sauerstoffmoleküls in das Xenobiotikum ein.

Die weitaus wichtigsten Enzyme für diese oxidativen Prozesse sind die Monooxygenasen, welche die Hämoproteine CYP 450 (Cytochrom-P-450) enthalten und in Isoenzymfamilien eingeteilt werden. Diese cytochromhaltigen Monooxygenasen katalysieren aliphatische und aromatische Hydroxylierungen, die Epoxidierung olefinischer und aromatischer Doppelbindungen, die oxidative Desalkylierung von N-, O- und S-Alkylverbindungen, die oxidative Desaminierung und die Oxidation von Thioethern und Aminen zu Sulfoxiden bzw. Hydroxylaminen. Im Vergleich zur Oxidation spielt die Reduktion durch Alkoholdehydrogenasen, Aldo-Keto-Reduktase und CYP 450-Reduktasen bei der Biotransformation nur eine untergeordnete Rolle. Bei den Hydrolysen sind vor allem die Reaktionen mit Esterasen, Epoxidhydratase und Glykosidasen ausschlaggebend.

In vielen Fällen sind die Phase I-Reaktionen die Voraussetzung für die Konjugationsreaktionen in der Phase II.

Bei den Konjugationsreaktionen, die unter der Beteiligung von meist spezifischen Transferasen ablaufen, unterscheidet man solche, bei denen Verbindungen mit alkoholischen oder phenolischen Hydroxylgruppen, Aminogruppen, Sulfhydrylgruppen und z.T. auch Carboxylgruppen mit energiereichen körpereigenen Substanzen gekoppelt werden, und solche, bei denen die Kopplung nach Aktivierung des Fremdstoffes mit einer (nicht aktivierten) körpereigenen Verbindung erfolgt. Die wichtigsten Phase II-Reaktionen sind die Konjugationen mit polaren Molekülresten, wie z.B. mit Sulfat, Acetat, Glucuronsäure und Glutathion. Durch diese Konjugationen wird die Wasserlöslichkeit der ursprünglich lipophilen Fremdstoffe erhöht und so die biliäre und renale Ausscheidung gewährleistet. Dieser Fremdstoffmetabolismus findet hauptsächlich in der Leber, aber auch im Darm, in der Niere, der Lunge und in geringerem Ausmaße auch in anderen Organen des Körpers statt.

Die Leber ist durch ihre komplexen Enzymsysteme das wichtigste Organ für die Metabolisierung von Xenobiotika. Bei der Betrachtung des Organs bezüglich der Biotransformationsprozesse sind Struktur und Durchblutung der Leber von entscheidender Bedeutung.

Bauelemente der Leber (Abbildung 2) sind die Leberläppchen (kleinste funktionelle Einheit), die aus einer Vielzahl radiär verlaufender Zellstränge, den Leberzellplatten und -balken, bestehen. Zwischen dem Balkenwerk der Leberzellplatten befinden sich die Lebersinusoiden (Leberkapillaren), die vielfach miteinander anastomosieren und ein radiäres Kapillarnetz bilden. In ihrer Wand findet man neben gefensterten Endothelzellen die dem retikulo-endothelialen System angehörenden von Kupfferschen-Sternzellen. Während die von Kupfferschen Sternzellen hauptsächlich phagozytierende bzw. speichernde Aufgaben übernehmen, stehen die Endothelzellen über den Disseschen Raum mit den Hepatozyten in Verbindung. Zwischen den Leberzellen verlaufen neben den Lebersinusoiden, aber stets von diesen getrennt, die Gallenkapillaren, deren Wand durch die Zellmembran der Leberzellen gebildet wird. Die Gallenkapillaren beginnen im Läppchenzentrum und verlaufen zentrifugal zur Läppchenperipherie, wo sie an den sog. periportalen Feldern, dem Berührungspunkt mehrerer Läppchen, in die interlobulären Gallengänge einmünden.

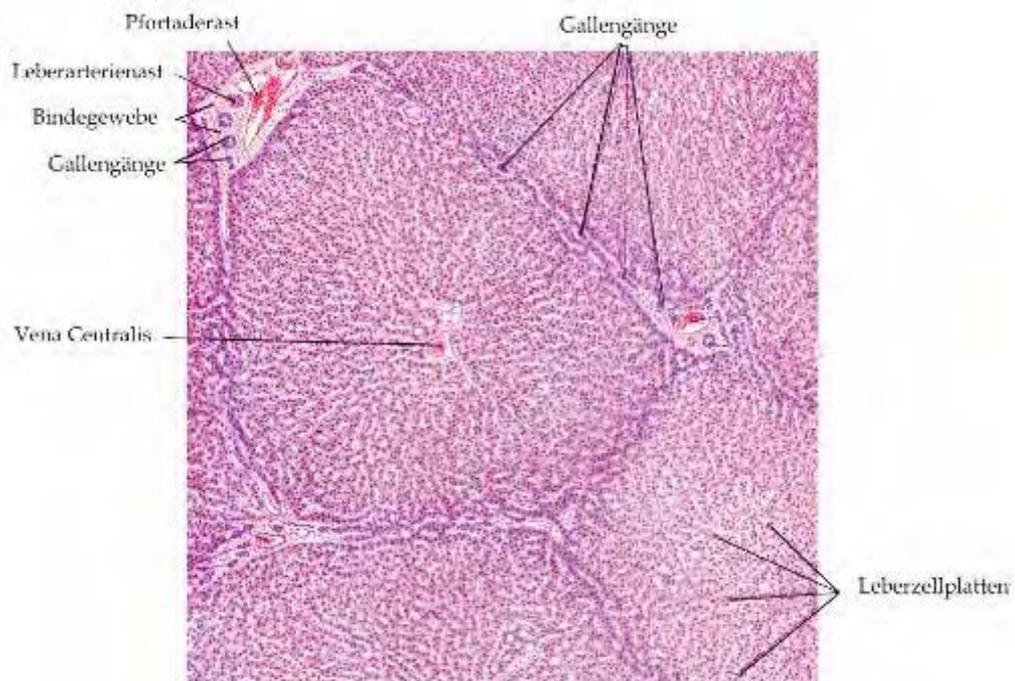


Abbildung 2: Leberschnitt, gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin, (aus Wallraff, 1972)

Die erste Barriere beim Eintritt von Substanzen in die Leberzellen stellt die lipophile Leberzellmembran dar, die in Form von Mikrovilli in den Disseschen Raum hineinragt (Abbildung 3). Ein aktiver Transport kann das Eintreten von polaren Substanzen erleichtern, während die Diffusion der lipophilen Substanzen in die Zellen vom Blutfluss abhängig ist.

Nachdem die Substanzen durch metabolisierenden Enzyme transformiert wurden, werden sie über die im Leberlappenzentrum liegende Vena centralis wieder dem großen Kreislauf zugeführt oder über die Gallenkanälchen biliär ausgeschieden.

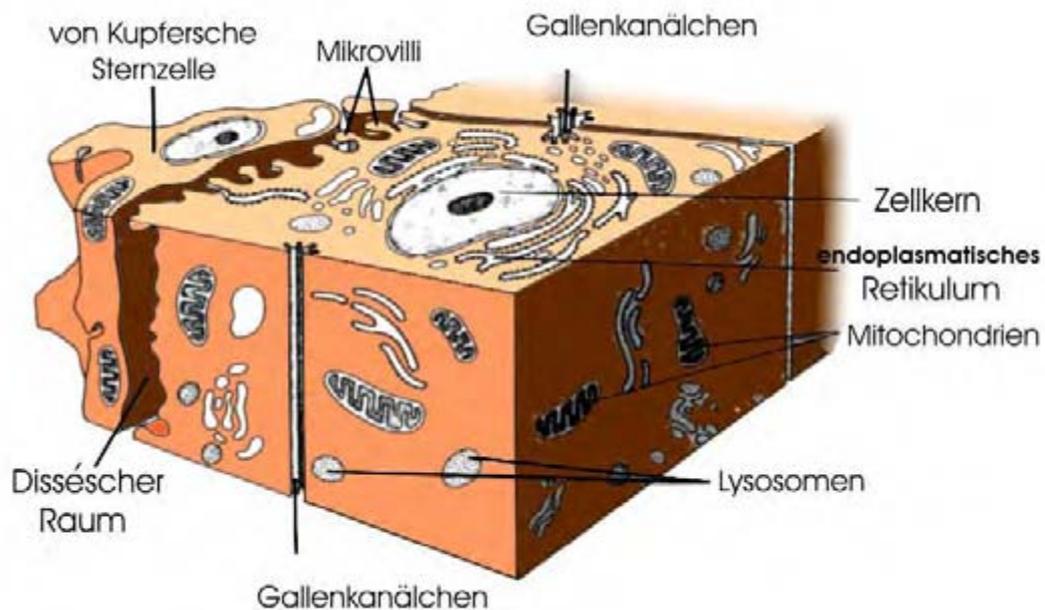


Abbildung 3: Ultrastruktur einer Leberzelle, schematische Darstellung, (nach Thews, 1980)

Die an dem Fremdstoffmetabolismus beteiligten strukturgebundenen Enzyme in den Hepatozyten sind hauptsächlich in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und z.T. auch in den Mitochondrien lokalisiert (z.B. Monooxygenasen, Glucuronyltransferasen). Daneben kommen ebenfalls strukturungebundene lösliche Enzyme vor (z.B. Esterasen, Amidasen, Sulfotferasen).

1.1 Untersuchung des Fremdstoffmetabolismus in *in vitro*-Modellen

Bei der Arzneistoffentwicklung besteht ein großes Interesse, frühzeitig Informationen über die Pharmakokinetik und die Toxizität von Entwicklungssubstanzen oder deren Metaboliten zu erhalten. Durch geeignete *in vitro*-Versuche können im Sinne der 3 R-Regel (Refine-, Reduce-, Replace-Regel, aufgestellt von Russell and Burch, 1959) genehmigungspflichtige oder ethisch-moralisch bedenkliche Tierversuche sowie die Anzahl humaner *in vivo*-Studien verringert werden. Durch die Möglichkeit, *in vitro*-Versuche auch mit Humanmaterial durchzuführen, sowie durch wachsende Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen und über speziesspezifische Stoffwechselsysteme, kann durch Extrapolation wenigstens teilweise eine Vorhersage über den *in vivo*-Metabolismus einer Substanz getroffen werden.

Die für Metabolismusuntersuchungen zur Verfügung stehenden Modelle unterscheiden sich vor allem in ihrer Komplexität bzw. ihrer Spezifität (Abbildung 4) und bieten somit je nach Fragestellung Vor- und Nachteile (Tabelle 1).



Abbildung 4: Komplexität und Spezifität verschiedener *in vitro*-Systeme

1.1.1 Vor- und Nachteile der üblichen *in vitro*-Systeme für Lebermetabolismusuntersuchungen

Bei den relativ komplexen *in vitro*-Methoden, wie dem Perfusionsmodell oder dem Gewebeschnittmodell, bleiben die dreidimensionalen Strukturen des Gewebes und damit die funktionellen Gewebestrukturen wie Zell-Zell-Kontakt oder Zell-Matrix-Kontakte sowie die Kinetik der Transportprozesse erhalten. Die Leberperfusion wird erfolgreich als Biotransformationsmodell eingesetzt (Toda, 1981) und kann prinzipiell *in situ* oder *in vitro* durchgeführt werden. Der größte Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Galle separat gesammelt werden kann und dass damit zwischen Plasmametaboliten und biliären Metaboliten unterschieden werden kann. Die Leberperfusion ist allerdings experimentell aufwendig, schwierig zu handhaben und birgt das Problem der fehlenden Replikate, reflektiert aber am besten die *in vivo*-Situation.

Die Leberschnitte hingegen können einfach und schnell hergestellt, sowie repliziert werden. Auch kleinere Gewebeteile sind für die Herstellung der Schnitte ausreichend, was die Möglichkeit eröffnet, Humanlebertteile aus Operationsresektaten zu verwenden. Weiterhin können Leberschnitte über längere Zeiträume inkubiert werden. Mit Schnitten einer Leber können mehrere Versuchsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen oder auch mit unterschiedlichen Substanzen durchgeführt werden.

Weniger komplexe Biotransformations-Systeme sind zelluläre bzw. subzelluläre Systeme. Bei den Hepatozytenkulturen können wie bei den vorher genannten Systemen intakte Phase I- und Phase II-Reaktionen nachgewiesen werden (Guillouzo, 1993). Durch die Isolierung der Zellen können jedoch die Membranen geschädigt werden und dadurch ihre funktionelle Polarität verloren gehen. Die Kultivierung der Zellen über längere Zeiträume ist aufwendig und ohne Schädigung oder Aktivitätsabnahme der am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme bisher nicht möglich.

Unter den subzellulären Fraktionen fällt den Mikrosomen die größte Bedeutung zu. Mikrosomen lassen sich vergleichsweise einfach herstellen und weisen nach einer Lagerung bei - 80°C keine Enzymaktivitätsverluste auf. Nachteilig ist das Fehlen umsatzbeeinflussender Faktoren wie zytosolische Enzyme (Phase II-Reaktionen; z.B. Sulfotransferasen), Zellmembranbarrieren, intrazellulärer Transportmechanismen, Cofaktoren-Verfügbarkeit und endogener Konkurrenzsubstrate. Quantitative Aussagen und Bestimmungen von enzymkinetischen Parametern sind daher nicht auf *in vivo*-Verhältnisse übertragbar. Gereinigte individuelle Enzyme bzw. exprimierte Enzyme sind die spezifischsten Systeme, bei denen bestimmte Reaktionen den einzelnen Enzymen zugeordnet werden können. Mit diesen Methoden können einzelne Reaktionsschritte und Intermediate beim Biotransformationsweg sowie Arzneimittelinteraktionen direkt am Enzym bestimmt werden. Für den Umgang mit reinen Enzymen ist ein erheblicher Aufwand erforderlich.

Eine Zusammenstellung der Vor- und Nachteile der verschiedenen *in vitro* Metabolisierungssysteme wird in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1: Vergleich verschiedener *in vitro*-Metabolisierungssysteme

System	Vorteile	Nachteile	Einsatzmöglichkeiten
Leberperfusion	Intakte Phase I + II- Reaktionen Metaboliten = <i>in vivo</i> + Trennung biliär und Plasma Belastung mit hohen Substrat-Konzentrationen möglich sehr gute Aussage zu AM-Interaktionen	nur für intakte, frische Lebern kleiner Labortiere einsetzbar aufwendige und schwierige Handhabung Eignung nur für Kurzzeitinkubationen hoher Tierverbrauch, da 1 Tier/Substanzkonzentration	Metabolitenscreening Metabolitenanreicherung AM-Interaktionen
Leberschnitte	Intakte Phase I + II- Reaktionen Metaboliten = <i>in vivo</i> erhaltene zelluläre Integrität und Zell-Zell-Kontakte Kinetik von Aufnahme und Transportprozessen weitgehend erhalten Kleine Lebergewebeteile ausreichend, Vorteil bei der Verwendung von Humanmaterial gute Aussage zu AM-Interaktionen schnelle und einfache Präparation reduzierter Tierverbrauch für die Testung mehrerer Substanzen/Konzentrationen	Konservierung der Schnitte bisher nicht ohne Aktivitätsverlust möglich: erfordert frisches Lebergewebe begrenzte Sauerstoff- und Substratversorgung der Leberzellen im Inneren des Schnittes: Inkubationszeiten bis max. 72h möglich Freisetzung von zytosolischen Enzymen durch geschädigte Zellen	Metabolitenscreening AM-Interaktionen Speziesvergleich Kombination mit Toxizitätsstudien verschiedener Art möglich Inhibitions- und Induktionsstudien
Hepatozyten	Intakte Phase I + II- Reaktionen Metaboliten ähnlich <i>in vivo</i> erhaltene Zellstruktur gute Aussage zu AM-Interaktionen reduzierter Tierverbrauch für die Testung mehrerer Substanzen/Konzentrationen	relativ große intakte Gewebeteile erforderlich Verlust des normalen Zell-Zell-Kontaktes (Kollagenase) dadurch Membranschädigungen, Verlust der funktionellen Membranpolarität aufwendige Präparation schwierige Konservierung mit Aktivitätsverlust abnehmender CYP450-Gehalt in kultivierten Zellen z.T. Zusatz von Cofaktoren erforderlich	Metabolitenscreening Inhibitions- und Induktionsstudien AM-Interaktionen Speziesvergleich Kombination mit Toxizitätsstudien
Mikrosomen	schnelle und einfache Präparation Lagerung bei -80°C ohne Enzymaktivitätsverlust möglich Methode mit der größten Verbreitung reduzierter Tierverbrauch für die Testung mehrerer Substanzen/Konzentrationen	subzelluläres System inkomplette Enzymausstattung (eingeschränkte Phase II-Reaktionen) fehlende umsatzbeeinflussende Faktoren wie Zell-membranbarrieren, intrazelluläre Transport-mechanismen, Cofaktor-Verfügbarkeit, endogene Konkurrenzsubstrate notwendiger Zusatz von Cofaktoren	Metabolitenscreening Identifikation am Umsatz beteiligter Isoenzyme (eingeschränkt) AM-Interaktionen Inhibitionsstudien (Induktionsstudien) nur nach Induktorapplikation Speziesvergleich
Individuelle Enzyme	Aussage zu einzelnen Isoenzymen möglich Expression humaner Enzyme möglich, keine ethischen Probleme wie bei Nutzung von Humanmaterial bei -180°C über Jahre lagerfähig reduzierter Tierverbrauch für die Testung mehrerer Substanzen/Konzentrationen	fehlende Konkurrenzreaktionen hohe Anforderungen und hoher Aufwand des Zell-kulturlabors in Abhängigkeit vom verwendeten Expressionssystem	Metabolitenscreening Identifikation am Umsatz beteiligter Isoenzyme Inhibitionsstudien Interaktionen an individuellem CYP450 Kombination mit Toxizitätsstudien (z.B. Mutagenitätstestung mit Mammaliersystemen)

1.1.2 Gewebeschnitte

1.1.2.1 Gewebeschnitte in der Vergangenheit

Gewebeschnitte von Organen wurden seit ihrer Einführung durch O. Warburg im Jahre 1923 für Untersuchungen des intermediären Stoffwechsels und für Untersuchungen des Metabolismus von Xenobiotika (z.B. Campbell, 1971; Carlile, 1999; Dogterom, 1993; Lipschitz, 1939; Storey, 1950, Worboys, 1995; Worboys, 1997) benutzt. Es bestanden jedoch in der Anfangszeit Schwierigkeiten die Schnitte reproduzierbar groß und dünn herzustellen. Auch die beschriebenen Schneidehilfen, wie das manuelle Stadie-Rigg-Mikrotom (Stadie, 1944) oder das automatisierte McIlwain- und Oxford-Vibratom (Clouser, 1977; McIlwain, 1953), konnten die Produktion der Schnitte nicht ohne Beschädigungen bewerkstelligen. Kombiniert mit einfachen Inkubationsbedingungen eigneten sich die Schnitte wegen der Degeneration der Zellen nur für Kurzzeitinkubationen. Durch die von Berry und Friend (1969) eingeführte Hepatozyten-Isolierung geriet der Leberschnitt bis zur Einführung des von Krumdieck (1980) beschriebenen „precision-cut-tissue-slicer“ in Vergessenheit.

Während in der ersten Hälfte der 80er Jahre kaum Publikationen zum Gewebeschnitt veröffentlicht wurden, erschienen in der zweiten Hälfte mehrere Publikationen, die jedoch alle in Arbeitsgruppen um C.L. Krumdieck, K. Brendel, A.J. Gandolfi und P.F. Smith entstanden (Brendel, 1987; Connors, 1988; McKee, 1988; Smith, 1985). Eine breite Anwendung und damit eine immer weiter steigende Zahl an Publikationen fand die Gewebeschnitttechnik erst nach kommerzieller Einführung des Krumdieck-Tissue-Slicers in den letzten zwanzig Jahren.

1.1.2.2 Der Krumdieck-Tissue-Slicer

Das am weitesten verbreitete vollautomatische Mikrotom zur Herstellung von reproduzierbar großen und dicken Schnitten aus frischem Gewebe ist der bereits erwähnte Krumdieck-Tissue-Slicer. Das Gerät setzt sich aus einem Mikrotom, einem Pufferreservoir und dem Basisgerät, in welchem die elektrischen und elektronischen Bauteile untergebracht sind, zusammen. Das Gerät ist so konstruiert, dass Gewebeschnitte im Puffer auch bei 4°C hergestellt werden können, indem die vorher in Zylinder geschnittenen Gewebestücke über ein sich hin und her bewegendes Messer geführt werden. Ein Flüssigkeitsstrom innerhalb des Gerätes sorgt dafür, dass die Schnitte in ein Glas-Auffanggefäß transportiert werden. Mit Hilfe eines Auslass-Schlauches können die gesammelten Schnitte von dort einfach entnommen werden. Den Geräteherstellerangaben zufolge ist es möglich, Schnitte mit Durchmessern von 5-15 mm und mit Dicken zwischen 100-1000 µm reproduzierbar herzustellen.

Die Schnittherstellung wird üblicherweise mit einfachen, eisgekühlten und vor Gebrauch frisch oxygenierten isotonischen Puffermedien durchgeführt. Meist werden Krebs-Henseleit-Puffer (KH) oder Bicarbonat-Puffer verwendet (Parrish, 1995).

Die Schnittherstellung wird bei ca. 4°C durchgeführt, um den zellulären Metabolismus und die Produktion von toxischen reaktiven Sauerstoffspezies zu reduzieren.

Die Schnitte sollten eine Dicke aufweisen, die einen schnellen Nährstoff- und Gasaustausch gewährleistet (Dogterom, 1993). Schnitte, die sehr dick sind (> 500 µm), können im Inneren nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden und zeigen dementsprechend ischämische Veränderungen. Bei Schnitten, die jedoch zu schmal sind (< 200 µm), machen die verletzten Zellen auf der Schnittoberfläche einen größeren Teil aus, als die intakten Zellen im Schnittinneren. Aus diesem Grund sollte eine Schnittdicke von 200-250 µm gewählt werden (Bach, 1996), um eine optimale Vitalität der Schnitte gewährleisten zu können.

1.1.2.3 Der Brendel/Vitron Tissue Slicer

Der von Brendel/Vitron angebotene Tissue-Slicer bietet grundsätzlich die gleichen Möglichkeiten wie der Krumdieck-Tissue-Slicer. Der Hauptunterschied liegt darin, dass die Gewebezylinder über ein rotierendes Messer geführt werden, wodurch die gesamte Schnittfläche des Messers ausgenutzt wird und das Gerät insgesamt vibrationsärmer arbeitet. Der Brendel/Vitron Slicer arbeitet im Gegensatz zum Krumdieck Tissue Slicer nur halb-automatisch und kann nur mit Chemikalien sterilisiert werden, wohingegen der Krumdieck Tissue Slicer sowohl mit Chemikalien sterilisierbar ist, als auch autoklaviert werden kann.

In einer Arbeit von Price (1998) wurden Rattenleberschnitte verglichen, die mit diesen beiden Slicern produziert wurden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Gehalten von Protein, Kalium, Gesamtglutathion (GSH), reduziertem GSH, dem Gesamtgehalt an Cytochrom P450 Isoenzymen (CYP) und an den Aktivitäten von 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase (EROD) und 7-Benzoxyresorufin O-Debenzylase (BROD) festgestellt.

1.1.2.4 Schnittinkubation

Bei der Inkubation von Leberschnitten kann grundsätzlich zwischen den Kurzzeitinkubationen (bis zu 8 Stunden), den mittelfristigen Inkubationen (bis zu 24 Stunden) und den Langzeitinkubationen (über 24 Stunden) unterschieden werden.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten können sowohl die Schnitte als auch die Inkubationsmedien auf verschiedene Endpunkte hin untersucht werden.

In verschiedenen Publikationen kann eine große Diversität an Methoden bezüglich der Inkubation von Leberschnitten beobachtet werden. So werden als Inkubationsmedien einfache Salzpuffer wie der Krebs-Henseleit-Puffer mit Natriumbicarbonat (Fisher, 1993) oder Hepes-Zusatz (Fisher, 1991), aber auch Nährstoffzusätze verwendet (Ghantous, 1991). Weiterhin werden zur Inkubation von Leberschnitten auch Nährmedien, wie das Waymouth-Medium mit oder ohne Zusatz von fötalem Kälberserum (Smith, 1986), das Williams E-Medium (Stearns, 1992) und das RPMI 1640-Medium (Lake, 1993), eingesetzt.

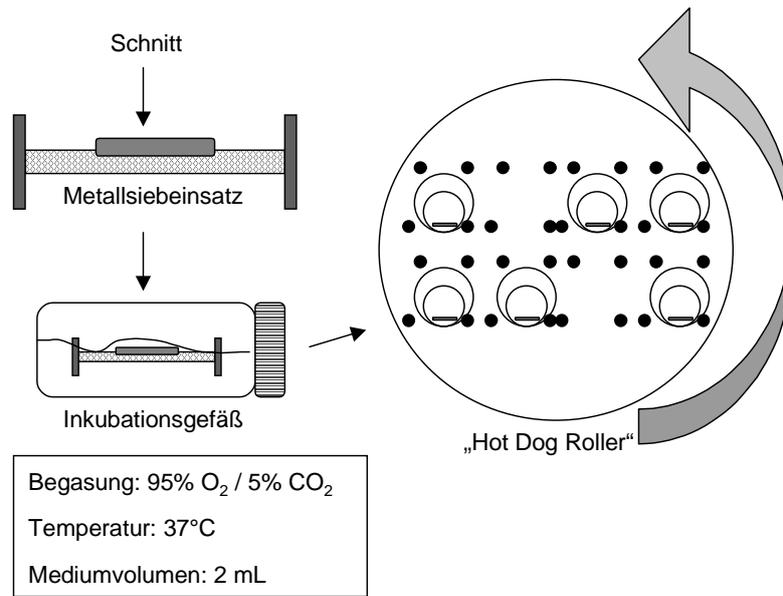
Die Gasphase im Inkubator besteht entweder aus einem CO₂/Luft-Gemisch, oder einem CO₂/O₂-Gemisch. Durch diese definierte Gaszufuhr wird einerseits der pH-Wert des Puffers (Bikarbonatpuffer) konstant gehalten und andererseits wird durch den höheren Sauerstoffanteil eine optimale Versorgung der Schnitte erreicht.

Die Inkubation der Leberschnitte kann in zwei verschiedenen Systemen ("Surface" und "Submersion") erfolgen (Bach, 1996).

Zum einen besteht die Möglichkeit, die Schnitte in einem dynamischen System (dynamic organ culture system: DOC System, Abbildung 5 und Tabelle 2) zu inkubieren. Hier können die Schnitte abwechselnd mit dem Medium und der Luft im Inkubator in Kontakt treten. Als Inkubationssysteme stehen der von Smith (1985) beschriebene Rollerinkubator und die Rocker-Plattform zur Verfügung (Leeman, 1995), welche einen hohen technischen Aufwand erfordern. Fisher (1995) stellte in seiner Studie fest, dass die dynamischen Systeme den statischen Systemen vorzuziehen sein. Allerdings haben Olinga (1997) und Hashemi (1999) nachgewiesen, dass im Gegensatz zu Fisher's Ergebnissen (1995) der Verlust an metabolischer Kapazität und "Viability" im dynamischen System (Roller System) schneller eintrat als in statischen Inkubationssystemen (Multiwell-Kulturplatten, „Shaken Flask“).

Diese statischen Systeme, bei denen sich die Schnitte während der gesamten Inkubationszeit im Medium befinden (submersion culture, Abbildung 6 und Tabelle 3), können als zweite Möglichkeit zur Inkubation von Gewebeschnitten eingesetzt werden. Dabei können die Schnitte frei (Dogterom, 1993) oder auf Metall- bzw. Plastiksieben (Conners, 1990; Vickers, 1992) in Multiwell-Kulturplatten mit unterschiedlichen Substanzkonzentrationen inkubiert werden. Ferner können auch Erlenmeyerkolben in einem Schüttel-Wasserbad („Shaken Flask“) zur Inkubation herangezogen werden (de Kanter, 1995).

„Roller System“



„Rocker Plattform“

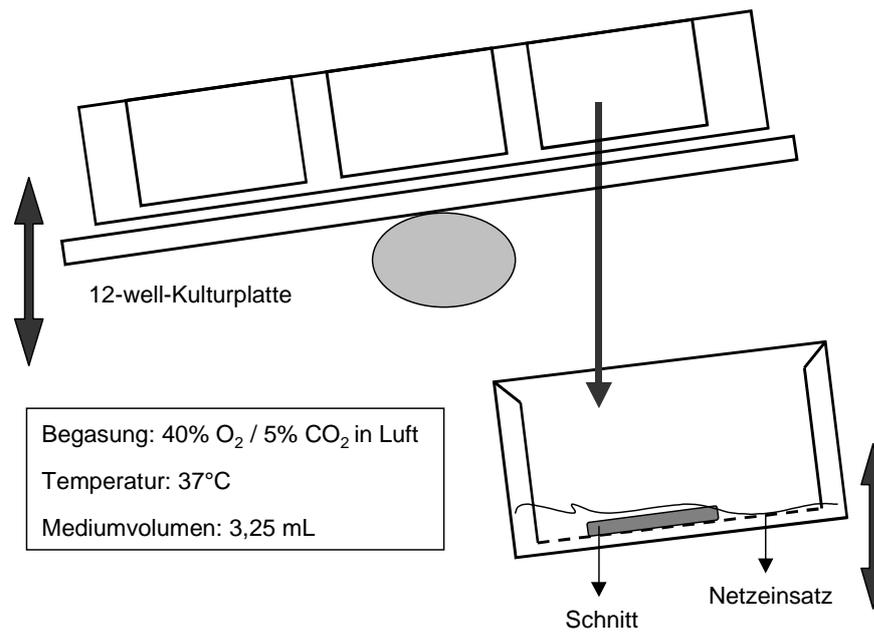


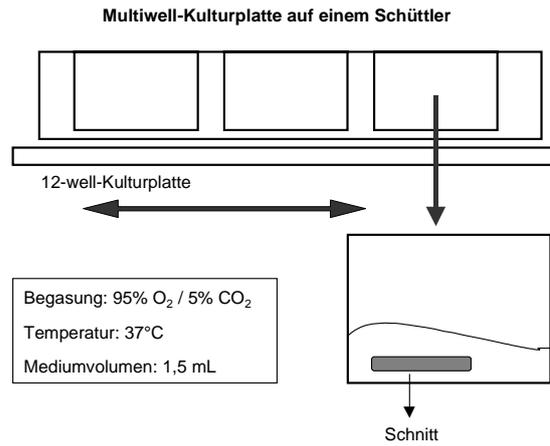
Abbildung 5: Dynamische Inkubationssysteme

Die nachstehende Tabelle fasst die Vor- und Nachteile des Einsatzes der dynamischen Inkubationssysteme zusammen.

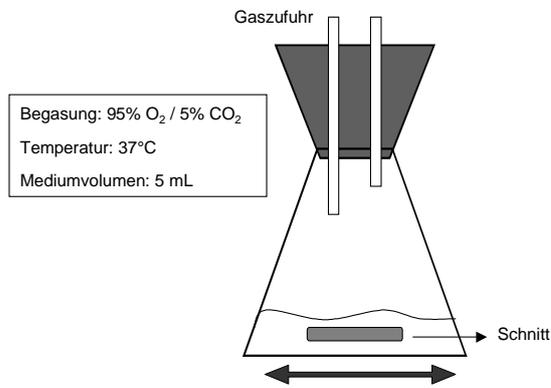
Tabelle 2: „Dynamic organ culture system“ DOC; dynamische, oberflächliche Kultivierung von Organschnitten (Surface)

Inkubationssystem	Inkubationszeit	Studieneinsatz	Vorteile	Nachteile
Roller System	bis 5 Tage	Kurz- und Langzeitstudien Metabolismus, Kinetik und Toxizität Enzyminduktion	geringe Mediummenge Tests von flüchtigen Stoffen	arbeitsintensiv kostenintensiv mechanische Schädigung der Schnitte erhöhte bakt. Kontamination geringe MTT-Metabolismusrate
Rockerplattform	bis zu 24h	Kurz- und Langzeitstudien Metabolismus und Toxizität	schnelle Probenhandhabung geringe Mediummenge	

Die Daten in der Tabelle wurden den Ergebnissen von Bach (1996) und Olinga (1997) entnommen.



**„Shaken Flask“
Erlenmeyerkolben in einem Schüttel-Wasserbad**



**„Stirred Wells“
Multiwellplatten mit Metallsiebeinsätzen und Rührfischen**

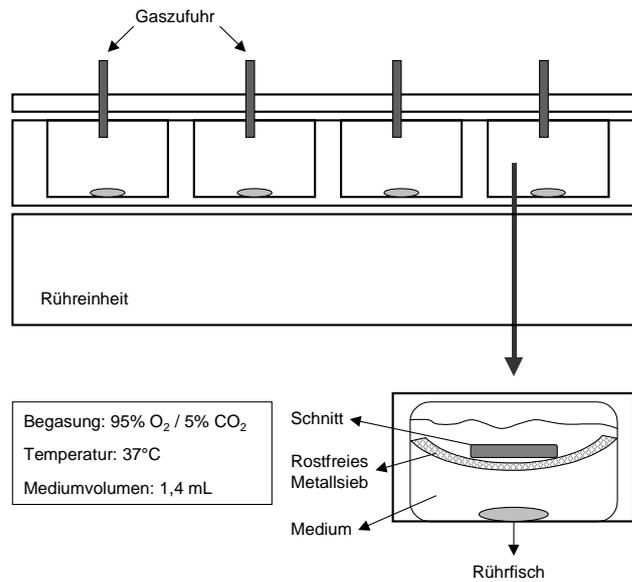


Abbildung 6: Statische Inkubationssysteme, „Submerged incubation systems“

Die folgende Tabelle lässt die Vor- und Nachteile der statischen Inkubationssysteme erkennen.

Tabelle 3: „Submerged incubation systems“; Inkubationssysteme, bei denen die Schnitte im Medium untertauchen

Inkubationssystem	Inkubationszeit	Studieneinsatz	Vorteile	Nachteile
"Multiwell shaker" 24-well Platte auf einem Schüttler	12 bis 24h	Metabolismus, Kinetik und Toxizität	schnelle Probenhandhabung geringe Mediummenge günstige Anschaffung	
"Multiwell shaker" 12-well Platte auf einem Schüttler	12 bis 72h	Metabolismus, Kinetik und Toxizität	schnelle Probenhandhabung günstige Anschaffung	
"Stirred Wells" Multiwellplatten (6 oder 12) mit Rührfischen und Drahtnetzinsatz	12 bis 24h	Metabolismus, Kinetik und Toxizität	schnelle Probenhandhabung geringe Mediummenge günstige Anschaffung	mechanische Schädigung der Schnitte Abnahme des Energiegehaltes Abnahme des Kaliumgehaltes geringe MTT-Metabolismusrate erhöhter LDH-Verlust
"Shaking flask" Kolben auf einem Schüttler	bis 12h	Kurzzeit-Metabolismus- und Toxizitätsstudien	günstige Anschaffung	erhöhte Mediummenge

Die Daten in der Tabelle basieren auf Ergebnissen von Bach (1996) und Olinga (1997).

Die Multiwellsysteme ermöglichen eine einfache Handhabung von großen Schnittzahlen und die Kontaminationen während Langzeitinkubationen fielen laut Hashemi (1999) geringer aus als in den dynamischen Inkubationssystemen (Roller System). Aus diesen Gründen wurde für die vorliegende Dissertation ein einfaches statisches System mit 12-Well-Kulturplatten in Anlehnung an Dogterom (1993) verwendet.

1.1.2.5 Charakteristika kultivierter Leberschnitten

Die Aufrechterhaltung des physiologischen Zustandes („Viability“) der Leberschnitte während der Inkubation war in der Vergangenheit Bestandteil vieler Publikationen. Die morphologische Integrität ist einer der Hauptindikatoren der Vitalität der Leberschnitte.

Für die Untersuchung dieser Membranintegrität und des biochemischen und / oder Energie-Status wurden in der Vergangenheit spezifische Methoden entwickelt.

Diese Methoden können für Leberschnitte in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden:

- Zellmorphologie
- Membranpermeabilität
- funktionelle Leistungsfähigkeit der Zellen

Zellmorphologie

Anhand von histologischen Untersuchungen der Leberschnitte kann neben der pathologischen Beurteilung der Leber zu Beginn der Inkubation auch die Degeneration der Zellen während der Inkubation dargestellt werden (Beamand, 1993; Fisher, 2001; Leeman, 1995; Olinga, 1997; Toutain, 1998).

Membranpermeabilität

Die Überprüfung der Membranpermeabilität wird als Standardmethode zur Untersuchung des physiologischen Zustandes der Leberschnitte eingesetzt. Veränderungen in den Ionen (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) Konzentrationen werden verbreitet als generelle Indikatoren der Vitalität der Leberschnitte untersucht. Da die meisten Zellen einen hohen intrazellulären Kaliumgehalt aufweisen, kann der Verlust dieses Ions daraufhin deuten, dass eine Membranverletzung vorliegt oder die Aktivität der Na^+ - K^+ ATPase verringert ist (Baumann, 1996; Dogterom, 1993; Fisher, 1995; Olinga, 1997; Price, 1998). Aufgrund der einfachen Durchführung und der direkten Aussagekraft des Kaliumverlustes auf die Lebensfähigkeit der Zellen wurde die Kaliumbestimmung für diese Dissertation ausgewählt.

Ferner besteht die Möglichkeit die zelluläre Integrität auch über den Verlust von zytosolischen Enzymen, wie der Laktatdehydrogenase (LDH) oder auch der Glutathion S-Transferase (GST) in das Inkubationsmedium zu bestimmen (Fisher, 1995; Hashemi, 1999; Olinga, 1997).

Funktionelle Leistungsfähigkeit der Zellen

Weitere biochemikalische Parameter, die zur Untersuchung des physiologischen Zustandes der Leberschnitte herangezogen werden, beinhalten die Messungen des intrazellulären ATPs, des reduzierten Glutathions (GSH) und des oxidierten Glutathions (GSSG). Diese Parameter reflektieren eine Balance zwischen den Substrat-liefernden und den Substrat-verbrauchenden Prozessen. Da ATP mit in die Transport- und metabolischen Prozesse einbezogen ist, kann durch diesen Parameter ein indirekter Schluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen gezogen werden (De Kanter, 1999, 2002; Dogterom, 1993; Fisher, 1995).

GSH ist einbezogen in eine Vielzahl von zellulären Prozessen, welches auch den Schutz der Zellen vor schädigenden Effekten, die durch die Lipid-Peroxidation hervorgerufen werden, beinhaltet (Hashemi, 1999; Price, 1998).

Der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid)–Test wird häufig für die Bestimmung der Reduktionskapazität von Leberschnitten angewandt (De Kanter, 2002; Fisher, 1995; Leeman, 1995; Obatomi, 1998; Olinga, 1997). Dieser Test nutzt die Fähigkeit mitochondrialer Dehydrogenasen von lebenden Zellen, wasserlösliche Tetrazolium Salze in unlösliches Formazan umzuwandeln, dessen Färbung photometrisch gemessen werden kann.

Die Proteinsynthese ist eine weitere wichtige Aufgabe der Leber. Dieser Parameter kann mit Hilfe von ^3H -Leucin untersucht werden, welches in die Leberzellen eingebaut wird (Fisher, 1995).

Eine der Schlüsselfunktion der Leber ist die Gewährleistung der Biotransformation und Elimination von Substanzen aus dem Körper. Aus diesem Grund werden die Hauptenzyme dieser Reaktionen, die CYPs und die Phase II Enzyme (UDP-Glucuronosyltransferase, GSTs, Acetyltransferasen und Sulfotransferasen) häufig mit in die Beurteilung des physiologischen Zustandes der Zellen herangezogen (Lake, 1996; Price, 1998).

1.1.2.6 Anwendung von Leberschnitten in der Toxikologie und Pharmakologie

Mehr als 200 Laboratorien nutzten im Jahre 1995 Gewebeschnitte für Metabolismus- und Toxizitätsstudien, doch diese Zahl hat sich in den letzten Jahren zweifellos erhöht.

Die Vorteile des Einsatzes von Leberschnitten gegenüber *in vivo* Versuchen bestehen darin, dass

- Kontrollen und Substanzen an Material von einem einzigen Tier verglichen werden können;
- die Variabilität zwischen individuellen Experimenten reduziert wird;
- nur geringe Mengen an Untersuchungssubstanz nötig sind, um eine komplette Dosiswirkungsbeziehung zu ermitteln;
- sie eine Reduzierung der Tierbedarfszahlen bedeuten,
- und sie so die Kosten in toxikologischen Studien reduzieren können.

Weitere Vorteile von Gewebeschnitten sind, dass

1. die Komplexität des intakten Organs repräsentiert wird
2. die Gewebeschnitttechnik einen einfachen Vergleich unterschiedlicher Spezies ermöglicht
3. die Möglichkeit besteht, verschiedene Organe desselben Spenders zu untersuchen
4. eine histologische Bewertung als eine Alternative, oder als eine Vervollständigung von biochemischen Tests zum Einsatz kommen können
5. Untersuchungen mit co-kultivierten Schnitten verschiedener Organe durchgeführt werden können
6. die Möglichkeit gegeben ist, Toxizitäts- und Metabolismusuntersuchungen regional (z.B. proximal/distal, periportal/zentrolobulär) bezogen durchzuführen

Nach der Einführung der Präzisionsschnitttechnik wurden Leberschnitte zu folgenden Untersuchungen herangezogen:

Xenobiotika – Metabolismus

Untersuchungen, die Auskunft über den metabolischen Abbauweg von Xenobiotika geben sollen, benötigen ein System, das die *in vivo* Situation reflektiert.

Die Brauchbarkeit der Gewebeschnitte zur Identifikation von metabolischen Abbauwegen verschiedener chemischer Verbindungen wurde in der Literatur (Ekins, 1996; Olinga, 1998, Renwick, 2000) demonstriert. In Gewebeschnitten verschiedener Spezies (Ratte, Hund, Affe und Mensch) wurden gute Korrelationen mit *in vivo* Daten gefunden (Harris, 1994; Salyers, 1994; Vickers, 1992). Dies impliziert, dass alle bekannten Phase I und Phase II Reaktionen in der Leber aktiv sind.

Leberschnitte wurden auch zur Vorhersage der *in vivo*-metabolischen Clearance von Xenobiotika eingesetzt. Dabei wurden für die Metabolisierung von Substanzen Michaelis-Menten-Parameter berechnet, aus denen die intrinsische Clearance abgeleitet wurde (Carlile, 1999; Vickers, 1993; Worboys, 1996).

Induktion von CYP-Isoformen

Für Enzym-Induktionsstudien kommen vornehmlich primäre Hepatozyten-Kulturen und Leberschnitte zum Einsatz, wobei die Hepatozyten-Kulturen intensiv für CYP Induktionsstudien genutzt wurden. Induzierende Verbindungen, z.B. Phenobarbital, Aroclor 1254, -Naphthoflavon, Dioxin und Rifampicin wurden aber auch in Leberschnitten beurteilt. So wurde gezeigt, dass Phenobarbital eine Zunahme von BROD (Benzoxy-Resorufin O-Dealkylase), von CYP2B1/2 und 3A Apoproteinen bewirkt, dass Aroclor 1254 eine Erhöhung der EROD (Ethoxy-Resorufin O-Dealkylase), der PROD (Pentoxo-Resorufin O-Dealkylase), von CYP1A2, 2B1/2 und 3A Apoproteinen zur Folge hat (Lake, 1996; Meredith, 2003), und dass -Naphthoflavon und Dioxin (TCDD) die CYP1A1/2 Aktivität in Rattenleberschnitten erhöhen (Gokhale, 1997).

Rifampicin erhöht die CYP3A Isoformen in kultivierten humanen Leberschnitten, welches durch Westernblot und Testosteron 6 Hydroxylase Aktivitätsbestimmungen dargestellt wurde (Lake, 1997).

Für CYP Induktionsstudien liegt der Vorteil der Verwendung von Leberschnitten darin, dass im Gegensatz zu Hepatozyten Kulturen die Möglichkeit besteht, regionenspezifische Induktionen und Expressionen von CYP Isoformen zu untersuchen.

Xenobiotika-induzierte Toxizität

Leberschnitte wurden zu Untersuchungen von Zytotoxizität und Genotoxizität herangezogen. Die Zytotoxizität wird in den meisten Fällen anhand von histologischen bzw. immunhistologischen Befunden oder durch Bestimmungen von biochemischen Zellparametern belegt. Auf diese Art wurde die Toxizität von Fremdstoffen wie z.B. Acetaminophen (Miller, 1993; Thompson, 1996), Bromobenzolderivaten (Smith, 1985), Benzo(a)pyren (Parrish, 1998), -Naphthoflavon (BNF) (Gokhale, 1995; Neupert, 1998), Dichlorobenzole (Fisher, 1991) und Halothan (Brown, 1994; Ghantous, 1990) in Leberschnitten nachgewiesen.

Die Genotoxizität, ausgelöst durch die kovalente Bindung von Substanzen an die DNA, wird als Schlüsselprozess im Mehrstufenmodell der Karzinogenese angesehen.

DNA-Addukt-Bildung oder eine erhöhte DNA-Reparatur Synthese lassen daher auf genomische Schäden schließen. Aus diesem Grund wurden die Leberschnitte verschiedener Spezies zu Untersuchungen der Genotoxizität mittels UDS-Test (unscheduled DNA Synthesis) (Beamand, 1994, 1996, 1998; Lake, 1999) und DNA-Addukt-Analyse (Baumann, 1996; Feser, 1998; Phillips, 1999) herangezogen.

1.2 DNA-Addukte, ein erster Schritt der Krebsentstehung

Die meisten bekannten Mutagene und Kanzerogene sind an sich nicht chemisch reaktiv, sondern werden erst durch Metabolisierung zum reaktiven, schädlichen Agens.

Dazu zählen auch viele mutagene, kanzerogene und zelltoxische Chemikalien, wie z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) und Nitrosamine. Im Verlauf ihrer Metabolisierung entstehen bei der Oxidation chemisch reaktive, meist labile, elektrophil reagierende Zwischenstufen (z.B. Epoxide), die dann direkte Reaktionen mit der DNA, mit wichtigen Proteinen oder Lipiden eingehen und dadurch irreversible Schäden auslösen und zur Krebsentstehung beitragen können. Als Grundlage für das heutige Verständnis der durch Chemikalien ausgelösten Kanzerogenese dient das Mehrstufenmodell.

Dieses beinhaltet drei verschiedene Phasen:

- 1. Initiation:** Diese Phase steht am Beginn der Kanzerogenese. Die Wechselwirkung von Initiatoren mit der DNA besteht in der Bildung von Addukten mit der DNA oder der Interkalation großer und planarer Moleküle. Die Initiation führt zu einer persistenten Veränderung der genetischen Information einer Zelle nach deren Teilung. Diese Veränderungen können auf die Tochterzellen weiter vererbt werden, sofern sie nicht durch DNA-Reparatur-Mechanismen eliminiert wurden.
- 2. Promotion:** Während der Promotionsphase entstehen durch Proliferation aus initiierten Zellen präneoplastische Zellpopulationen mit identischen Mutationen. Dies wird durch Tumorpromotoren begünstigt, die z.B. durch ihre cytotoxische Wirkung regeneratives Wachstum auslösen oder durch ihre hormonähnlichen Mechanismen die Signalwege, die Wachstumsregulation und die Apoptose beeinflussen.

- 3. Progression:** Diese Phase beschreibt den Übergang vom benignen zum malignen Tumor. Sie ist durch genotoxische Schäden charakterisiert, die zu weiteren Mutationen in den betroffenen Zellen und zur Aktivierung von Protoonkogenen führen. Charakteristisch für diese Phase der Kanzerogenese ist die zunehmende Instabilität des Genoms.

DNA-Addukte dienen als Marker für die Identifikation der genotoxischen Aktivität von Substanzen *in vitro* und *in vivo*, aber auch um die Exposition des Menschen gegenüber genotoxischen Substanzen anhand des sogenannten Biomonitoring zu überwachen (Bartsch, 2000; Qu, 1997; Shuker, 2002; Vainio, 2001).

Die Konsequenzen der Addukte für die DNA-Struktur können vielfältig sein: Einerseits kann bei einer DNA-Replikation gegenüber dem Addukt eine falsche Base in den Tochterstrang eingebaut werden, andererseits kann das Addukt die Stabilität und Integrität der DNA direkt beeinträchtigen und zum Beispiel Strangbrüche auslösen.

Die Bildung von DNA-Addukten ist eine frühe Schädigung des Erbgutes. Sie bedeutet noch nicht Mutation und damit auch noch nicht Krebs. Die Beziehung zwischen DNA-Adduktbildung und Krebshäufigkeit wird durch die Eigenschaften der Addukte und der Zelle maßgeblich mitbestimmt. In diese Beziehung fließen u.a. die Gefährlichkeit der gebildeten Addukte in Bezug auf die Auslösung von Mutationen und in Bezug auf die Gene, die möglicherweise betroffen sind, ein. Des Weiteren spielt bei dieser Beziehung der DNA-Reparaturmechanismus und die Teilungsfähigkeit der einzelnen Zelle eine große Rolle (Lutz, 1993).

1.2.1 Methoden zur Detektion von DNA-Addukten

Die DNA-Addukt-Bildung kann mit verschiedenen Testsystemen detektiert werden, welche nackte DNA aus behandelten kultivierten Zellen, aber auch isolierte DNA aus Tierversuchen und Material von Menschen, die umweltbedingt oder auch medikamentös einer Substanz ausgesetzt waren, untersuchen.

Die Wahl des Testsystems und das experimentelle Design hängen von den vorherigen Tests ab, in denen die Substanz positiv ausgefallen ist und in denen eine Präferenz der Substanz zu einem bestimmten Gewebe auffällt.

Die verschiedenen Methoden zur Ermittlung von DNA-Addukten beinhalten z.B. die ³²P-Postlabeling-Methode; den Einsatz von radioaktiv markierten Testsubstanzen; physikochemische Methoden und auch Immunoassays (Tabelle 4).

Tabelle 4: Nachweisverfahren für DNA- und Protein-Addukte (nach Greim, 1996)

Verfahren	Nachweisgrenze [Addukte/10 ^x Nukleotide]	Benötigte DNA-Menge
DNA-Bindung einer ³ H-markierten Substanz	1: 10 ⁷ -10 ⁹	1 mg
GC/MS eines derivatisierten Addukts	1:10 ⁹	1 mg
Immunassay (RIA, ELISA)	1:10 ⁸	50 µg
HPLC mit Fluoreszenz-Detektion	1:10 ⁷	100 µg
³² P-DNA-Postlabeling mit Adduktanreicherung	1:10 ¹⁰	1 µg

Von diesen Methoden sind allerdings nur die Postlabeling Methode und die Radiolabeling Methode geeignet, Substanzen auf ihr DNA-Adduktbildungs-Potential hin zu untersuchen, wenn die Addukte vorher noch nicht chemisch charakterisiert bzw. synthetisiert worden sind.

Bei der ³²P-Postlabeling-Methode handelt es sich um ein hoch sensitives Verfahren, welches nur geringe Mengen (1-10 µg) an DNA benötigt (Gupta, 1985; Randerath, 1981; Reddy, 1985). Dieses Verfahren erlaubt die Ermittlung von Addukten, die durch verschiedene Chemikalien mit unterschiedlichen chemischen Strukturen, z.B. polyzyklische aromatische Hydrocarbone, aromatische und heterozyklische Amine, Alkenylbenzenderivate, Benzene, Styrene, Mykotoxine, einfache alkylierende Agentien, ungesättigte Aldehyde gebildet durch die Lipidperoxidation, Pharmazeutika, reaktive Sauerstoffspezies und UV-Strahlung gebildet wurden (Izzotti, 1998; Phillips, 1997; Poirier, 2000; Randerrath, 1994; Reddy, 1984).

Dieses Verfahren kann für jedes Gewebe angewandt werden, um den Adduktgehalt nach Mehrfachdosierung und die Entfernung der Addukte nach dem Absetzen von Substanzen zu untersuchen. Aber auch endogene Addukte und I-Compounds können detektiert werden, wobei letztere DNA-Modifikationen unbekannter Herkunft sind, deren Adduktlevel mit dem Alter ansteigt und geschlechtsspezifisch, speziesspezifisch, stammspezifisch und fütterungsbedingt variieren kann.

Für die vorliegende Arbeit wurde das ^{32}P -Postlabeling-Verfahren ausgewählt, da dieses Verfahren eine hohe Sensitivität besitzt und die Erfassung unterschiedlichster, nicht charakterisierter Adduktspezies ermöglicht.

Die Anzahl und Häufigkeit der Addukte wird nach der DNA-Isolierung als Endpunkt bestimmt. Auch die Bestimmung der Kaliumwerte wird als Endpunkt angesehen, an dem überprüft wird, ob die zu testende Substanzkonzentration zytotoxische Wirkungen erzielt hat.

1.2.2 Trennung der DNA-Addukte

Die Methode der Wahl zur Trennung der ^{32}P -Addukte liegt in der PEI (Polyethylenimin)-Zellulose Dünnschichtchromatographie. Zum Einsatz kommen verschiedene Techniken, die aber alle die unterschiedliche Polarität der Addukte nutzen.

Für die Trennung von Addukten, die von sperrigen aromatischen Kohlenwasserstoffen stammen, wurde eine multidirektionale Dünnschichtchromatographie entwickelt (Gupta, 1982). Bei diesem Verfahren wird der Überschuss an [^{32}P] ATP mit Hilfe der Entwicklung des Dünnschichtchromatogramms in einem wässrigen Puffer mit hohem Salzgehalt ausgewaschen, wohingegen die Addukte zunächst am Auftragspunkt liegen bleiben. Bei der Wanderung der Addukte spielt vor allem die Lipophilie und der Gehalt an aromatischen Ringen eine große Bedeutung, denn je niedriger die Lipophilie und der Gehalt an aromatischen Ringen, desto weiter entfernen sich die Addukte vom Auftragspunkt.

2 Fragestellung: Arzneimittel – potentielle Adduktbildner?

Anhand eines Beispielen soll die Fragestellung dieser Dissertation erläutert und begründet werden:

Cyproteronacetat (CPA), ein synthetisches Steroidhormon mit starker gestagener und antiandrogener Wirkung (Hümpel, 1979; Neumann, 1994) wurde als erstes Antiandrogen in die Therapie eingeführt. Bei Frauen wird es in Kombination eines Östrogens zur Behandlung von Androgenisierungserscheinungen, wie Hirsutismus, schweren Akneformen und Seborrhoe (2-100 mg/Tag) und bei Männern zur pharmakologischen Behandlung von Prostatakrebs und zur Triebdämpfung bei Sexualtätern (100-300 mg/Tag) eingesetzt. Bei Kindern diente es früher zur Therapie einer Pubertas praecox (vorzeitige Geschlechtsentwicklung mit Auftreten von Zeichen der sexuellen Reife).

In früheren Untersuchungen wurden bei Langzeitfütterungsversuchen mit CPA an Ratten eine erhöhte Tumorzinzidenz in der Rattenleber festgestellt (Schuppler, 1979). Diese durch CPA ausgelöste erhöhte Tumorbildung in der Rattenleber wurde als Folge einer promovierenden Wirkung der Substanz angesehen. Grundlage für diese Einstufung waren die Ergebnisse eines Kurzzeittests für kanzerogene Stoffe, dem Rattenleber-Foci-Test, in dem sich CPA wie eine krebsverstärkende, d. h. promovierende (Schulte-Hermann, 1983; Schuppler, 1982), nicht aber wie eine krebsauslösende, also initiierende Substanz verhielt (Schuppler, 1983). CPA zeigte zudem weder in *Salmonella typhimurium* Bakterien noch in V79-Zellen eine mutagene Wirkung (Lang, 1979; Lang, 1993; Schuppler, 1982). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde CPA vor ca. 20 Jahren als Tumorpromotor eingestuft und als Konsequenz daraus ein Schwellenwert für die tumorigene Wirkung angenommen.

In den Neunziger Jahren zeigte sich, dass CPA in Hepatozyten weiblicher Ratten und des Menschen zu einer Induktion der DNA-Reparatursynthese führt (Kasper, 1995; Kasper, 1996; Martelli, 1995; Neumann, 1992). Als Auslöser wurde die Bildung von DNA-Addukten angenommen. In Versuchen mit Rattenlebern und mit Rattenhepatozyten in Kultur wurde gefunden, dass CPA die Bildung von DNA-Addukten konzentrations-, dosisabhängig, organ- und geschlechtsspezifisch induziert (Topinka, 1993). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass CPA nicht nur DNA-schädigend, sondern auch tumorinitiierend in der Rattenleber wirkt. Dieser Befund wurde in weiblichen Ratten mit Hilfe eines Initiations-Promotions-Protokolls des Leber-Foci-Tests erhoben (Deml, 1993).

Außerdem induziert CPA die Bildung von persistenten, akkumulierenden DNA-Addukten in der Rattenleber (Werner, 1995; 1996) und in Hepatozyten vom Menschen (Werner, 1997). Als Schlussfolgerung daraus ergab sich, dass CPA als ein genotoxisches Kanzerogen anzusehen ist, für das keine unbedenkliche Dosis abgeleitet werden kann.

In epidemiologischen Studien wurde von Heinemann (1997a; 1997b) gezeigt, dass die Behandlung mit CPA unter üblichen und extremen Einnahmebedingungen (Dosen von mehr als 200 mg CPA täglich) bei Erwachsenen nicht zu einem erhöhten Lebertumor-Risiko führt. Im Gegensatz dazu steht eine retrospektive, japanische Studie von Watanabe (1997), in der gezeigt wurde, dass CPA bei Kindern und Jugendlichen unter extremen Einnahmeprotokollen (in Einzelfällen bis zu 600 mg CPA täglich + Wachstumshormone + androgene Steroide) das Risiko einer Lebertumor-Entwicklung birgt. Es wurden unter 1552 Patienten fünf Fälle von bösartigen Lebertumoren gefunden. Allerdings wurden diese nur in der Untergruppe von 24 Patienten gefunden, die eine akkumulierte Dosis von mehr als 500 g erhalten haben.

Das Leberkrebsrisiko bei Kindern führte dazu, dass CPA in der heutigen Zeit für die Behandlung von Pubertas praecox nicht mehr eingesetzt wird und als veraltet gilt.

Aufgrund dieser CPA-Problematik (negativ in der Standardtestbatterie, positiv in der Adduktanalyse) wurde ein spezielles ³²P-Postlabeling-Verfahren für den Nachweis von Addukten, die durch Steroidhormone verursacht werden, entwickelt.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll geprüft werden, ob sich dieses spezielle ³²P-Postlabeling-Verfahren zum Nachweis von Addukten verschiedener Substanzstoffklassen eignet und inwieweit der Nachweis von DNA-Adduktbildung prädiktiv für die mögliche Mutagenität oder Kanzerogenität weiterer Pharmazeutika ist. Experimentell soll dabei die Leberschnitt-Technik in Kombination mit der ³²P-Postlabeling Adduktanalyse zur Untersuchung von langjährig in Deutschland vermarkteten Pharmazeutika auf ihr genotoxisches Potential angewendet werden. Die Ergebnisse der Adduktanalytik werden mit epidemiologischen und/oder tierexperimentellen Daten zur Mutagenität bzw. Kanzerogenität der jeweiligen Substanz verglichen, wobei diese Daten mit Hilfe von Literaturrecherchen aus verschiedenen Datenbanken, wie z.B. Medline, Toxline, Embase, Biosis, Cancerlit, RTECS erhoben wurden.

2.1 Substanzauswahl:

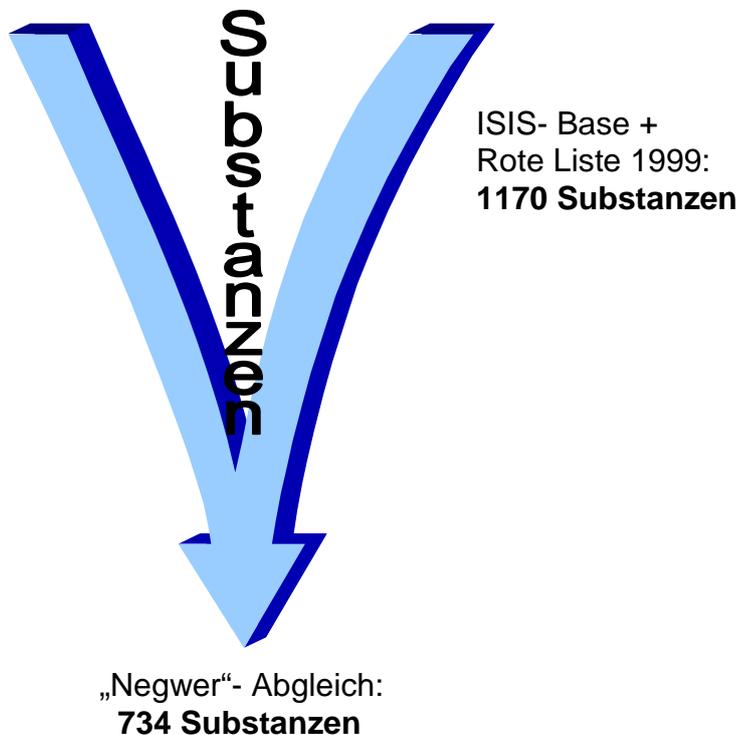
Die Auswahl der zu untersuchenden Pharmazeutika erfolgte nach bestimmten Kriterien:

Zum einen sollten die Substanzen ein Molgewicht zwischen 100 und 600 g/mol aufweisen, um eine Addukt detektion überhaupt zu gewährleisten. Sehr kleine Addukte können mit der Dünnschichtchromatographie nicht nachgewiesen werden, sie gehen verloren.

Zum anderen sollten die Substanzen ca. 30 Jahre in Deutschland zur Anwendung gekommen sein, damit eine ausreichende Latenzzeit für epidemiologische Beobachtungen einer möglichen Kanzerogenität gegeben ist.

Weiterhin sollten die Substanzen über einen Handelsnamen verfügen, um die Substanz ohne Schwierigkeiten in Deutschland beziehen zu können.

Zur Substanzauswahl wurde zunächst der WORLD DRUG INDEX der ISIS-BASE-Datenbank (Version 2.1.4 en) nach Eingabe der Molgewichte durchsucht. Die dabei entstandene Liste wurde mit der Roten Liste 1999 (Rote Liste 1999/I Version 2.7) abgeglichen, um zu überprüfen, ob die ausgewählten Substanzen in Deutschland zugelassen und zur Anwendung kommen. Um die entsprechende Latenzzeit von ca. 30 Jahren einzuhalten wurde die Liste der Substanzen mit dem Namensregister des ‚Negwer‘ (Organisch-chemische Arzneimittel und ihre Synonyma; M. Negwer, 1971) abgeglichen.



2.2 Substanzaufteilung anhand von IARC Kategorien, DEREK Beurteilungen und Literatur

Bei der IARC (International Agency for Research on Cancer) handelt es sich um einen Teil der WHO (World Health Organisation). Der Auftrag der IARC liegt in der Koordination und der Leitung von wissenschaftlichen Forschungen, die sich mit den Gründen der Krebsentstehung beim Menschen beschäftigen. Auch das Forschungsfeld der Mechanismen in der Kanzerogenese und die Entwicklung von wissenschaftlichen Strategien zur Krebsbehandlung gehört in das Aufgabenfeld der IARC.

Diese Abteilung der WHO ist sowohl in die epidemiologische als auch in die experimentelle Forschung involviert und präsentiert wissenschaftliche Informationen durch Veröffentlichungen und auf Versammlungen, Lehrgängen und Weiterbildungen.

Aufgrund der großen Anzahl von insgesamt 734 Substanzen, die nach der Substanzauswahl (siehe 2.1) ermittelt wurden, wurden Vertreter aus verschiedenen IARC-Gruppen für die Untersuchung mit dem ³²P-Postlabeling-Verfahren ausgewählt.

IARC-Gruppe 1:

Die Substanz ist karzinogen für den Menschen:

Diese Kategorie wird vergeben, wenn es genügend Belege für die Karzinogenität im Menschen gibt. Ausnahmsweise kann eine Substanz auch in diese Kategorie eingeteilt werden, wenn die Belege für die Karzinogenität für den Menschen weniger als genügend sind, es jedoch genügend Hinweise für die Karzinogenität im Tierexperiment gibt und starke Hinweise vorhanden sind, dass in exponierten Menschen das Medikament durch einen relevanten Mechanismus karzinogen wirkt.

IARC-Gruppe 2:

Diese Kategorie beinhaltet Substanzen, für die auf der einen Seite der Beweis für die Karzinogenität im Menschen genügend ist, und auf der anderen Seite solche Substanzen, für die es keine menschlichen Daten über die Karzinogenität gibt, dafür aber Hinweise für die Karzinogenität im Tierexperiment. Die Einteilung erfolgt in Gruppe 2A (wahrscheinlich karzinogen für den Menschen) und Gruppe 2B (möglicherweise karzinogen für den Menschen) aufgrund der epidemiologischen und experimentellen Beweise für die Karzinogenität und anderer relevanter Daten.

IARC-Gruppe 2A:

Die Substanz ist wahrscheinlich karzinogen für den Menschen:

Diese Kategorie wird vergeben, wenn es begrenzte Hinweise für die Karzinogenität im Menschen gibt und genügend Hinweise für die Karzinogenität im Tierversuch. In manchen Fällen kann eine Substanz in diese Gruppe eingeteilt sein, wenn es ungenügende Hinweise für die Karzinogenität im Menschen gibt, aber genügend Beweise für die Karzinogenität im Tierversuch und zudem der starke Verdacht besteht, dass die Karzinogenese durch einen Mechanismus hervorgerufen wird, der so auch im Menschen auftritt. Ausnahmsweise kann ein Stoff auch nur aufgrund begrenzter Hinweise für die Karzinogenität im Menschen in diese Gruppe eingeteilt werden.

IARC-Gruppe 2B:

Die Substanz ist möglicherweise karzinogen für den Menschen:

Diese Kategorie wird vergeben für Substanzen, für die es begrenzte Beweise für die Karzinogenität im Menschen gibt und weniger als genügend Hinweise für die Karzinogenität im Tierversuch. Diese Kategorie wird auch vergeben, wenn es ungenügende Hinweise für die Karzinogenität im Menschen gibt, aber genügend Beweise für die Karzinogenität im Tierversuch. Unter manchen Umständen kann eine Substanz auch in diese Gruppe eingeteilt werden, wenn es ungenügende Hinweise für die Karzinogenität in Menschen gibt, aber begrenzte Beweise für die Karzinogenität im Tierversuch zusammen mit unterstützenden Argumenten anderer wichtiger Daten dafür sprechen.

IARC-Gruppe 3:

Die Substanz ist bezüglich seiner Karzinogenität beim Menschen nicht klassifizierbar:

Diese Kategorie wird gewöhnlich für Substanzen vergeben, für welche die Belege für die Karzinogenität im Menschen ungenügend und im Tierversuch ungenügend oder begrenzt sind. Ausnahmsweise können Substanzen in diese Kategorie eingeteilt werden, für die der Beweis für die Karzinogenität im Menschen ungenügend ist, aber genügend im Tierversuch und wenn es einen starken Beweis dafür gibt, dass der karzinogene Mechanismus zwar im Tier, aber nicht im Menschen existiert.

Substanzen, die nicht in andere Gruppen fallen, werden auch in diese Kategorie eingeteilt.

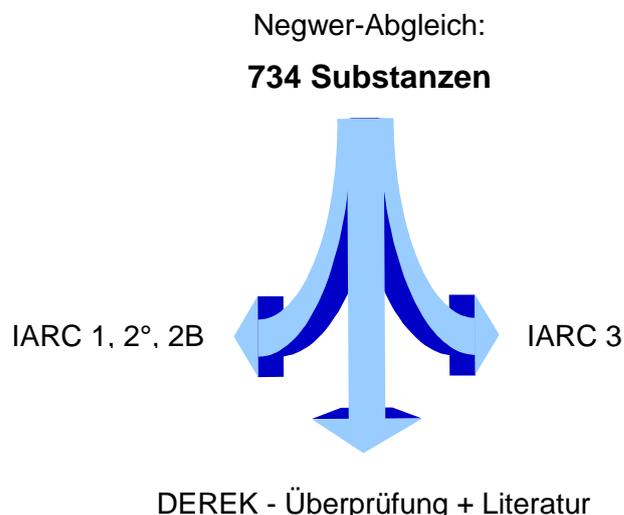
IARC-Gruppe 4:

Die Substanz ist wahrscheinlich nicht karzinogen für den Menschen: Diese Kategorie wird eingesetzt für Substanzen, für die es keine Belege gibt, die auf eine Karzinogenität weder beim Menschen noch im Tierversuch hinweisen. In manchen Fällen werden Substanzen auch in diese Gruppe eingeteilt, wenn es ungenügende Belege über die Karzinogenität im Menschen gibt, aber Belege für ein Fehlen der Karzinogenität im Tierversuch nahe liegen und diese Aussagen noch nachhaltig durch andere relevante Daten unterstützt werden.

Unter Einsatz des *in silico* DEREK-Programmes (**D**eductive **E**stimation of **R**isk from **E**xisting **T**oxikological **K**nowledge), bei dem es sich um ein Expertensystem zur Erkennung von Molekülstrukturen, sogenannten Toxikophoren, die Mutagenität oder Kanzerogenität verursachen können, handelt, werden die Substanzen der entstandenen Liste auf Mutagenitäts- und Kanzerogenitätstoxikophoren überprüft. Die Substanzen, die bei dieser Überprüfung einen Verdacht auf Mutagenität oder Kanzerogenität aufkommen lassen, werden auf ihr Adduktbildungspotential hin untersucht.

Eine parallele Vorgehensweise zur Substanzauswahl besteht darin, die Pharmazeutika, die in der epidemiologischen Literatur (z.B. Prescription Drug Screening for Subsequent Carcinogenicity; S. K. van den Eeden, 1995) zu den positiv mit einem Kanzerogenitätsverdacht korrelierten Arzneimittel gehören, mit der entstandenen Liste abzugleichen.

Ferner wird für jede ausgewählte Substanz eine Literaturrecherche zum Thema Kanzerogenität/Mutagenität/DNA-Addukte angestrebt.



3 Material und Methoden

3.1 Tiere

3.1.1 Ratten

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten weiblichen Ratten des Stammes SHOE Wistar stammten aus Schönwalde.

Sie wurden im Tierstall der Toxikologie bei 20 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 bis 75% in Makrolonkäfigen Typ III mit geschlossenem Boden auf staubfreiem Weichholzgranulat mit Tränkwasser und Alleinfutter Typ Altromin (Nr. 1324) ad libitum in 4er Gruppen gehalten. Sie hatten vor der Tötung zur Leberentnahme ein Gewicht von ca. 220-350 g.

3.1.2 Affen

Bei den verwendeten Affen handelt es sich um *Macaca fascicularis* (Cynomolgus), welche im Rahmen von laufenden regulatorisch erforderlichen Prüfungen als Kontrolltiere eingesetzt waren.

3.2 Wasser

Für das Ansetzen von Chemikalien, Puffern, Lösungen und Enzymen wurde demineralisiertes Wasser aus einer Millipore Anlage verwendet.

3.3 Herstellung und Inkubation von Leberschnitten

3.3.1 Kulturmedium und Lösungen

Krebs-Henseleit-Puffer (KH):	6,87g NaCl	Fa. Merck
	0,40g KCl	Fa. Merck
	0,25g MgSO ₄ x 7H ₂ O	Fa. Riedel de Haen
	0,13g KH ₂ PO ₄	Fa. Merck
	2,20g NaHCO ₃	Fa. Riedel de Haen
	0,25g CaCl ₂	Fa. Merck
	5,00g Glucose	Fa. Serva
	auf 1000mL H ₂ O	

Um die Ausfällung von Calcium- und Magnesiumcarbonat/-phosphat zu verhindern, wurden die Calcium- und Magnesiumsalze jeweils getrennt von den übrigen Bestandteilen gelöst. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl (Merck) auf pH 7,4 eingestellt und für 40 Minuten mit Carbogen (95% O₂/5% CO₂) begast. Die Haltbarkeit des Puffers beträgt ca. 6 Wochen bei ca. 4°C. Vor Gebrauch wurde der eisgekühlte Puffer für ca. 1 h erneut begast.

Dimethylsulfoxid	Fa. Sigma
------------------	-----------

Für die Kaliumbestimmung:

Kalium-Standardlösung 1,000g K/L	Fa. B. Kraft
Cäsiumchlorid Suprapur	Fa. Merck
Rinderleberextrakt als Referenzsubstanz	Fa. Winopal (1577b)

3.3.2 Geräte

Zur Herstellung der Schnitte:

Krumdieck Tissue Slicer	Fa. Alabama Research and Development Corporation, Munford, Alabama, USA
Bohrmaschine mit Geschwindigkeits-Regulierung; Stativ	Fa. Bosch GmbH, Leinfelden-Echterdingen
Hohlbohrer aus Nirosta (0,8 cm)	

Zur Inkubation:

CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus, Hanau
Rotationsschüttler (z.B. Typ: MTS 2)	Fa. Janke und Kunkel, Staufen
Kulturplatten (12-well plates)	Fa. Technorama, Fernwald

Zur Kaliumbestimmung:

Atom-Absorptions-Spektrometer (AAS)	Fa. Perkin Elmer Ltd., Überlingen
Polytron PT 1200	Fa. Kinematica AG, Littau, Schweiz

3.3.3 Herstellung der Leber- bzw. Nierenschnitte

Die Ratten wurden mit Chloroform betäubt und durch Entbluten über die Vena cava inferior getötet. Das Leber- bzw. Nierenmaterial der eingesetzten Tiere wurde jeweils gepoolt.

Die Lebern der Ratten und der Affen sowie die Affennieren stellte das Institut für experimentelle Toxikologie der Schering AG zur Verfügung. Bei diesen Tieren handelte es sich in der Regel um Kontrolltiere aus abgeschlossenen systemischen Verträglichkeitsprüfungen.

Die frisch entnommenen Lebern bzw. Nieren wurden in eisgekühltem, frisch oxygenierten Krebs-Henseleit-Puffer (KH) gespült und für maximal 30 min gelagert. Mit einem Hohlbohrer (8 mm) wurden aus den frischen Leber- bzw. Nierenproben Zylinder herausgeschnitten. Dabei wurde das jeweilige Gewebe auf ein Löschpapier gelegt und der Hohlbohrer bei geeigneter Umdrehung mit gleichmäßigem Druck über ein Stativ nach unten gezogen. Die so hergestellten, gleichmäßig aussehenden Gewebezylinder wurden sofort wieder in eisgekühlten, frisch oxygenierten KH überführt und dort bis zum Schneiden aufbewahrt.

Die Gewebezylinder wurden bei der Ratte möglichst aus der Mitte der beiden verwendeten Hauptleberlappen herausgeschnitten. Die Auswahl des zu schneidenden Gewebestückes erfolgte aus Abschnitten, die möglichst frei von größeren Gefäßen waren. Das Material musste in jedem Fall so positioniert werden, dass senkrecht zu den großen Gefäßen geschnitten wurde.

Die Herstellung der Schnitte erfolgte im Krumdieck-Tissue-Slicer (Abbildung 7) (Brendel et al, 1987) unter eisgekühltem, frisch oxygeniertem KH.

Am Gerät wurde die Schnittfrequenz (Cycle Speed) auf einen durchschnittlichen Wert von 55 und die Klingebewegung auf konstanten Modus eingestellt.

Die Schnittdickeneinstellung betrug in der Regel 2,4 μm . Beim Schneiden wurden zur Beschwerung der Gewebezylinder Metallscheiben aufgelegt (bei den Rattenlebern 1 und bei den Affenlebern und Nieren 2 Scheiben).

Die Schnittdicke der so hergestellten Schnitte betrug etwa 270 μm mit einem Gewicht zwischen 13 und 18 mg.

Von der weiteren Verwendung ausgeschlossen wurden Leberschnitte, die große Blutgefäße und/oder viel Bindegewebe (Leberkapsel) oder ungleichmäßige Schnittflächen aufwiesen. Nach dem Schneiden erfolgte eine Sammlung der Schnitte in eisgekühltem, frisch oxygeniertem KH und eine Überführung dieser in die Kulturplatten innerhalb von maximal 20 min.

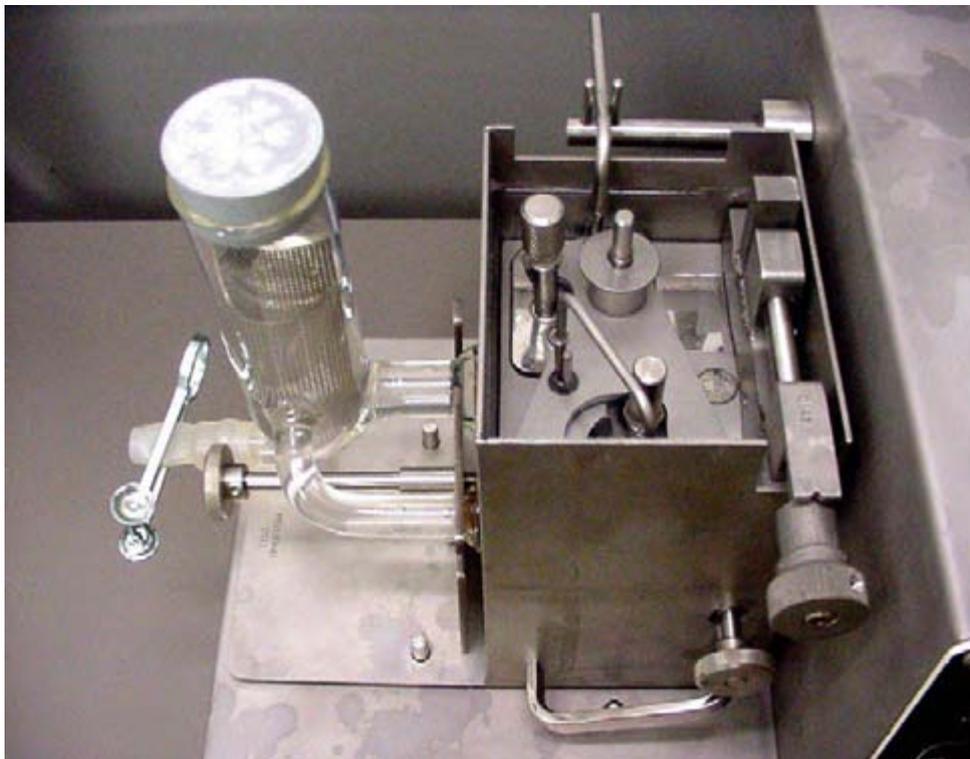


Abbildung 7: Krumdieck-Tissue-Slicer

3.3.4 Inkubation der Leberschnitte mit Testsubstanzen

Die Leberschnitte wurden, in Anlehnung an die von Dogterom (1993) beschriebene Methode, mit einem aufgebogenen Metallspatel in die mit prä-inkubierten Krebs-Henseleit-Puffer (30 min unter Brutschrankbedingungen) gefüllten 12-well-Kulturplatten überführt (Abbildung 8). Die Rattenleberschnitte inkubierten mit 1,5 mL Krebs-Henseleit-Puffer (KH) einzeln pro well, wohingegen die Affenleberschnitte paarweise pro well inkubiert wurden.

Die 12-well-Platten wurden während der Inkubation auf Rotationsschüttlern im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ mit hoher Luftfeuchte leicht bewegt (ca. 100 U/min), so dass ein gleichmäßiges Umspülen der in den Lösungen schwebenden Schnitte gewährleistet wurde. Um einerseits eine Gaszirkulation über den Medien in den 12-well-Platten zu ermöglichen, aber andererseits auch ein übermäßiges Verdunsten der Medien zu vermeiden, wurden die Deckel der Kulturplatten mit Gummischläuchen (4 mm) als Abstandshalter aufgelegt. Nach erfolgter 6-stündiger Inkubation wurden die Schnitte vorsichtig aus dem KH entnommen, kurz in physiologischer Kochsalzlösung gespült, mehrfach (ca. 10 x) auf Parafilm abgetupft und in Eppendorf-Gefäßen abgewogen. Die Schnitte lagerten bis zur weiteren Bearbeitung bei ca. -75°C.

Die Herstellung von Schnitthomogenaten erfolgte nach Zusatz von 1,0 mL Aqua demin. aus eingefrorenen Schnitten mittels Polytron.

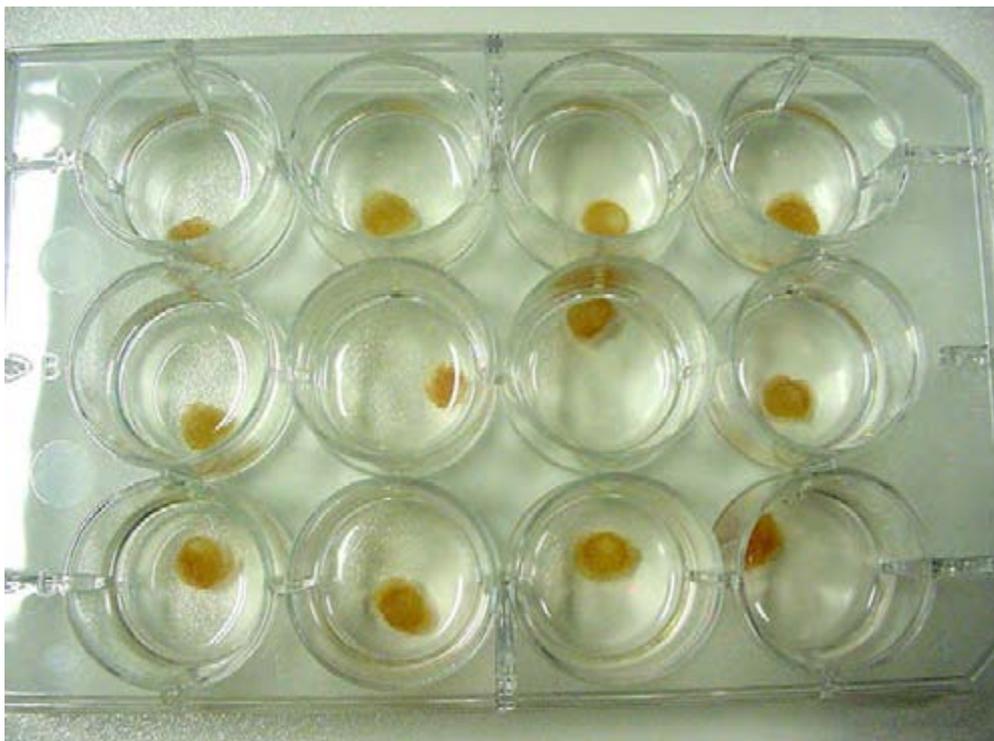


Abbildung 8: Inkubation der Leberschnitte in 12-well plates

3.3.5 Bestimmung des intrazellulären Kaliumgehaltes

Die Aufrechterhaltung der transmembranären Ionengradienten gilt allgemein als sehr sensibler Parameter zur Beurteilung des physiologischen Zustands ("viability") von Zellsystemen. Der intrazelluläre Kaliumgehalt ist ein geeigneter Parameter für den Zustand der Ionenpumpen unter der Inkubation.

Der intrazelluläre Kaliumgehalt wurde mittels Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS) bestimmt (Baumann et al, 1996).

Prinzip: In der Atom-Absorptions-Spektrometrie werden Lösungen von Metall-Salzen in einer Flamme verdampft und gleichzeitig die Atome durch Einstrahlen von Licht angeregt. Die absorbierte Lichtintensität wird als Messwert zur quantitativen Analyse verwendet. Der Kaliumgehalt der Lösungen wird im Vergleich mit einer Kalibrierungskurve ermittelt.

Vorgehen: Aus den eingefrorenen Leberschnitten wurden nach Zusatz von 1,0 mL Aqua demin. mit Hilfe des Polytron Schnitthomogenate hergestellt. Anschließend wurde das Homogenat mit Aqua demin. 1:50 verdünnt und mit spektralem Puffer (1% CsCL) versetzt.

Der Messbereich der Eich- und Probenlösungen lag zwischen 0,1-1,0 µg Kalium/mL.

Die Kaliumkonzentrationen der Probenlösungen und Kontroll-Lösungen wurden im Vergleich zur Eichgeraden anhand einer linearen Regression bestimmt und auf nmol K⁺/mg Schnitt berechnet.

Richtigkeit und Präzision der Bestimmungen wurden durch Mitführen eines Standards (6 unterschiedliche Konzentrationen) und einer Referenzsubstanz (4x) in jeder Messreihe überprüft.

Bewertung: Der intrazelluläre Kaliumgehalt steigt mit Beginn der Inkubation (1-2 h) zunächst an (Baumann, 1996; Dogterom, 1993), erreicht ein Plateau, um anschließend wieder abzufallen. Lagen die zum Ende der Inkubationszeit gemessenen intrazellulären K⁺-Konzentrationen unter den Ausgangswerten (0 h), so war dies als zytotoxischer Effekt der Prüfsubstanz zu bewerten.

3.4 DNA-Isolierung

Zur DNA-Adduktanalyse mittels ^{32}P -Postlabeling-Technik wird RNA- bzw. proteinfreie DNA benötigt. Die hier beschriebene Methode eignet sich für die DNA-Isolierung aus Leberschnitten bzw. Lebergewebe.

3.4.1 Chemikalien

Agarose	Fa. Serva
Bromphenolblau (MG 692,0)	Fa. Serva
EDTA (MG 372,2)	Fa. Sigma
Ethanol	Fa. Merck
Ethidiumbromid, wässrige Lösung	Fa. Serva
Isoamylalkohol	Fa. Merck
Natriumchlorid (MG 58,4)	Fa. Merck
Phenol	Fa. Roth
Phenol/Chloroform	Fa. Roth
Tris (MG 121,1)	Fa. Merck
Proteinase K	Fa. Boehringer (745723)
RNA aus Hefe	Fa. Boehringer
RNase A	Fa. Boehringer (109169)
RNase T ₁	Fa. Boehringer (109193)
Tween 20	Fa. Sigma
Triton X-100	Fa. Fluka
Salzsäure, rauchend (MG 36,5)	Fa. Merck
Natronlauge 32% (MG 40,0)	Fa. Riedel-de-Haen
Natriumacetat, wasserfrei (MW 82,0)	Fa. Merck
Chloroform	Fa. Merck
Essigsäure (MG 60,1)	Fa. Merck
Glycerin (MG 92,1)	Fa. Sigma

3.4.2 Geräte

Speed Vac	Fa. Savant
Vortex	Fa. IKA-Works, INC.
Mikroliter-Pipette (z.B. 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)	Fa. Eppendorf
Mikrozentrifuge	Fa. Eppendorf
Wasserbad	Fa. GFL
Gefrierschrank	Fa. Heraeus
Analysenwaage	Fa. Mettler
Thermoblock	Fa. GRANT
Gelelektrophorese Netzgerät	Fa. Pharmacia
Gelelektrophoresekammer	Fa. BIO-RAD
UV/VIS Spektralphotometer	Fa. Pharmacia
Mikrowelle	Fa. Bosch

3.4.3 Herstellung der Lösungen

Hydrolysepuffer

(50 mM Tris/Cl; 50 mM EDTA; 0,5% Tween 20; 0,5% Triton X-100, pH 8)

5 mL	1 M Tris/Cl, pH 8,
10 mL	500 mM EDTA, pH 8,
500 µL	Tween 20,
500 µL	Triton X-100

ad 100 mL Aqua demin.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei RT

1 M Tris/Cl pH 8

12,11 g Tris ad 100 mL Aqua demin.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf pH 8 eingestellt.

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei ca. 4°C

500 mM EDTA pH 8

18,61 g EDTA ad 100 mL Aqua demin.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 32% NaOH auf pH 8 eingestellt.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei RT

Proteinase K (20 mg/mL)

Das Enzym wurde in Aqua demin. gelöst, aliquotiert und eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei ca. –20 °C

RNase A (10 mg/mL)

10 mg RNase A werden in 900 µL 0,01 M Natriumacetat pH 5,2 gelöst, für 15 min bei ca. 100°C erhitzt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde sie mit 100 µL 1 M Tris/Cl pH 7,4 versetzt, aliquotiert und eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei ca. –20°C

0,01M Natriumacetat pH 5,2

82 mg Natriumacetat ad 100 mL Aqua demin.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf pH 5,2 eingestellt.

Haltbarkeit: ca. 5 Jahre bei ca. –20°C

1 M Tris/Cl pH 7,4

12,11 g Tris ad 100 mL Aqua demin.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend aliquotiert und eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 5 Jahre bei ca. –20°C

RNase T1 (4000 U/mL)

Das Enzym wurde in Aqua demin. mit einer Konzentration von 4000 Unit/mL gelöst, aliquotiert und eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei ca. –20°C

Phenol

Redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol, pH 7,5-8,0, wurde mit Puffer überschichtet.

Haltbarkeit: nach dem Öffnen ca. 1 Jahr bei ca. 4°C

Phenol / Sevag

1 Teil Phenol + 1 Teil Sevag

Haltbarkeit: nach dem Öffnen ca. 1 Jahr bei ca. 4°C

Sevag

24 Teile Chloroform + 1 Teil Isoamylalkohol

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei RT

5 M NaCl

z.B. 29,22 g Natriumchlorid ad 100 mL Aqua demin.

Haltbarkeit: ca. 5 Jahre bei RT

10 mM Tris/Cl pH 8

z.B. 121,1 mg Tris ad 100 mL Aqua demin.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf pH 8 eingestellt.

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei ca. 4°C

Agarose (1%)

z.B. 3 g Agarose ad 300 mL 1 x TAE-Puffer wurde durch Erhitzen gelöst
(z.B. Mikrowelle)

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei RT

50 x TAE-Puffer (2 M Tris/Cl pH 7,8; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA)

242 g Tris

18,61 g EDTA

57,1 mL konz. Essigsäure

ad 1000 mL Aqua demin.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei RT

1 x TAE-Puffer (40 mM Tris/Cl pH 7,8; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA)

Eine 1:50 Verdünnung in Aqua demin. wurde aus 50 x TAE-Puffer hergestellt
(z.B. 5 mL + 245 mL)

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei RT

Stopp-Puffer

4,41 g	Glycerin
0,5 mL	10 x TAE-Puffer
0,5 mL	20 mM EDTA
2,5 mg	Bromphenolblau

10 x TAE-Puffer (400 mM Tris/Cl pH 7,8; 200 mM Essigsäure, 10 mM EDTA)

Eine 1:5 Verdünnung in Aqua demin. wurde aus 50 x TAE-Puffer hergestellt

(z.B. 1 mL + 4 mL)

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei RT

20 mM EDTA

Eine 1:25 Verdünnung in Aqua demin. wurde aus 500 mM EDTA, pH 8 hergestellt

(z.B. 100 µL + 2400 µL).

Haltbarkeit: ca. 5 Jahre bei ca. 4°C

RNA-Standard

RNA aus Hefe wurde in 10 mM Tris/Cl pH 8 in gewünschter Konzentration gelöst, aliquotiert und eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 5 Jahre bei ca. -20°C

3.4.4 Isolierung der DNA

Das Prinzip der DNA-Isolierung beruht auf der Hydrolyse der Zellproteine mit Proteinasen bzw. RNA durch RNasen und der anschließenden Fällung (Abbildung 9).

Die DNA-Isolierung wurde in Anlehnung an Gupta (1984) durchgeführt.

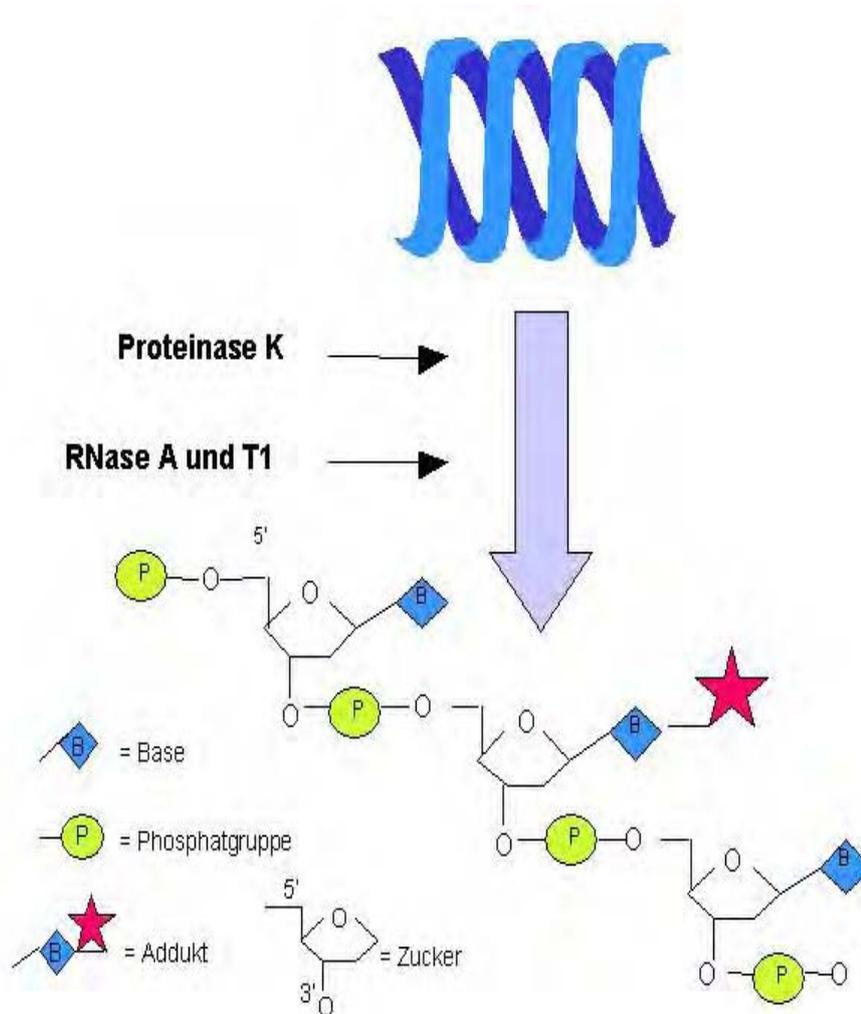


Abbildung 9: DNA-Isolierung

3.4.4.1 Hydrolyse der Zellproteine

Zuerst wurde das Gewicht eines Leberschnittes bestimmt. Pro mg Gewebe wurden 14,4 μL Hydrolysepuffer und 1,6 μL Proteinase K zugegeben.

Die Inkubation der Proben in einem Thermoblock dauerte ca. 20 h bei 55°C.

Anschließend wurde die Proteinase K für 10 min bei 70°C inkubiert und dadurch denaturiert. Die Proben wurden anschließend sofort der RNase-Behandlung unterzogen.

3.4.4.2 RNase-Behandlung

Zu jedem Hydrolysat wurden 3,2 μL RNase A und 1,2 μL RNase T₁ pro mg Gewebe zugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die DNA-Extraktion erfolgte sofort im Anschluss.

3.4.4.3 DNA-Extraktion

Zum Hydrolysat wurden 500 μL Phenol pipettiert, für ca. 20 sec gevortext und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Abnehmen der wässrigen Phase und Überführen dieser in ein frisches Eppendorf-Gefäß.

Die Phenolphase wurde erneut mit 200 μL Hydrolysepuffer versetzt, für ca. 20 sec gevortext und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde

abgenommen, beide wässrigen Phasen wurden vereint und mit 500 μL

Phenol/Sevag versetzt, für ca. 20 sec gevortext und 5 min bei 14000 rpm

zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen und mit 500 μL

Sevag versetzt, für ca. 20 sec gevortext und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert.

Anschließend erfolgte ein letztes Abnehmen der wässrigen Phase.

3.4.4.4 DNA-Fällung

Ein Aliquot 5 M NaCl (ca. 1/10 des Volumens der wässrigen Phase) wurde zur wässrigen Phase zugegeben und für ca. 5 sec gevortext, dann wurde vorsichtig

1 mL abs. Ethanol (gelagert bei ca. -20°C) zugegeben und durch sanftes Hin- und

Herschwenken die DNA gefällt. Eine kurzzeitige Aufbewahrung der Proben

erfolgte für 15 min bei ca. -20°C. Anschließend wurden die Proben für

30 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das

Pellet dreimal mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen und anschließend kurz an

der Luft angetrocknet. Das Pellet wurde in 10 mM Tris/Cl pH 8 gelöst

(100 μL), 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend gevortext. Der DNA-

Gehalt wurde photometrisch bestimmt, die DNA-Lösung bei ca. -75°C

eingefroren und bis zur Adduktanreicherung aufbewahrt.

3.4.5 Photometrische DNA-Quantifizierung

Hergestellt wurde eine Verdünnung der DNA-Lösung, die dann photometrisch vermessen wurde. Die Extinktion bei den Wellenlängen 260 und 280 nm wurde bestimmt. Der DNA-Gehalt der Lösung errechnete sich über die folgende Formel:

$$\text{DNA-Gehalt } [\mu\text{g}/\mu\text{L}] = A_{260 \text{ nm}} \times 50 [\mu\text{g}/\text{mL}] \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$$

Zusätzlich wurde noch die DNA-Menge und die DNA-Ausbeute berechnet:

$$\text{DNA-Menge } [\mu\text{g}/\text{Gesamtvolumen}] = \text{DNA } [\mu\text{g}/\mu\text{L}] \times \text{Gesamtvolumen } [\mu\text{L}]$$

$$\text{DNA-Ausbeute } [\mu\text{g}/\text{mg Gewebe}] = \text{DNA-Menge } [\mu\text{g}] / \text{eingesetztes Gewebe } [\text{mg}]$$

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde der berechnete **Quotient** $A_{260 \text{ nm}/280 \text{ nm}}$ hinzugezogen.

Der Quotient sollte einen Wert zwischen 1,60 und 2,00 aufweisen.

Die Proben mit einem Quotienten $< 1,6$ (Protein-Kontamination) wurden trotzdem analysiert, jedoch mussten die Resultate des DNA-Adduktexperiments solcher Proben kritisch überprüft werden. Es wurde darauf geachtet, ob Proteine die Hydrolyse und Anreicherung so stark gestört haben, dass ein ATP-Mangel bei der Markierung entstand. Bei einem Quotienten von 2,0 (RNA-Kontamination) sollte eine Reinheitskontrolle der DNA mittels Gelelektrophorese durchgeführt werden.

3.4.6 Reinheitskontrolle der DNA

Die Reinheitskontrolle der DNA mittels Gelelektrophorese wurde nicht routinemäßig für alle isolierten DNA-Proben durchgeführt, sondern richtete sich nach dem Ergebnis der DNA-Quotientenbestimmung.

Agarose (1%) wurde in der Mikrowelle verflüssigt und ein entsprechendes Aliquot abgefüllt, mit 5 μL Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/mL) je 100 mL versetzt und in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach dem Erhärten des Gels wurden die DNA-Proben und ein RNA-Standard aufgetragen. Dazu wurden für jede zu untersuchende DNA-Lösung 3 μL Stopp-Puffer in ein Eppendorf-Gefäß vorgelegt und 5 μg DNA dazupipettiert, ggf. mit Aqua demin. auf ca. 10 μL aufgefüllt, gevortext, zentrifugiert und in die Probenaschen des Agarosegels aufgetragen. Als RNA-Standard konnten 2,5 - 30 μg RNA verwendet werden. Die Entwicklung des Gels erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 70 V. Anschließend wurde die DNA/RNA im langwelligen UV Licht sichtbar gemacht und mit einer Sofortbildkamera photographiert.

3.5 DNA-Hydrolyse und Adduktanreicherung

3.5.1 Chemikalien

Bernsteinsäure (MG 118,09)	Fa. Merck
Calciumchlorid (MG 110,99)	Fa. Merck
Natronlauge (MG 40,00)	Fa. Riedel-de Haen
Micrococcus-Nuklease (MN)	Fa. Sigma
Milz-Phosphodiesterase (SPDE)	Fa. Sigma
Natriumacetat (MG 82,03)	Fa. Merck
Essigsäure (MG 60,05)	Fa. Merck
Zinkchlorid (MG 136,29)	Fa. Riedel-de Haen
Nuklease P1	Fa. Sigma; Fa. Roche
Tris (MG 121,14)	Fa. Merck
Ameisensäure (MG 46,03)	Fa. Merck
25% Ammoniak (MG 17,03)	Fa. Riedel-de Haen
Tetrabutylammoniumchlorid (MG 277,92)	Fa. Aldrich
Salzsäure (MG 36,46)	Fa. Merck
1-Butanol	Fa. Aldrich

3.5.2 Geräte

Speed Vac	Fa. Savant
Vortex	Fa. IKA-Works
Pipette (z.B. 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)	Fa. Eppendorf
Tischzentrifuge	Fa. Eppendorf
Blockthermostat	Fa. Kleinfeld
Brutschrank	Fa. Heraeus
Gefrierschrank	Fa. Heraeus
Slide-A-Lyzer Cassette	Fa. Pierce
pH-Meter	Fa. Knick
Magnetrührer	Fa. Janke & Kunkel
1 mL Reaktionsgefäße*	Fa. Eppendorf

* Reaktionsgefäße wurden mit Aqua demin. gefüllt, ca. 24 h bei 37°C inkubiert und nochmals mit Aqua demin. gewaschen, anschließend im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Dies wurde durchgeführt, um eventuell zurückgebliebene und störende Weichmacher aus dem Reaktionsgefäß herauszuwaschen.

3.5.3 Herstellung der Lösungen

Hydrolyse-Mix (für 1 Probe)

5 μ L Verdaupuffer + 5 μ L Enzym-Mix

Der Hydrolyse-Mix wurde für weitere Proben entsprechend vervielfältigt. Der Ansatz erfolgte unmittelbar vor der Zugabe zu den Hydrolyseproben.

Verdaupuffer (20 mM Natriumbernsteinsäure pH 6; 13 mM Calciumchlorid)

2,5 mL 0,2 M Natriumbernsteinsäure + 2,5 mL 0,13 M Calciumchlorid wurden gemischt und in 50 μ L Portionen eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei ca. -20°C

Am Tag der Prüfung wurde der Verdaupuffer mit 200 μ L Aqua demin. verdünnt (1:5 Verdünnung).

0,2 M Natriumbernsteinsäure, pH 6,0

z.B. 1,181 g Bernsteinsäure ad 50 mL Aqua demin.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt.

0,13 M Calciumchlorid

z.B. 721 mg Calciumchlorid ad 50 mL Aqua demin.

Haltbarkeit: ca. 5 Jahre bei ca. -20°C

Enzym-Mix (MN 0,4 Unit/ μ L und SPDE 2 mU/ μ L)

Für den Standard-Mix wurden am Tag der Prüfung 10 μ L Micrococcus-Nuklease (MN) der Aktivität 2,0 Unit/ μ L und 40 μ L Milz-Phosphodiesterase (SPDE) der Konzentration 2,5 mUnit/ μ L gemischt. Der Enzym-Mix musste der Probenanzahl entsprechend angepasst werden.

Vor dem Einsatz der Endonuklease (MN) und der Exonuklease (SPDE) mussten diese Enzyme durch Dialyse deionisiert werden.

Micrococcus-Nuklease (MN)

Für die Dialyse wurde die MN in Aqua demin. in gewünschter Konzentration (in der Regel 2 U/ μ L) gelöst und zur Dialyse in eine Slide-A-Lyzer Cassette überführt.

Insgesamt wurde in ca. 5 L kaltem Aqua demin. bei ca. 4°C dialysiert. Die Slide-A-Lyzer Cassette wurde für 3 x 2 h in ca. 1 L Aqua demin. und anschließend über Nacht in ca. 2 L Aqua demin. dialysiert. Die Enzymlösung wurde aliquotiert (15 μ L) und eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei ca. -70°C

Milz-Phosphodiesterase (SPDE)

Die Lösung der SPDE wurde in gleicher Weise wie die der MN dialysiert. Die Enzymlösung wurde nach der Dialyse entnommen und in der Speed Vac bis zur Trockne eingeeengt, anschließend entsprechend der gewünschten Konzentration (2,5 mU/ μ L) in Aqua demin. gelöst, aliquotiert (ca. 50 μ L) und eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei ca. -70°C

Nuklease-Mix (für 1 Probe)

Der Nuklease-Mix bestand aus 3 μ L 0,25 M Natriumacetat pH 5; 1,8 μ L 0,3 mM Zinkchlorid und 1,2 μ L Nuklease P1 und wurde unmittelbar vor der Prüfung hergestellt, sowie der Probenanzahl entsprechend angepasst.

0,25 M Natriumacetat, pH 5,0

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt.

Haltbarkeit: ca. 3 Jahre bei ca. 4°C

0,3 mM Zinkchlorid

Haltbarkeit: ca. 5 Jahre bei RT

Nuklease P1

1 mg Nuklease P1 wurde in Aqua demin. so gelöst, dass eine Endaktivität von 5000 Unit/mL erreicht wurde. Das Enzym wurde aliquotiert (20 μ L) und eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 6 Monate bei ca. -70°C

Sonstige Puffer und Lösungen

0,15 M Tris-Base

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei RT

100 mM Ammoniumformiat, pH 3,5

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Ammoniak auf pH 3,5 eingestellt.

Haltbarkeit: ca. 3 Jahre bei RT

10 mM Tetrabutylammoniumchlorid

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei RT

200 mM Tris/Cl, pH 9,5

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Salzsäure auf pH 9,5 eingestellt.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei ca. 4°C

Wassergesättigtes 1-Butanol

Ein Aliquot von 1-Butanol wurde mit Aqua demin. versetzt und für ca. 1 min gut gemischt. Die Lösung wurde erst verwendet, wenn beide Phasen vollständig getrennt waren und keine Trübung mehr erkennbar war.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei RT

Butanolgesättigtes Wasser

Ein Aliquot Aqua demin. wurde mit 1-Butanol versetzt und für ca. 1 min geschüttelt. Die Lösung wurde erst verwendet, wenn die beiden Phasen vollständig getrennt waren und keine Trübung mehr erkennbar war.

Haltbarkeit: ca. 2 Jahre bei RT

3.5.4 Hydrolyse der DNA

Das Prinzip der DNA-Hydrolyse beruht auf der enzymatischen Spaltung der DNA durch Endo- und Exonukleasen. Die Endonukleasen spalten die Bindungen zwischen Nukleotiden im Innern der DNA-Kette. Die Exonukleasen dagegen spalten nur terminale Nukleotidbindungen. Das Produkt dieser Hydrolysen sind die einzelnen 3'-Desoxynukleotid-Monophosphate (Abbildung 10), die bei der ³²P-Markierung zu 3', 5'-Bisphosphaten umgewandelt werden.

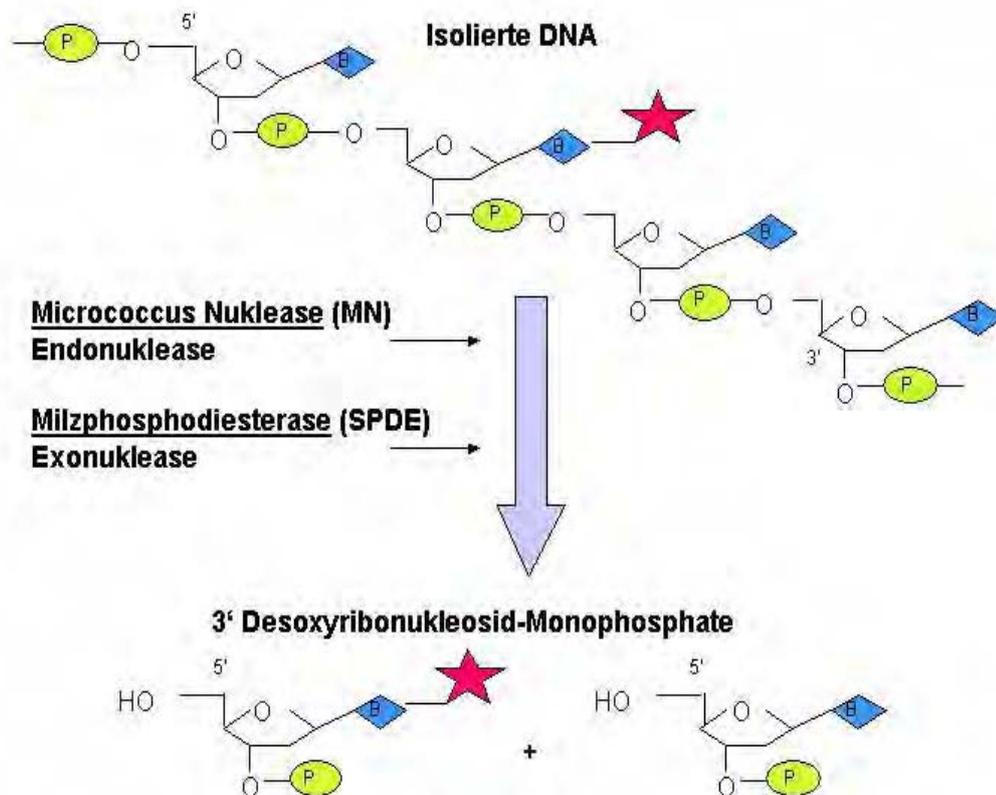


Abbildung 10: DNA-Hydrolyse

Die Durchführung der Hydrolyse erfolgte in Anlehnung an Gupta (1982) mit Modifikationen von Reddy & Randerath (1986):

Je Probe wurden 3 bzw. 1 µg DNA (gelöst in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) in ein vorgewaschenes Eppendorfgefäß pipettiert, in der Speed Vac zur Trockne eingengt und mit je 10 µL Hydrolyse-Mix (Enzym-Mix und Verdaupuffer) versetzt. Die Proben wurden anschließend ca. 15 sec auf höchster Stufe gevortext und durch eine kurze Zentrifugation wurde die Flüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Die Ansätze wurden anschließend für 3 h bei 37°C in einem Blockthermostaten inkubiert.

Die Hydrolyse der DNA für beide Varianten der Addukt-Anreicherung (Nuklease P1 siehe 3.5.5.1 oder Butanol siehe 3.5.5.2) wurden in der Regel getrennt angesetzt. Die hydrolysierten DNA-Proben wurden entweder bei ca. -70°C eingefroren oder sofort in einem Anreicherungsverfahren eingesetzt.

3.5.5 Anreicherung

Um die Nachweisgrenze der Addukte weiter herabzusetzen, wurden folgende Methoden des Anreicherungsverfahrens (enzymatisch -Reddy & Randerath 1986 und nicht enzymatisch - Gupta 1985) eingesetzt:

3.5.5.1 Behandlung der Nukleotide mit Nuklease P1

Das Prinzip der enzymatischen Anreicherungs-methode beruht darauf, dass die nichtmodifizierten Nukleotide vom Enzym (Nuklease P1) als Substrat erkannt und hydrolysiert werden, während die sperrigen ("bulky") Addukte aufgrund ihrer Beschaffenheit von dem Enzym nicht als Substrat erkannt und daher nicht hydrolysiert werden (Abbildung 11).

Die Nuklease P1 spaltet die 3'-Phosphatgruppe von nichtmodifizierten Nukleotiden ab. Diese Gruppe ist für die nachfolgende Markierung mit [^{32}P]-ATP an der 5'-Position des Moleküles zwingend notwendig.

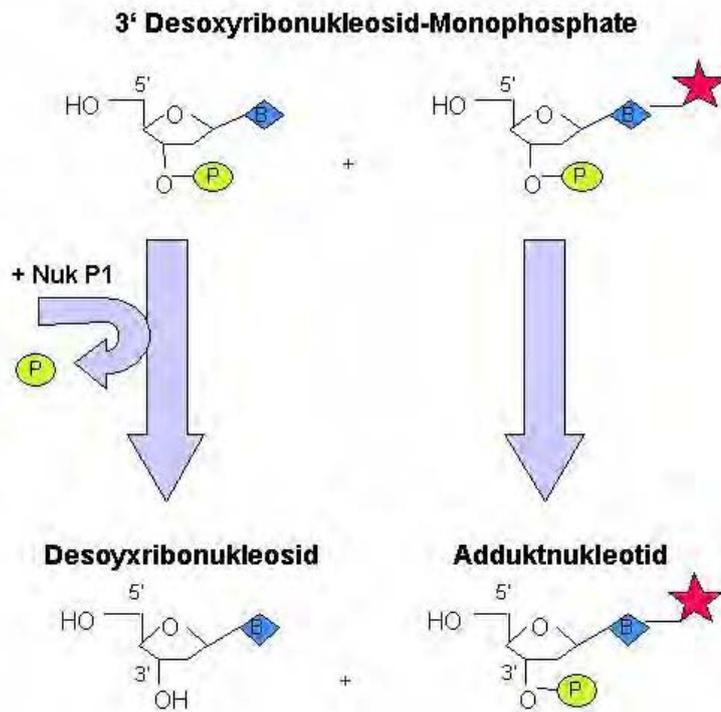


Abbildung 11: Nuklease P1 – Anreicherung

Um die nicht-modifizierten Nukleotide zu dephosphorylieren, wurden die hydrolysierten DNA-Proben (je 10 μL) mit jeweils 6 μL Nuklease P1-Mix versetzt. Nach erneutem Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Lösungen für 40 min bei 37°C in einem Blockthermostaten inkubiert. Um die Aktivität von Nuklease P1 zu stoppen, wurden je 8 μL 0,15 M Tris-Base zugegeben, wiederholt gevortext und kurz auf höchster Stufe abzentrifugiert.

Aus jedem Reaktionsgemisch (3 bzw. 1 μg hydrolysierte DNA) wurden z.B. 2 x 8 μL (je 1 bzw. 0,33 μg angereicherte DNA) aliquotiert und bis zum Einsatz im Postlabeling-Experiment im Gefrierschrank (ca. -70°C) aufbewahrt. Der Rest wurde verworfen.

3.5.5.2 Butanolextraktion

Eine weitere Anreicherungsverfahren ohne Enzymbeteiligung ist die Butanolextraktionsmethode. In dieser Zweiphasenextraktion wandern die Addukte aufgrund ihrer höheren Lipophilie in die organische Butanolphase, während die nichtmodifizierten Desoxynukleotide zum überwiegenden Teil in der wässrigen Phase verbleiben (Abbildung 12).

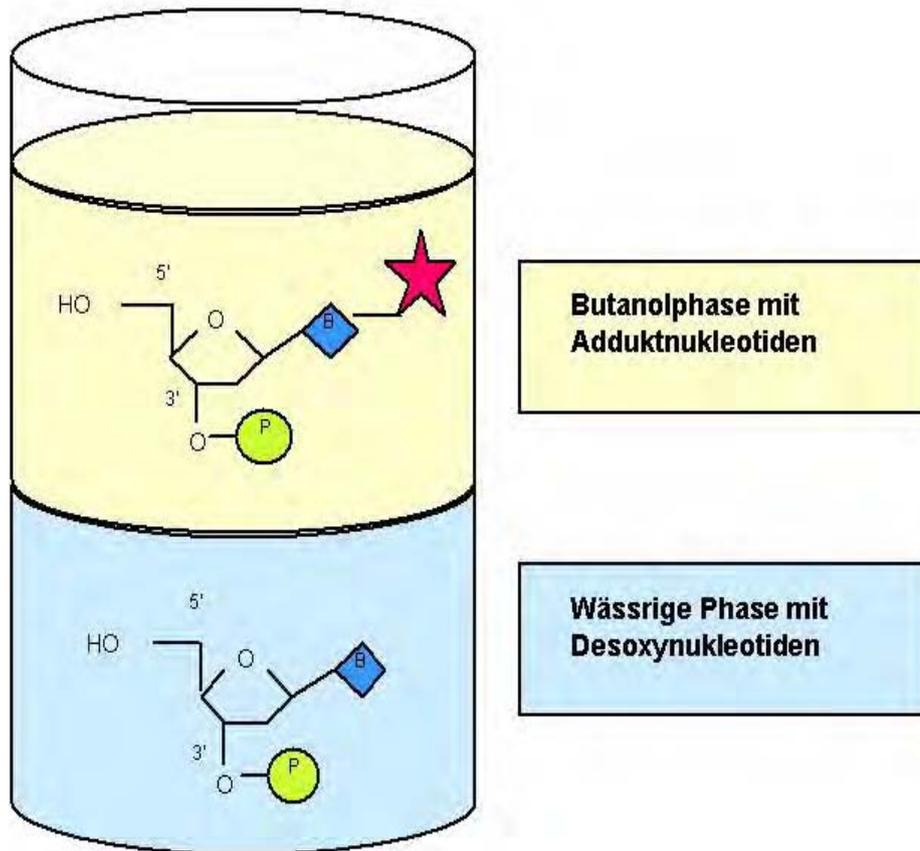


Abbildung 12: Butanolextraktion

Zur Abtrennung der unmodifizierten Nukleotide von den Addukten, wurden die 10 μL der hydrolysierten DNA-Probe mit 20 μL 100 mM Ammoniumformiat pH 3,5, zur pH-Werteinstellung, und 20 μL 10 mM Tetrabutylammoniumchlorid als Phasentransfer-Reagenz versetzt. Das Volumen wurde mit Aqua demin. auf 200 μL aufgefüllt und mit 200 μL wassergesättigtem Butanol versetzt, ca. 30 sec gevortext und ca. 30 sec zentrifugiert. Die Oberphase (Butanol-Phase) überführte man anschließend in ein neues, vorgewaschenes Eppendorfgefäß. Die wässrige Phase wurde noch 2 x mit wassergesättigtem Butanol extrahiert (wie oben beschrieben) und die Oberphasen vereinigt. Diese vereinigten Oberphasen wurden 4 x mit je 360 μL butanolgesättigtem Wasser extrahiert, ca. 30 sec gevortext, ca. 30 sec zentrifugiert und die Oberphasen abgehoben. Zum Abschluß wurden die Oberphasen mit 3 μL 0,20 M Tris/Cl pH 9,5 neutralisiert und zur Trockne in der Speed Vac eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in ca. 1/10 des Anfangsvolumens in Aqua demin. aufgenommen und wieder zur Trockne eingengt. Insgesamt wiederholte man diesen Vorgang 2 x. Der Rückstand wurde in 24 μL Aqua demin. aufgenommen, in z.B. 2 x 8 μL aliquotiert und bis zum Einsatz im Postlabeling-Experiment im Gefrierschrank (ca. -70°C) aufbewahrt. Der Rest wurde verworfen.

3.6 Technik des ^{32}P -Postlabeling

3.6.1 Chemikalien

T4-Polynukleotidkinase (PNK)	Fa. Pharmacia (z.B. 27-0736-02)
Apyrase	Fa. Sigma (z.B. A7646)
Bicin (MG 163,2) z.A.	Fa. E. Merck
DTT (MG 154,2) z.A.	Fa. E. Merck
Spermidin (MG 145,3) z.A.	Fa. E. Merck
[^{-32}P]-ATP (spez. Aktivität*: ca. 3000 Ci/mmol; Konz.*: 10 mCi/mL)	Fa. Amersham
* bezogen auf den Kalibrierungstag	

3.6.2 Geräte

Pipetten Typ: 0,5-10 μL , 10-100 μL , 50-250 μL und Multipette	Fa. Eppendorf
Vortex	Fa. Janke & Kunkel
pH-Meter	Fa. Knick
Handmonitor (Geiger-Müller-Zähler)	Fa. Berthold
Blockthermostat	Fa. Kleinfeld
Tischzentrifuge	Fa. Eppendorf

3.6.3 Herstellung der Lösungen

Kinase-Puffer pH 9,0

Gleiche Volumina der folgenden Lösungen A-D wurden gemischt, aliquotiert (100 μL) und eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 6 Monate bei ca. -20 C

Lösung A 800 mmol/L Bicin

z.B. 3,26 g Bicin in ca. 15 mL Aqua demin. gelöst, mit NaOH auf pH 9,0 eingestellt, mit Aqua demin. ad 25 mL aufgefüllt

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei ca. -20 C

Lösung B 400 mmol/L DTT

z.B. 61,7 mg DTT ad 1,0 mL Aqua demin.

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei -20 C

Lösung C 40 mmol/L Spermidin

z.B. 5,81 mg Spermidin ad 1,0 mL Aqua demin.

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei -20 C

Lösung D 400 mmol/L $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

z.B. 406,6 mg Magnesiumchlorid ad 5 mL Aqua demin.

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei -20 C

Apyrase

Stammlösung: Die Apyrase mit 100 U/mL wurde in Aqua demin. gelöst und in 50 μL Portionen eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 3 Jahre bei -20 C

Verdünnung: Die Stammlösung wurde mit Aqua demin. 1:10 verdünnt (z.B. 50 μL der Stammlösung + 450 μL Aqua demin.) und in 50 μL Portionen eingefroren.

Haltbarkeit: ca. 1 Jahr bei -20 C

Pro Adduktmarkierungsansatz werden 4 μL (40 mU) Apyrase verwendet.

3.6.4 Arbeiten mit [^{-32}P]-ATP

Das [^{-32}P]-ATP wurde als Triethylammoniumsalz in 100 μL wässriger Lösung mit der spezifischen Aktivität von $111 \times 10^6 \text{ MBq/mmol}$ (3000 Ci/mmol) und der Konzentration von 370 MBq/mL (10mCi/mL) von der Fa. Amersham (Art. Nr. PB 10168) bezogen.

Physikalische Kenndaten von Phosphor 32:

^{32}P ist ein β -Strahler mit einer Halbwertszeit von 14,3 Tagen. Die mittlere Energie liegt bei 1,709 MeV. In der Luft beträgt die maximale Reichweite dieses Radioisotops ca. 790 cm und in Wasser ca. 0,8 cm. Zur Detektion kann ein Geiger-Müller-Zähler verwendet werden.

Beim Arbeiten mit ^{32}P wurden die Bestimmungen der Strahlenschutzverordnung beachtet. Insbesondere wurden folgende Maßnahmen getroffen:

- Bearbeitung der Proben in einem speziellen Kontrollbereich

- Abschirmung durch Plexiglas (Dicke 2cm)

- Tragen von Schutzhandschuhen, Schutzbrille, Kittel, Schuhen und Filmdosimeter

- ständige Kontaminationskontrolle von Geräten, Pipetten und Händen mit dem Geiger-Müller-Zähler

- spezielle Entsorgung des radioaktiven Abfalls

3.6.5 Markierung der Nukleotide mit [^{32}P]-ATP

Hierbei wird in einer enzymatischen Reaktion, durch die T4-Polynukleotidkinase (PNK), das ^{32}P -Phosphat aus dem [^{32}P]-ATP auf die Addukt-Desoxyribonukleosid-3'-monophosphate übertragen, welche dadurch in (5'- ^{32}P)-Desoxyribonukleosid-3', 5'-diphosphate überführt werden.

Die Proben, die analysiert wurden, waren hydrolysierte DNA-Proben nach der Adduktanreicherung. Die bis zur Markierung bei ca. -70 C eingefrorenen Proben (je 8 μL) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und jeweils mit 8 μL Markierungsansatz vorsichtig versetzt, gemischt und zentrifugiert. Anschließend inkubierten sie 45 min bei 37°C in einem Blockthermostaten. Das folgende Beispiel zeigt die Herstellung des Markierungsansatzes für eine Probe, der für weitere Proben entsprechend vervielfacht wurde.

Kinase-Puffer pH 9,0	2,5 μL
-ATP	2,78 μL
PNK 4 U	X* μL
bidest. Wasser	Y μL (einstellen auf 8 μL)
Endvolumen:	8,0 μL (27,8 μCi am Kalibrierungstag)

*Die Aktivität der PNK variierte je nach Charge. Um eine Aktivität von 4 U pro Probe zu erhalten, mußte aus jeder PNK-Charge ein anderes Volumen entnommen werden. Z.B. wurden bei einer PNK-Aktivität von 9,6 U/ μL in der Stammlösung X=0,42 μL entnommen.

Nach der Beendigung der Inkubationszeit wurden zu jeder Probe 4 μL (40 mU) Apyrase zugegeben, um das überschüssige [^{32}P]-ATP zu hydrolysieren. Die nun 20 μL -Lösung wurde >15 sec gevortext, ca. 5 sec auf höchster Stufe zentrifugiert und für 30 min bei 37°C in einem Blockthermostaten inkubiert. Dieser Markierungsreaktionsansatz wurde zur Adduktchromatographie vorsichtig auf eine PEI-Cellulose Platte pipettiert (siehe 3.7.5 Dünnschichtchromatographie der Addukte).

3.7 Chromatographie der Addukte

3.7.1 Chemikalien

Ameisensäure (MG 46,0) (1L = 1,22 kg) z.A.	Fa. E. Merck
Ammoniumsulfat (MG 132,1) z.A.	Fa. Riedel-de-Haen
Harnstoff (MG 60,1) z.A.	Fa. E. Merck
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (MG 203,3) z.A.	Fa. E. Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (MG 138,0) z.A.	Fa. E. Merck
Natriumhydroxid-Lösung z.A.	Fa. E. Merck
Lithiumhydroxid z.A.	Fa. E. Merck
Tris (MG 121,1) z.A.	Fa. E. Merck

3.7.2 Geräte

PEI-Cellulose-Platten	Fa. Macherey & Nagel; 20 x 20 cm
Filterpapier	Fa. Whatmann; Typ 1
Chromatographieglaskammer	Fa. Desaga, Heidelberg
Plexiglaskammern	Fa. Schering
Druckluft-Schneidemaschine	Fa. Schering
Frischhaltefolie	Fa. Melitta
pH-Meter	Fa. Knick
Handmonitor (Geiger-Müller-Zähler)	Fa. Berthold
Szintillationszähler	Fa. Wallac
BAS 2000-System	Fa. Fuji Photo Film Co, LTD
Imaging-Plates	Fa. Fuji Photo Film Co, LTD
Magazin	Fa. Fuji Photo Film Co, LTD
Auswertungsprogramm (TINA)	Fa. Raytest

3.7.3 Herstellung der Puffer

Chromatographie-Puffer:

Die Chromatographie-Puffer wurden mit Aqua demin. angesetzt.

Haltbarkeit: ca. 3 Jahre bei RT

D1-Puffer

z.B. 138 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (1 mol/L) ad 1000 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Natriumhydroxid-Lösung auf pH 6,0 eingestellt.

D3-Puffer-Konz.

z.B. 510 g Harnstoff (8,5 mol/L)

151,6 mL Ameisensäure (4,0 mol/L) ad 1000 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von Lithiumhydroxid auf pH 3,4 eingestellt.

D4-Puffer-Konz.

z.B. 84 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (0,61 mol/L)

510 g Harnstoff (8,5 mol/L)

73,8 g Tris (0,61 mol/L) ad 1000 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Natriumhydroxid-Lösung auf pH 8,2 eingestellt.

D5-Puffer

z.B. 234,6 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (1,7 mol/L)
ad 1000 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Natriumhydroxid-Lösung auf pH 6,0 eingestellt.

AP-Puffer

z.B. 37 g Ammoniumsulfat (0,28 mol/L)

6,9 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (0,05 mol/L)
ad 1000 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Natriumhydroxid-Lösung auf pH 6,8 eingestellt.

3.7.4 Vorbereitung der Polyethylenimin (PEI)-Cellulose-Platten

3.7.4.1 Reinigung der PEI-Cellulose-Platten

Die Platten der Größe 20 x 20 cm von Fa. Macherey & Nagel wurden über Nacht mit Aqua demin. vorgewaschen. Dazu wurden in die Chromatographieglaskammer ca. 150 mL Aqua demin. gefüllt und die bis zu 5 Platten eingestellt, so dass sie ca. 1 cm im Wasser standen. Der Deckel wurde an der Schmalseite der Kammer um ca. 1 cm geöffnet, damit das Wasser von der Plattenoberfläche verdunsten und von unten nachlaufen konnte. Meistens konnte festgestellt werden, dass ein gelber Rand mit der Wasserfront nach oben lief. Am nächsten Tag wurden die Platten vorsichtig der Kammer entnommen und zum Trocknen an der Luft auf eine saubere

Oberfläche (beschichtete Seite der Platte nach oben) gelegt, wobei man nur den oberen Rand (eventuell gelb gefärbt) anfassen durfte. Es muss darauf geachtet werden, dass die PEI-Cellulose-Schicht im nassen Zustand sehr empfindlich ist und leicht beschädigt werden kann. Während die Platten an der Luft liegen, sollte direktes Einfallen von Sonnenstrahlen auf die Platten vermieden werden.

3.7.4.2 Markierung und Beschriftung der Platten

Die Platten konnten vor dem Waschen oder nach dem Waschen und Trocknen mit einem sehr weichen Bleistift und einem Lineal beschriftet werden (Abbildung 13).

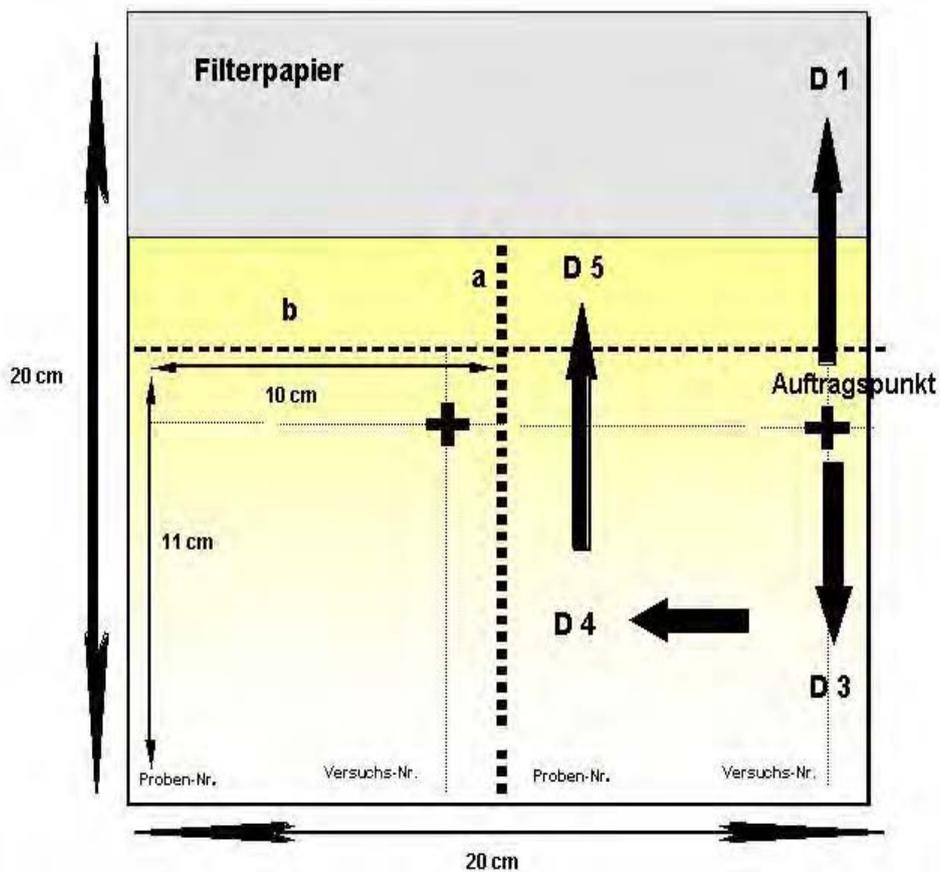


Abbildung 13: Laufrichtungen und Beschriftungen der Chromatographieplatten

Um die Platten nicht zu beschädigen, mussten die Linien und die Beschriftung mit äußerster Sorgfalt aufgebracht werden. Jede Platte konnte zur Analyse von zwei Proben verwendet werden. Aus diesem Grund wurde die Linie a in der Mitte der Platte (10 cm) senkrecht zur gelben Fließmittelfront aufgezeichnet. Danach wurde von der Startseite genau 11 cm abgemessen und die Linie b parallel zur Fließmittelfront durchgezogen. Der erste Auftragspunkt wurde auf dem rechten Teil

der Platte als ein Kreuz gekennzeichnet, dessen Zentrum 2 cm von der Linie b und 1,5 cm vom rechten Rand der Platte entfernt lag. Der zweite Auftragspunkt auf dem linken Teil der Platte wurde ebenfalls als Kreuz gekennzeichnet, dessen Zentrum 2 cm von der Linie b und 1,5 cm von der Linie a entfernt lag.

Das Kreuz (der Auftragspunkt) wurde als Linie wie in Abbildung 13, verlängert. Zur Vereinfachung der Beschriftung der Platten verwendete man eine Musterschablone. Entlang der oberen Lauffrontseite der Platte (gelber Rand) wurde ein der Längsseite nach gefaltetes Stück Filterpapier der Größe 10 x 20 cm von Fa. Whatmann Typ 1 mit Heftklammern so befestigt, dass die Platte am oberen Rand vorne und hinten mit dem Filterpapier bedeckt war.

Alle Platten wurden so beschriftet, dass folgende Informationen entnommen werden konnten:

- a) welche Probe auf der Platte aufgetragen werden sollte und
- b) zu welcher Prüfnummer die zu analysierende Probe gehörte.

3.7.4.3 Lagerung der PEI-Cellulose-Platten

Die Platten mussten nicht sofort nach der Reinigung verwendet werden. Sie konnten (beschriftet oder unbeschriftet) gut verpackt bei ca. -20°C aufbewahrt werden. Sie wurden dann vor dem Experiment beschriftet (wenn nicht vorher geschehen) und mit dem Filterpapier versehen.

3.7.5 Dünnschichtchromatographie der Addukte

Das Prinzip der Dünnschichtchromatographie mit PEI-Cellulose-Platten (PEI: Polyethylenimin) beruht darauf, dass die PEI-Cellulose ein relativ stark basischer Anionenaustauscher ist. PEI-Cellulose findet vor allem bei der Trennung von Nukleotiden Anwendung.

Die Chromatographie der Addukte erfolgte in Anlehnung an Gupta (1982) mit Modifikationen von Kerdar (1996).

Mit einer Eppendorf-Pipette wurde das gesamte Ansatzvolumen der Markierungsreaktion (20 µL) aufgenommen und langsam, aber kontinuierlich auf den Auftragspunkt einer PEI-Cellulose-Platte (Abbildung 13) pipettiert (die leeren Eppendorfgefäße sollten nicht verworfen werden!). Dabei ist darauf zu achten, dass die Pipettenspitze die Plattenschicht nicht beschädigte. Auf jeder Platte konnten zwei Proben aufgetragen werden.

Nachdem das aufgetragene Reaktionsgemisch von dem Plattenmaterial absorbiert worden war und keine Gefahr des Verlaufens für die aufgetragene Probe bestand, wurde die Platte, in die Chromatographiekammer (Abbildung 14) plaziert.

In der Kammer befand sich bereits das D1-Laufmittel. Die Platten sollten ca. 1 bis 1,5 cm im D1-Laufmittel stehen. Sie wurden über Nacht (meist 18-20 h) im D1-Laufmittel entwickelt. Während dieses Schrittes blieben die Addukte aufgrund ihrer Lipophilie am oder in der Nähe des Auftragspunktes liegen.

Andere Stoffe wie überschüssiges -ATP, unmodifizierte Nukleotide und Enzyme entwickelten sich in D1-Richtung in das Filterpapier und wurden dadurch entfernt.

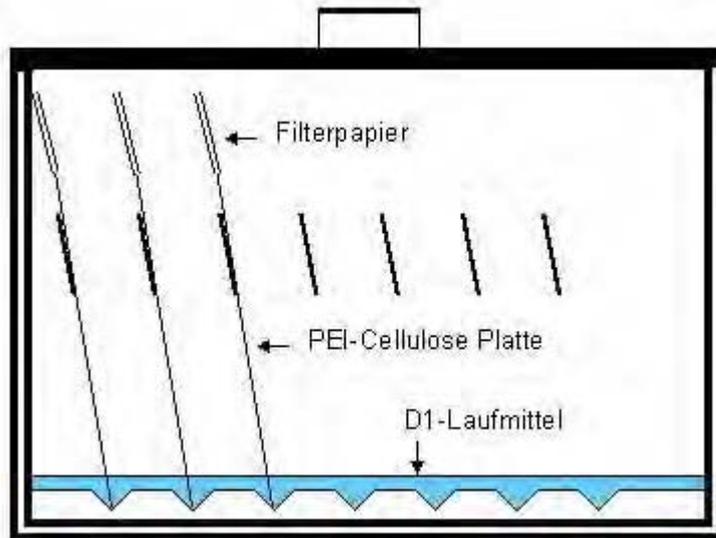


Abbildung 14: Chromatographie-Plexiglaskammer

Am Morgen danach wurden die Platten vorsichtig aus der Kammer genommen und in die vorbereitete Druckluft-Schneidemaschine gelegt, um die Platten entlang der Linie b durchzuschneiden. Dabei fiel der Filterpapier-Teil der PEI-Platte in den Abfallbehälter. Der Teil mit den Addukten wurde entlang der Linie a nochmals durchgeschnitten und man erhielt zwei Chromatogramme. Diese wurden in einem Ständer plaziert und in einem Behälter unter fließendem, demineralisiertem Wasser ca. 5 min gewaschen. Anschließend wurden die Chromatogramme aus dem Wasser genommen und getrocknet. Zum Trocknen wurden Haartrockner verwendet, wobei keine warme Luft erzeugt werden durfte, die zur Beschädigung der Chromatogramme hätte führen können.

Nachdem die Chromatogramme vollständig getrocknet waren, wurden sie in D3-Richtung entwickelt (Abbildung 13). Um ein einheitliches Fließverhalten des Laufmittels zu erreichen, wurden die Chromatogramme zunächst in D3-Richtung bis zum Auftragspunkt mit Aqua demin. vorentwickelt und dann, in nassem Zustand, in die Chromatographiekammer mit D3-Laufmittel eingestellt (D3-Richtung). Wenn das D3-Laufmittel den oberen Chromatogrammrand erreicht hatte (meist 1h 15min), wurden die Chromatogramme wie oben beschrieben gewässert und getrocknet.

Die trockenen Chromatogramme wurden bis zum Auftragspunkt, diesmal in D4-Richtung (Abbildung 13), mit Wasser vorentwickelt und anschließend mit D4-Laufmittel in D4-Richtung entwickelt.

Wenn das D4-Laufmittel den oberen Rand des Chromatogramms erreicht hatte (meist 1h 20min), wurden die Chromatogramme wie oben beschrieben gewässert und getrocknet.

Die Chromatogramme wurden am oberen Rand (auf der Seite der ehemaligen Linie b, Abbildung 13) mit Filterpapier (6,0 x 10 cm) beheftet und mit D5-Laufmittel ca. 2 - 20 h zur Reinigung des Chromatogramms in Richtung D5 entwickelt (Abbildung 3). Anschließend wurden die Chromatogramme an den aufgezeichneten Linien (---) durchgeschnitten (Plattengröße 8,5 x 9 cm, Abbildung 15). Die Chromatogramme wurden wie oben beschrieben gewässert, getrocknet und in Folie eingepackt.

Die Entwicklung aller Chromatogramme (in D1, D3, D4 und D5) erfolgte bei Raumtemperatur.

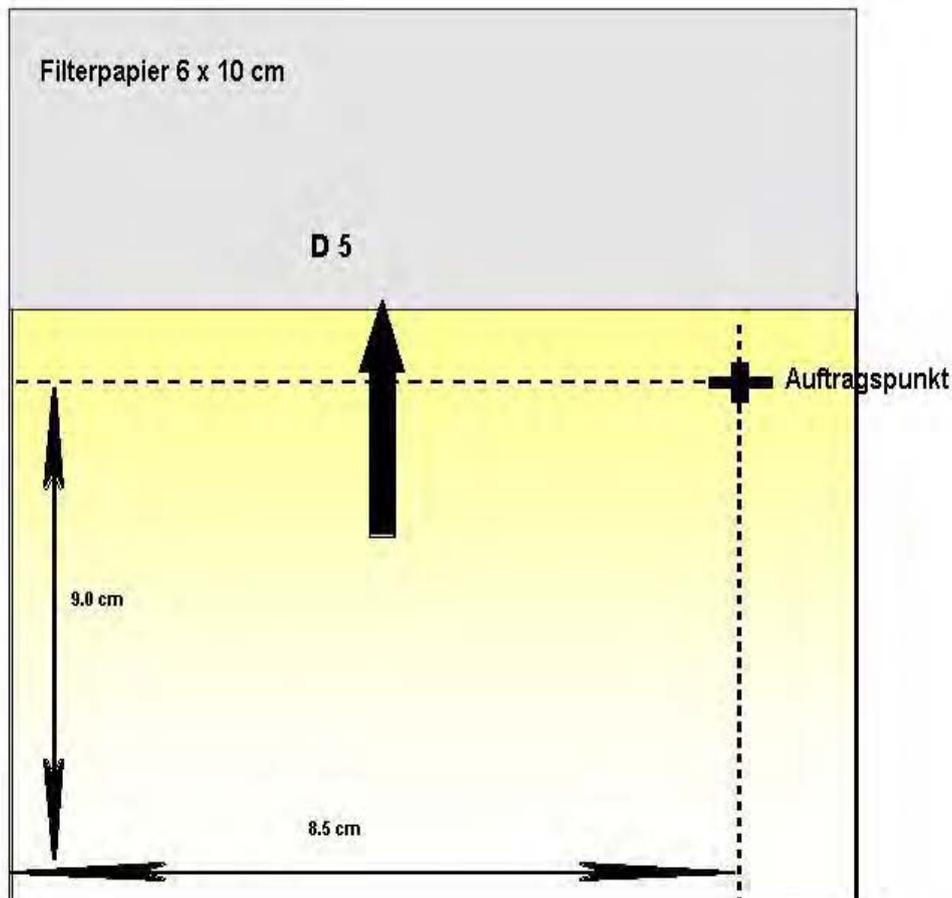


Abbildung 15: Chromatographieplatte nach dem Schneiden

3.7.6 Eindimensionale Dünnschichtchromatographie des Markierungsansatzes

Mit der ausreichenden Restradioaktivität des Markierungsansatzes, die im Eppendorfgefäß zurückblieb, konnte die Güte der Markierungsreaktion qualitativ überprüft werden. Dazu wurden 50 μL Aqua demin. in das "leere Eppendorfgefäß", in dem die Markierungsreaktion stattfand, pipettiert, ca. 1 min gevortext und bei der höchsten Stufe der Tischzentrifuge ca. 15 sec zentrifugiert. Aus dieser Verdünnung wurden 5 μL mit einer Pipette auf den Auftragspunkt einer PEI-Cellulose-Platte (Abbildung 16) aufgetragen und an der Luft getrocknet.

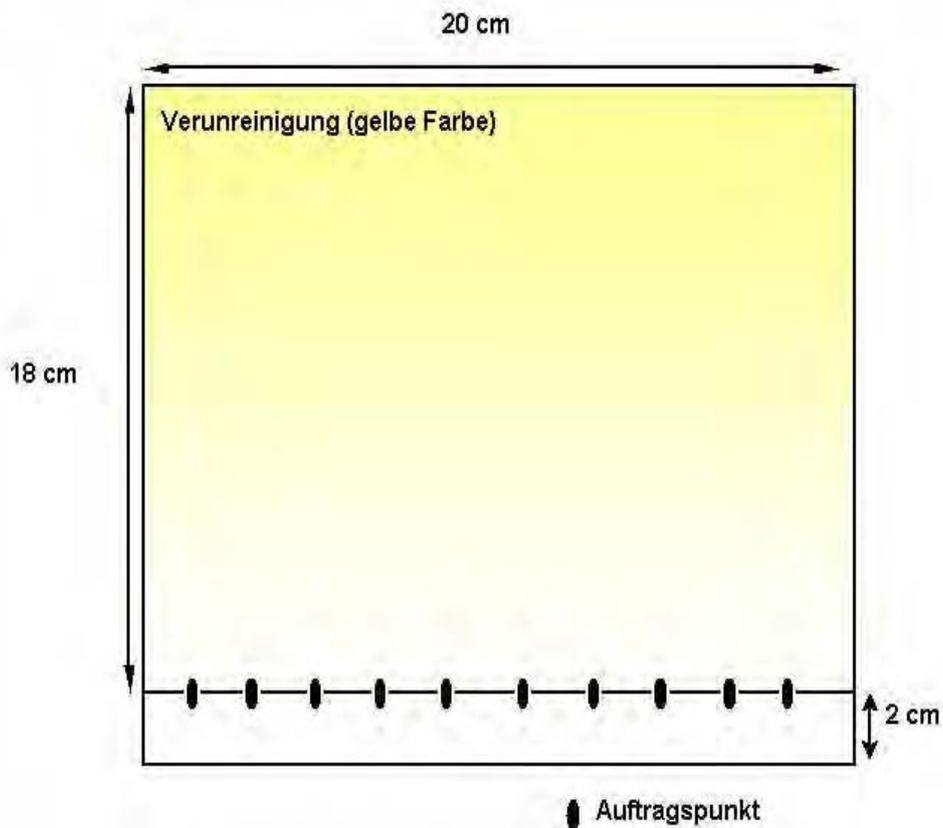


Abbildung 16: Chromatographieplatte für den AP - Lauf

Die Platte wurde in eine Kammer mit AP-Laufmittel gestellt, so dass die Platte ca. 1,0 cm im Laufmittel stand. Der Deckel der Kammer wurde gut verschlossen. Wenn das AP-Laufmittel den oberen Chromatogrammrand erreicht hatte (ca. 1h 30min) wurden die Chromatogramme an der Luft bzw. mit Haartrocknern getrocknet. Anschließend wurden die Chromatogramme in Folie eingepackt und zur Exposition mit der beschichteten Seite auf eine Imaging-Plate in eine Expositionskassette gelegt. Die Expositionsdauer für die AP-Chromatographie betrug 10 min bei RT.

Dieser Chromatographieschritt spielte für die spätere Auswertung der DNA-Addukte keine Rolle. Die Informationen, die man bei diesem Schritt gewinnen konnte, waren folgende:

- a) Ein Überschuß an γ -ATP während der Markierungsreaktion war vorhanden und der Markierungsansatz wurde dem DNA-Hydrolysat tatsächlich zugesetzt. Falls man aus Versehen keinen Markierungsansatz in den Adduktmarkierungsansatz pipettiert hatte, wurde die betroffene Probe nicht weiter bearbeitet und falls nach der Überprüfung mit dem Handmonitor festgestellt wurde, dass auf dem Chromatogramm der betroffenen Probe keine Radioaktivität vorhanden war, wurde das Chromatogramm verworfen.
- b) ebenfalls konnte man sich davon überzeugen, dass die Adduktanreicherung vollständig oder fast vollständig stattfand. Die Abbildung 17 zeigt zur Beurteilung der Markierungsqualität vier Beispiele.

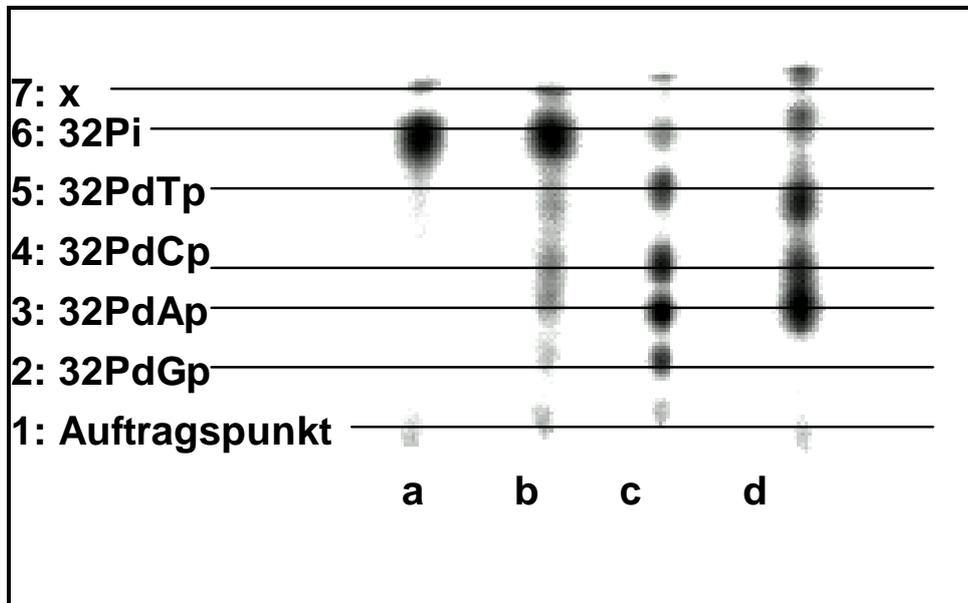


Abbildung 17: Bei den Spots handelt es sich (von unten nach oben gesehen) um eine Restaktivität (1), die in der Regel am Auftragungspunkt zurückblieb, um ^{32}P -dGp (^{32}P -markiertes Guanin-Nukleotid) und die entsprechenden Nukleotide von Adenin, Cytosin, Thymin (2-5). Der $^{32}\text{P}_i$ -Spot (6) ist das freie Phosphat und x (7) steht für unbekannte Abbauprodukte des γ -ATP.

Die Probe a zeigt eine Probe mit guter Adduktanreicherung. In diesem Fall sind zwischen dem Auftragspunkt und dem Phosphat keine Normalspots detektierbar. Der $^{32}\text{P}_i$ -Spot deutet auf einen γ -ATP-Überschuß hin. Die Probe b zeigt schwache Normalspots, jedoch spricht der $^{32}\text{P}_i$ -Spot ebenfalls für einen Überschuß an γ -ATP während der Markierungsreaktion. Dagegen sind die Fälle von Probe c und d nicht eindeutig und eine Beurteilung der Güte der Markierungsreaktion schwierig. In diesen Fällen ist die Adduktanreicherung nicht vollständig und das γ -ATP wurde auch zur Markierung der unmodifizierten Nukleotide verbraucht. In diesem Falle wurden die Proben reanalysiert.

3.7.7 Quantifizierung der Addukte

3.7.7.1 Radioluminographie der Chromatogramme

Die Radioluminographie (Abbildung 18) beruht darauf, dass die beim radioaktiven Zerfall entstehenden Energiequanten von speziellen Kristallen (BaFBr:Eu^{2+}) in Speicherplatten (Imaging Plate, IP) während der Exposition eingefangen und gespeichert werden. Dabei werden Elektronen angeregt und in einen metastabilen höheren Energiezustand versetzt. Durch eine anschließende Bestrahlung der metastabilen Energiezustände mittels einer definierten Laserenergie fallen die Elektronen wieder in ihren Grundzustand zurück. Dabei wird die zwischengespeicherte Energie in Form von Photonen frei und kann mit Hilfe eines Photomultiplier detektiert werden. Durch Belichtung der Speicherplatten mit sichtbarem Licht werden diese gelöscht und können danach wiederverwendet werden.

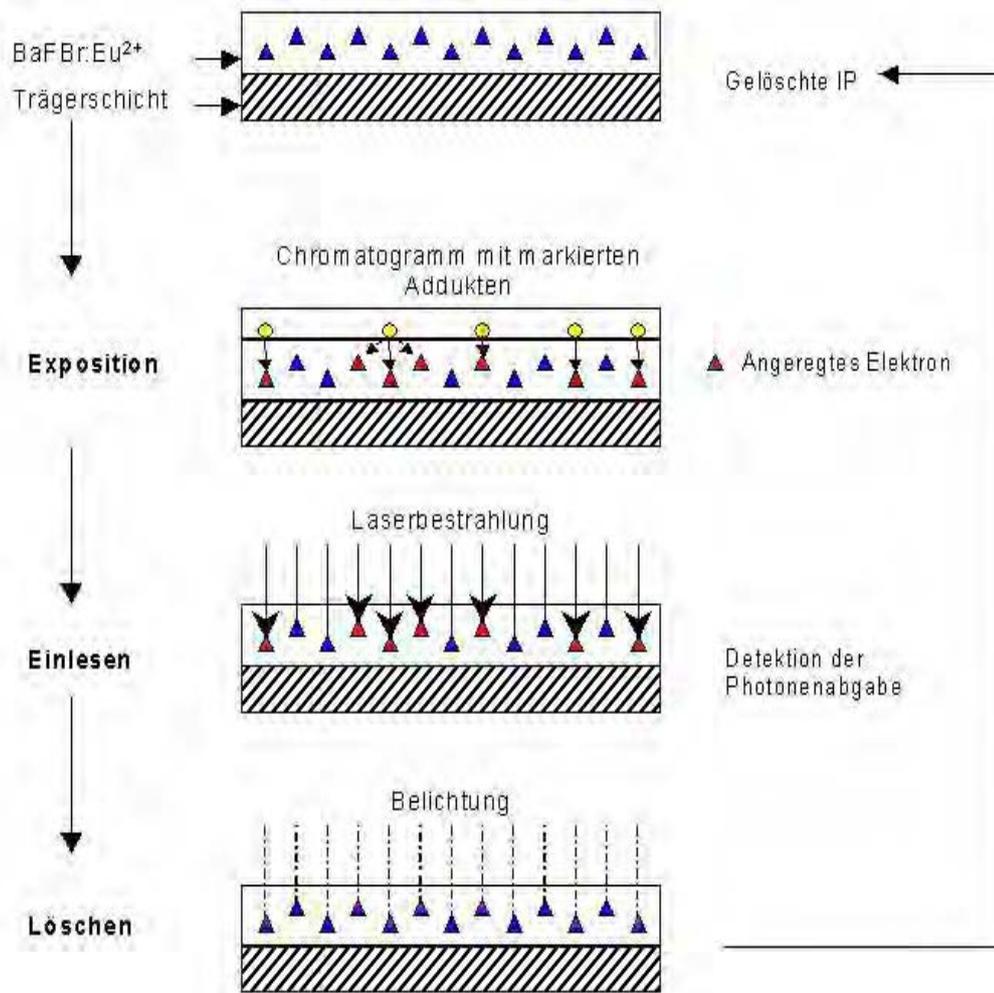


Abbildung 18: Prinzip der Radioluminographie

Zur Radioluminographie im BAS 2000-System wurden die in Folie verpackten Chromatogramme mit der PEI-Cellulose-Schicht nach oben in eine spezielle Expositions-kassette eingelegt. Wenn man an einem Tag mehrere solcher Magazine für die Radioluminographie verwendet hatte, sollte darauf geachtet werden, dass sie nicht aufeinander gelegt wurden, da Durchstrahlungsgefahr bestand und dieser Effekt das Radioluminographiebild hätte verfälschen können.

Die Expositions-dauer für die Addukt-Chromatographie betrug bei RT ca. 15 min für die positive Kontrolle und bis zu 17 h für die Addukte.

3.7.7.2 Visualisierung der DNA-Addukte

Die Imaging-Plates wurden im BAS 2000-System abgelesen und die radioaktiv bestrahlten Stellen wurden in Form von Schwärzungen auf dem Bildschirm des Rechners sichtbar. Zum Ablesen einer Imaging-Plate wurden sie so in das Magazin platziert, dass die schwarze Seite der Imaging-Plate aus der Öffnung des Magazins zu sehen war. Hier musste darauf geachtet werden, dass die Raumbelichtung die

durch Radioaktivität angeregten Stellen zu löschen vermag. Daher sollten die Imaging-Plates zügig ins Magazin eingesetzt werden. Nach dem Einlesen der Imaging-Plates durch den Image Reader wurden am Rechner mit geeigneter Software (TINA) die Spots sichtbar gemacht und ausgewertet.

3.7.7.3 Auswertung der DNA-Adduktspots

Zur Auswertung der visualisierten Spots benötigte man zunächst eine Eichgerade, die folgendermaßen hergestellt wurde:

Am Tag der Markierung wurden aus dem Rest des Markierungsansatzes 4 μL in ein neues Eppendorf-Röhrchen pipettiert, in das zuvor 196 μL Wasser vorgelegt wurde (F-50-Verdünnung). Aus dieser Verdünnung wurden weitere Verdünnungen zur Erstellung einer Eichgeraden hergestellt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Herstellung von Verdünnungen zur Erstellung einer Eichgeraden

Verdünnungen	Zusammensetzung	Faktor
F-50-Verdünnung	4 μL des Markierungsansatzes + 196 μL Wasser	(1:50)
F-1.500-Verdünnung (A)	5 μL der F-50-Verdünnung + 145 μL Wasser	(1:30)
F-15.000-Verdünnung (B)	10 μL der F-1.500-Verdünnung + 90 μL Wasser	(1:10)
F-150.000-Verdünnung (C)	10 μL der F-15.000-Verdünnung + 90 μL Wasser	(1:10)

Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 12 μL in 10 mL Atomlight pipettiert und die Radioaktivität 5 min im Liquid Scintillation Counter gemessen. Mit Hilfe der gemessenen Werte wurde die Angabe des Herstellers korrigiert (Angabe des Herstellers: 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ am Kalibrierungstag).

Aus den Verdünnungen A, B und C wurden jeweils 2, 4 und 6 μL auf einen PEI-Cellulose-Streifen aufgetragen, an der Luft getrocknet und in Folie eingepackt. Je nach Bedarf konnten mehrere PEI-Cellulose-Streifen unterschiedlicher Größe verwendet werden. Diese Streifen mit den Eichpunkten wurden bis zur Radioluminographie der Chromatogramme aufbewahrt.

Nach der Beendigung der Chromatographie (D5-Lauf) wurden die Chromatogramme in Folie verpackt und mit der Schicht nach oben in eine Expositionskassette plaziert. Zusätzlich zu diesen Chromatogrammen wurde ein je nach untersuchter Substanz geeigneter Eichstreifen in das Magazin gelegt. Auf die im Magazin plazierten Chromatogramme und Eichstreifen wurde eine Imaging-Plate mit der weißen Seite nach unten möglichst schnell aufgelegt. Das Magazin wird gut verschlossen.

Nach Beendigung der Expositionszeit wurden die PEI-Cellulose-Platten aus dem Magazin genommen und in einer Plexiglaskassette (im Kontrollbereich) aufbewahrt. Die Imaging-Plate wurde zum Ablesen in das Gerät BAS 2000 eingeführt und die visualisierten Chromatogramme mit geeigneter Software (z.B. TINA) bearbeitet. Die Spots auf den Radioluminogrammen wurden ausgewählt und eingegrenzt (Regionen wurden gesetzt). Der Rechner lieferte mit Hilfe des Auswertungsprogramms dann innerhalb dieser Eingrenzung einen Wert (PSL-Wert), der zur Höhe der Radioaktivität an dieser Stelle direkt proportional war. Die gleichen Regionen wurden auf die Radioluminogramme der Negativkontrollen kopiert und es wurden ebenfalls die PSL-Werte ermittelt. Aus den PSL-Werten für die Verdünnungen A, B und C (Eichgerade) mit bekannter Aktivität wurde der mittlere PSL-Wert pro nCi berechnet. Dieser Mittelwert diente dann der Ermittlung der Radioaktivität der Spots auf den Chromatogrammen. Bei einer Expositionsdauer von mehreren Stunden (bis 17 h) waren die F-1.500-Verdünnungen (A) überexponiert. Überexponierte Spots (erkennbar an der roten Farbe auf dem Bildschirm des Rechners) durften nicht quantifiziert werden. In solchen Fällen wurden diese Werte von der Erstellung von Eichgeraden ausgenommen. Der Regionenreport wurde in ein Excel-Programm exportiert, um dort die DNA-Adduktraten zu berechnen. Aus den PSL-Werten der Adduktspots wurde unter Zuhilfenahme der jeweiligen Eichgeraden die Aktivität der Addukte ermittelt.

Der RAL-Wert (Relative Adduct Labeling) zeigte an, wie viele Addukte pro 10^9 Nukleotide vorlagen. Um die Adduktraten zu errechnen, wurde folgende Gleichung verwendet.

$$RAL = \frac{\text{Aktivität der Addukte [nCi]}}{\text{spezifische Aktivität [nCi / pmol]} \times \text{DNA Menge [pmol]}}$$

Mit Hilfe des RAL-Wertes wurde die Adduktmenge pro μg DNA nach folgender Formel berechnet ($1 \mu\text{g}$ DNA entspricht $3,2 \times 10^6$ fmol Nukleotid, ausgehend von einem Molekulargewicht von 310 g/mol):

$$\text{d.h.} \quad \text{fmol Addukt} / 1 \mu\text{g DNA} = RAL \times 3,2 \times 10^6$$

Die Halbwertszeit für [^{-32}P]-ATP beträgt 14,3 Tage. Aus diesem Grund wurde die spezifische Aktivität, die vom Hersteller angegeben wurde, für den Tag der Autoradiographie umgerechnet und korrigiert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Restaktivität für ^{32}P -ATP

	Tage*	% Restaktivität	% Restaktivität**
Mo	-10	60,9	62,4
So	-9	63,9	65,5
Sa	-8	67,0	68,7
Fr	-7	70,4	72,1
Do	-6	73,9	75,7
Mi	-5	77,5	79,5
Di	-4	81,4	83,4
Mo	-3	85,4	87,6
So	-2	89,7	91,9
Sa	-1	94,1	97,1
Fr***	0	100,0	102,9
Do	1	105,9	108,1
Mi	2	110,3	112,5
Di	3	114,6	116,6
Mo	4	118,6	

* negative Zahlen bedeuten Tage nach dem Kalibrierungstag

** nach der Übernacht-Exposition

*** Tag der Kalibrierung

3.8 Testsubstanzen

3.8.1 Auswahlkriterien

Die zu untersuchenden Substanzen wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

Molekulargewicht von 100 bis 600 g/mol

Ca. 30 Jahre auf dem deutschen Markt erhältlich

Existenz eines Handelsnamen

Aus dieser erhaltenen Anzahl von insgesamt 734 Substanzen wurden

32 Substanzen mittels DEREK und dem IARC Monographs programme (Marselos, 1991) eingegrenzt, die nach der IARC Klassifizierung in die folgenden Kategorien hinsichtlich Kanzerogenität eingeteilt wurden.

3.8.2 Einteilung

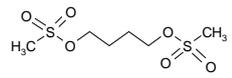
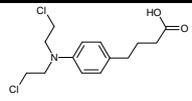
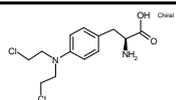
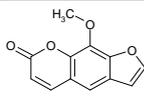
Die Einteilung der ausgewählten Substanzen erfolgte in 3 verschiedenen Gruppen, welche wie folgt aufgegliedert wurden:

3.8.2.1 IARC (International Agency for Research on Cancer)

Kategorie 1 bezeichnet Substanzen, die als kanzerogen für den Menschen angesehen werden.

Untersuchte Substanzen:

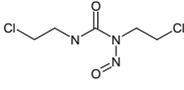
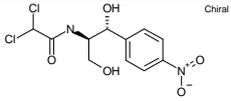
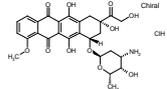
Tabelle 7: Substanzen aus der IARC-Kategorie 1

SUBSTANZNAME	MOLSTRUKTUR	MOLMASSE	CAS-NUMMER	BEZUGSQUELLE
Azathioprin		277.2673	446-86-6	SIGMA
Busulfan		246.3026	55-98-1	SIGMA
Chlorambucil		304.2151	305-03-3	FLUKA
Cyclophosphamid		261.0875	50-18-0	ASTA-MEDICA
Melphalan		305.2032	148-82-3	FLUKA
Methoxsalen		216.1912	298-81-7	SIGMA
Thiotepa		189.2218	52-24-4	ACROS

Kategorie 2A bezeichnet Substanzen, die als wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen eingeteilt werden.

Untersuchte Substanzen:

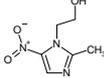
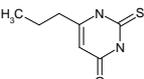
Tabelle 8: Substanzen aus der IARC-Kategorie 2A

SUBSTANZNAME	MOLSTRUKTUR	MOLMASSE	CAS-NUMMER	BEZUGSQUELLE
Carmustin		214,0511	154-93-8	SIGMA
Chloramphenicol		323,1308	56-75-7	SIGMA
Doxorubicin Hydrochlorid		579,983	25316-40-9	FLUKA

Kategorie 2B bezeichnet Substanzen, die möglicherweise kanzerogen für den Menschen sind.

Untersuchte Substanzen:

Tabelle 9: Substanzen aus der IARC-Kategorie 2B

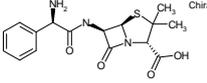
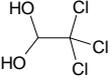
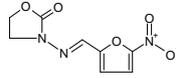
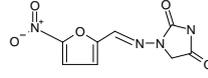
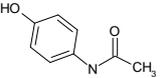
SUBSTANZNAME	MOLSTRUKTUR	MOLMASSE	CAS-NUMMER	BEZUGSQUELLE
Metronidazol		171.1551	443-48-1	SIGMA
Propylthiouracil		170.235	51-52-5	SIGMA

Aufgrund der Möglichkeit ein krebserzeugendes Potential für den Menschen zu besitzen wurden diese IARC-Kategorien 1, 2A und 2B in einer Gruppe zusammengefasst.

Die zweite Gruppe wurde aus Substanzen zusammengesetzt, die sich in **IARC Kategorie 3**, für den Menschen als kanzerogen nicht klassifizierbar, befinden.

Untersuchte Substanzen:

Tabelle 10: Substanzen aus der IARC-Kategorie 3

SUBSTANZNAME	MOLSTRUKTUR	MOLMASSE	CAS-NUMMER	BEZUGSQUELLE
Ampicillin		349,4091	69-53-4	SIGMA
Chloralhydrat		165,4027	302-17-0	SIGMA
Furazolidon		225,1593	67-45-8	SIGMA
Isoniazid		137,1413	54-85-3	SIGMA
Nitrofurantoin		238,1584	67-20-9	SIGMA
Paracetamol		151,1641	103-90-2	SIGMA
Theophyllin		180,1662	58-55-9	SIGMA

3.8.2.2 DEREK

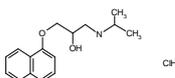
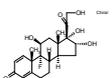
(Deductive Estimation of Risk from Existing Toxicological Knowledge)

Diese dritte Gruppe wurde aus Substanzen zusammengestellt, die keine IARC-Eingruppierung aufweisen, die aber in dem *in silico* Vorhersage-Programm einen strukturellen Hinweis auf Genotoxizität erkennen lassen, oder aufgrund von Kanzerogenitätsverdacht in der epidemiologischen Literatur (van den Eeden, 1995) aufgefallen sind.

Untersuchte Substanzen:

Tabelle 11: Substanzen mit Hinweis auf Genotoxizität oder mit Verdacht auf Kanzerogenität

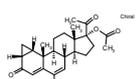
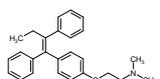
SUBSTANZNAME	MOLSTRUKTUR	MOLMASSE	CAS-NUMMER	BEZUGSQUELLE
Acetazolamid		222.2484	59-66-5	SIGMA
Chlorpromazin Hydrochlorid		355.331	69-09-0	SIGMA
Clindamycin Hydrochlorid		461.4476	21462-39-5	SIGMA
Fluocinolonacetimid		452.491	67-73-2	SIGMA
Gentamicinsulfat		Gemisch	105-41-0	SIGMA
Hydrocortison		362.463	50-23-7	SIGMA
Kaliumcanrenoat		396.5651	2181-04-6	SIGMA
Medryson		344.4918	2668-66-8	SIGMA
Phenylephrin Hydrochlorid		203.6676	61-76-7	SIGMA
Procainamid Hydrochlorid		271.7898	614-39-1	SIGMA
Promethazin Hydrochlorid		320.8859	58-33-3	SIGMA

SUBSTANZNAME	MOLSTRUKTUR	MOLMASSE	CAS-NUMMER	BEZUGSQUELLE
Propranolol Hydrochlorid		295.8078	318-98-9	SIGMA
Triamcinolon		394.4362	124-94-7	SIGMA

3.9 Kontrollsubstanzen

Zur Überprüfung der Methodik (Reaktionsfähigkeit der Leber- bzw. Nierenschnitte unter der Inkubation und der verwendeten Anreicherungsmethode) wurden folgende Positivkontrollen mitgeführt:

Tabelle 12: Kontrollsubstanzen

SUBSTANZNAME	MOLSTRUKTUR	MOLMASSE	CAS-NUMMER	BEZUGSQUELLE
Cyproteronacetat		416.9421	427-51-0	SCHERING
Tamoxifen		371.5211	10540-29-1	SIGMA

Als Negativkontrolle diente nur das Lösungsmittel der Substanz, entweder DMSO oder Krebs-Henseleit-Puffer (KH).

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung des DNA-Adduktlevels von ausgewählten Pharmazeutika

Die zu testenden Substanzen wurden nach drei Kriterien ausgewählt: Einerseits sollten sie ein Molekulargewicht von 100 bis 600 g/mol aufweisen, um zu gewährleisten, dass sie mit Hilfe des ^{32}P -Postlabeling-Verfahrens detektieren zu können, andererseits sollten die Testsubstanzen mehr als ca. 30 Jahre auf dem deutschen Markt vertrieben worden sein. Diese Zeitspanne wurde als ausreichend angesehen, um die Latenzzeit der Krebsentstehung zu überbrücken und um aus epidemiologischen Studien (z.B. van den Eeden; 1995) Krebsinzidenzen zu finden, die mit Medikamentenkonsum über längere Zeit in Verbindung gebracht werden können. Außerdem sollten die gebräuchlichen Pharmazeutika über einen Handelsnamen verfügen, um zu gewährleisten, dass sie direkt kommerziell beziehbar waren.

Die Gruppeneinteilung der 32 ausgewählten Testsubstanzen geschah in Anlehnung an die IARC-Bewertung (Tabelle 13, 21, 25, 27) und aufgrund von in DEREK gefundenen Molekülstrukturen, die auf Mutagenität oder Kanzerogenität hinwiesen bzw. von denen in der Literatur von van den Eeden ein entsprechender Verdacht berichtet wurde (Tabelle 35).

Zur Durchführung der Versuche wurden Leberschnitte von weiblichen Ratten, sowie in einigen Fällen von weiblichen und männlichen Affen, mit Hilfe eines Krumdieck-Tissue-Slicer hergestellt. Die Testsubstanzen wurden in zwei bis fünf unterschiedlichen Konzentrationen untersucht und in höchstens 1% DMSO oder bei ausreichender Löslichkeit nur in KH-Puffer gelöst. Die Schnitte inkubierten mit den gelösten Substanzen in 12-well Platten über 6 Stunden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre in Gegenwart von 5% CO_2 . Am Ende der Inkubation wurden die Leberschnitte mit 0,9% NaCl gewaschen, gewogen und bis zur DNA-Isolierung bei ca. -75°C gelagert.

Für die DNA-Adduktanalyse mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren wurden Aliquots der DNA enzymatisch zu 3'-Phospho-5'-nukleotiden hydrolysiert, die addukttragenden Nukleotide mit Nuklease P1 angereichert oder mit Butanol extrahiert und der Extrakt mit einem Überschuss an ^{32}P -ATP enzymatisch zu ^{32}P -5'-Dinukleotiden umgesetzt. Das Gemisch wurde auf Polyethylenimin-Cellulose-Dünnschichtplatten zweidimensional aufgetrennt und die Position der DNA-Addukte radioluminographisch lokalisiert. Zur Quantifizierung wurde die Radioaktivität der Adduktspots in Relation zur Eichgeraden gesetzt. Die Angabe der Addukthäufigkeit erfolgte als „Addukte pro 10^9 Nukleotide“ (engl. RAL= Relative adduct labeling).

4.1.1 Ergebnisse der Gruppe 1

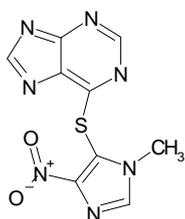
Substanzen, die von der IARC als kanzerogen, wahrscheinlich kanzerogen oder möglicherweise kanzerogen für den Menschen bewertet wurden (IARC 1, 2A und 2B).

4.1.1.1 IARC 1

Tabelle 13: IARC 1 Substanzen

Substanz:	CAS-Nummer:	Mol. Gewicht: [g/mol]	gelöst in:	untersuchte Konzentrationen: [µg/mL]
Azathioprin	446-86-6	277	DMSO	0.5; 5; 50; 500
Busulfan	55-98-1	246	DMSO	10; 100
Chlorambucil	305-03-3	304	DMSO	10; 100
Cyclophosphamid	50-18-0	261	KH	10; 100
Melphalan	148-82-3	305	DMSO	5; 50
Methoxsalen	298-81-7	216	DMSO	5; 10; 50; 100
Thiotepa	52-24-4	189	DMSO	10; 100

Azathioprin:



Handelsnamen: u.a. Azafalk, Imurek

Azathioprin, ein Imidazol-Derivat von 6-Mercaptopurin, ist ein Immunsuppressivum und wird bei Organtransplantationen zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen eingesetzt. Des Weiteren werden folgende Autoimmunkrankheiten mit Azathioprin behandelt: Autoimmune, chronisch-aktive Hepatitis; schwere Formen der chronischen Polyarthrit; Lupus erythematodes visceralis; autoimmune hämolytische Anämie; Dermatomyositis; idiopathische thrombozytopenische Purpura; Panarteriitis nodosa und mittelgradiger bis schwerer Morbus Chron bzw. Colitis ulcerosa.

Der Wirkmechanismus ist noch nicht völlig aufgeklärt (Fachinformation, Juni 1999), mögliche Mechanismen sind:

- Freisetzung von 6-Mercaptopurin, welches als Purin-Antimetabolit wirkt;
- Die Blockade von SH-Gruppen durch Alkylierung;
- Die Hemmung mehrerer Stufen der Nukleinsäuresynthese und dadurch Hemmung der Proliferation von immunkompetenter Zellen;
- Schädigung der DNS durch Einbau der Purin-Thioanaloga.

Die therapeutische Wirksamkeit tritt oft erst nach einigen Wochen oder Monaten ein, was eine längere Einnahme von Azathioprin voraussetzt.

In der IARC Bewertung (Supplement 7; 1987; p. 119), in der RTECS (Registry of toxic effects of chemical substances) Datenbank und bei Gold (1997) sind folgende Daten zur Genotoxizität und Mutagenität von Azathioprin beschrieben (Tabelle 14):

Tabelle 14: Azathioprin

AMES:	CA:	Dominanter Lethaltest:	Mikrokern:	SCE:	UDS:
positiv Gold, 1997 RTECS, 2000	positiv IARC Suppl. 7, 1987	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000	positiv / negativ RTECS, 2000 / IARC Suppl. 7, 1987	positiv RTECS, 2000

Die DNA-Adduktanalyse ergab bei den untersuchten Konzentrationen von 0,5, 5, 50 und 500 µg/mL ein negatives Ergebnis (Abbildung 19). Die Chromatogramme der Positivkontrollen werden in Abbildung 20 dargestellt.

Auf den Chromatogrammen der behandelten Rattenleberschnitten sowie der Negativkontrolle (DMSO) ist ein sehr starker Hintergrund zu erkennen.

Diese Schwärzungen sind durch das hohe Alter der Ratten zu erklären, die hier schon 9 Monate alt waren. Diese Pseudo-Addukte (I-COMPOUND oder indigenous compounds) sind dadurch zu erklären, dass mit zunehmendem Alter auch endogene Stoffwechselprodukte und Hormone, aber auch Nahrungsbestandteile und Umwelteinflüsse zu Addukten führen können, die aber mit der zu testenden Substanz nicht in Zusammenhang stehen (Gupta, 1996; Nath, 1996; Randerath, 1986; 1994).

Bei der Kaliumbestimmung fiel eine Cytotoxizität bei den Konzentrationen von 50 und 500 µg/mL auf.

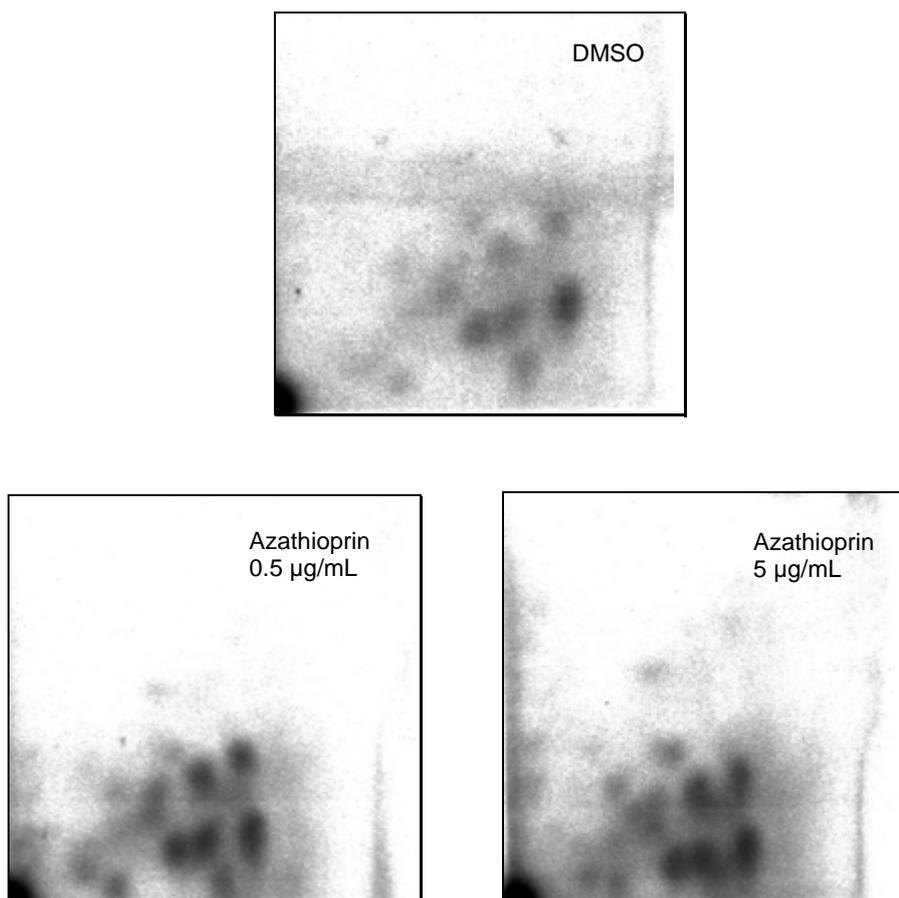


Abbildung 19: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Azathioprin 0,5 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Azathioprin 5 µg/mL (Rattenleber, w.).

Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. Der Auftragspunkt der Proben befindet sich in der unteren linken Ecke.

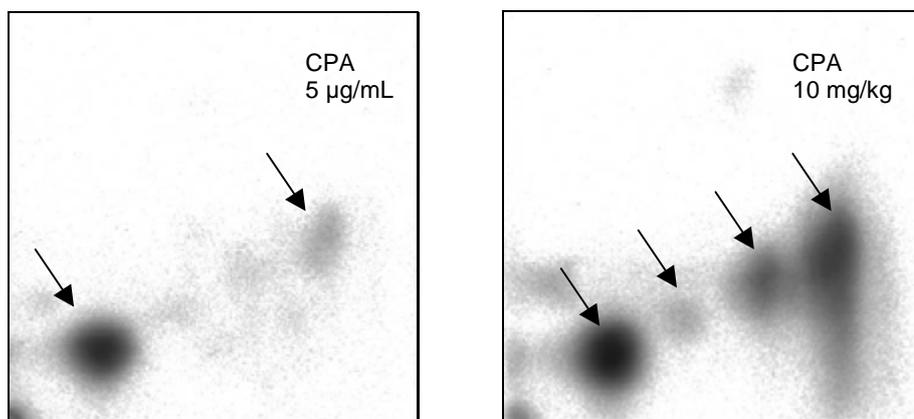
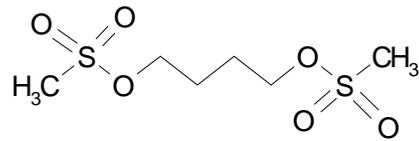


Abbildung 20: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Azathioprin über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe zu erkennen.

Busulfan:

Handelsname: Myleran

Busulfan ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der bifunktionellen Alkylantien und wird bei der chronischen myeloischen Leukämie zur palliativen Behandlung in der chronischen Phase der Erkrankung eingesetzt. Des weiteren bewirkt Busulfan bei der Polycythaemia vera eine verlängerte Remission.

Der Wirkungsmechanismus (Fachinfo, September 1997) der Substanz beruht auf einer Interaktion mit der zellulären DNA. Hierbei werden durch kovalente Bindung von Alkylgruppen die DNA-Einzelstränge alkyliert. Außerdem erfolgt eine Alkylierung der RNA. Seine zytostatische Wirkung entfaltet Busulfan besonders intensiv auf proliferierendes Knochenmark unter Einschluss der Knochenmarksstammzellen. Auch die Alkylierung von Strukturproteinen und Enzymen spielt eine Rolle für den Grad und das Spektrum der zytostatischen Wirkung.

Aus der IARC-Bewertung (Supplement 7; 1987; p. 137), RTECS Daten und aus der Fachinfo ergaben sich für Busulfan folgende Ergebnisse zur Genotoxizität und Mutagenität (Tabelle 15):

Tabelle 15: Busulfan

AMES:	CA:	Dominanter Letaltest:	Mikrokern:	Maus Lymphom:	SCE:	UDS:
positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2001-3	positiv IARC Suppl. 7, 1987	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2001-3	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2001-3	positiv Fachinfo, Sept. 1997	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2001-3	positiv RTECS, 2001-3

Bei der DNA-Adduktbestimmung waren bei den untersuchten Konzentrationen von 10 und 100 µg/mL keine Addukte detektierbar (Abbildung 21). In der Abbildung 22 werden die Chromatogramme der Positivkontrollen dargestellt.

Die vorgefundenen Spots auf den Chromatogrammen der behandelten Leberschnitte stellen sich auch in dem Chromatogramm der Negativkontrolle dar und werden aus diesem Grund als I-Compounds beurteilt, die nicht mit der Substanzbehandlung im Zusammenhang stehen.

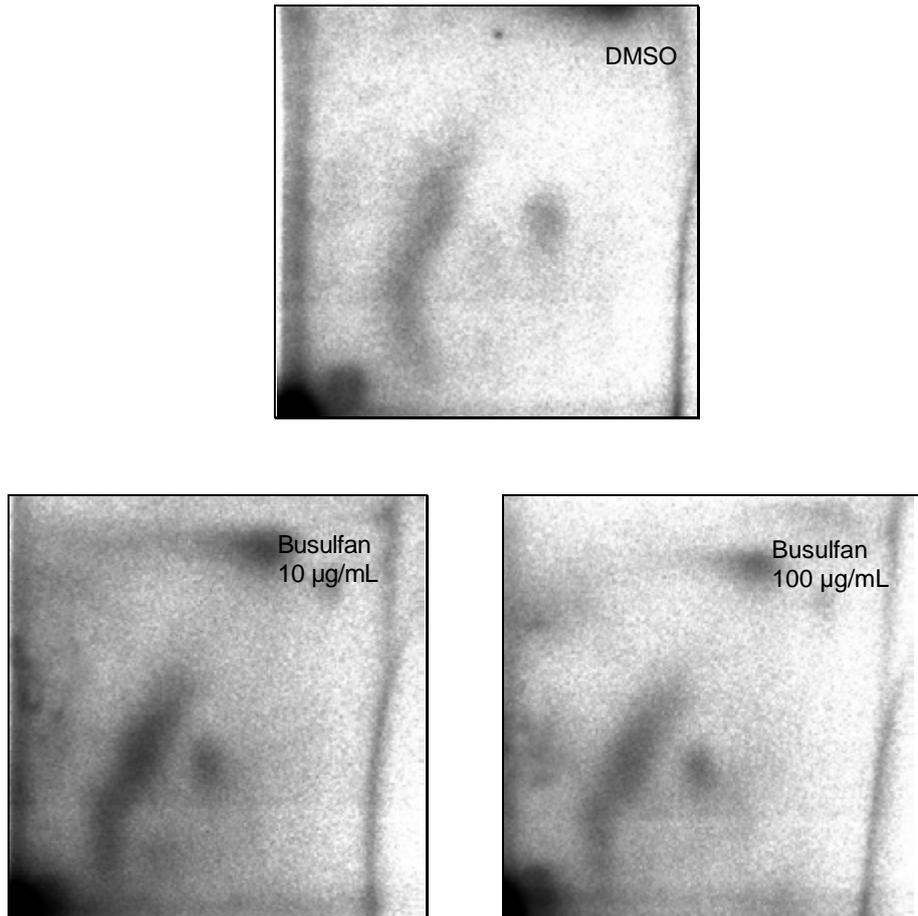


Abbildung 21: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Busulfan 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Busulfan 100 µg/mL (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte inkubierten über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Mit Hilfe der Nuklease P1-Methode wurden die Addukte angereichert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug bei Raumtemperatur 16 Stunden. Der Auftragspunkt der Proben ist in der unteren linken Ecke zu erkennen.

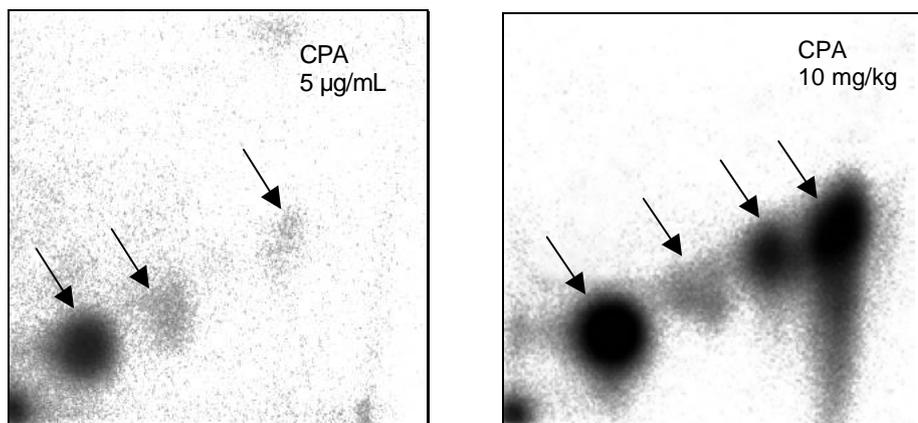
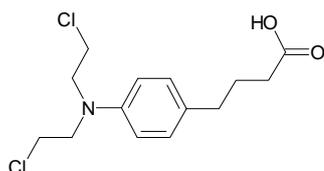


Abbildung 22: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Busulfan über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe zu erkennen.

Chlorambucil:

Handelsname: Leukeran

Chlorambucil, ein aromatisches Stickstofflost-Derivat, gehört in die Gruppe der bifunktionalen alkylierenden Substanzen. Als Zytostatikum findet es Anwendung in der Behandlung von chronisch lymphatischen Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphomen, Morbus Hodgkin, Waldenström Makroglobulinämien, fortgeschrittenen Adenokarzinomen der Ovarien und Mamma-Karzinomen.

Chlorambucil weist im Molekül zwei alkylierende Zentren auf. Durch eine chemische Verknüpfung innerhalb des DNA-Stranges oder zwischen den einzelnen DNA-Strängen werden die Replikation der DNA und damit die Zellproliferation und die Bildung neuer maligner Zellen gehemmt (Fachinfo, August 1999).

Die Ergebnisse zur Genotoxizität und Mutagenität von Chlorambucil wurden aus den RTECS Daten, aus Gold (1997), aus Sanderson (1996) und aus der IARC Bewertung (Supplement 7; 1987; p. 144) entnommen und in Tabelle 16 zusammengestellt:

Tabelle 16: Chlorambucil

AMES:	CA:	Dominanter Letaltest:	Mikrokern:	SCE:	UDS:
positiv Gold, 1997 IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv Sanderson, 1996 IARC Suppl. 7, 1987	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv Sanderson, 1996 IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv Sanderson, 1996 IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv RTECS, 2000-2

In der Literatur werden DNA-Addukte beschrieben, die mit einer HPLC Analyse aus L1210 Zellen, die mit [¹⁴C]Chlorambucil inkubiert wurden, detektiert wurden (Bank, 1992).

Jedoch wurden in dem hier eingesetzten ³²P-Postlabeling-Verfahren bei Konzentrationen von 10 und 100 µg/mL in Ratten- und Affenleberschnitten keine Addukte gefunden. Die Ergebnisse der Chromatographie der behandelten Rattenleberschnitte werden in der Abbildung 23 wiedergegeben. Die zugehörigen Positivkontrollen werden in Abbildung 24 verdeutlicht.

Auf den Chromatogrammen der behandelten Rattenleberschnitte sind Spots zu finden, die auch in dem Chromatogramm der Negativkontrolle auftreten. Sie werden aus diesem Grund als I-Compounds beurteilt, die nicht mit der Substanzbehandlung im Zusammenhang stehen.

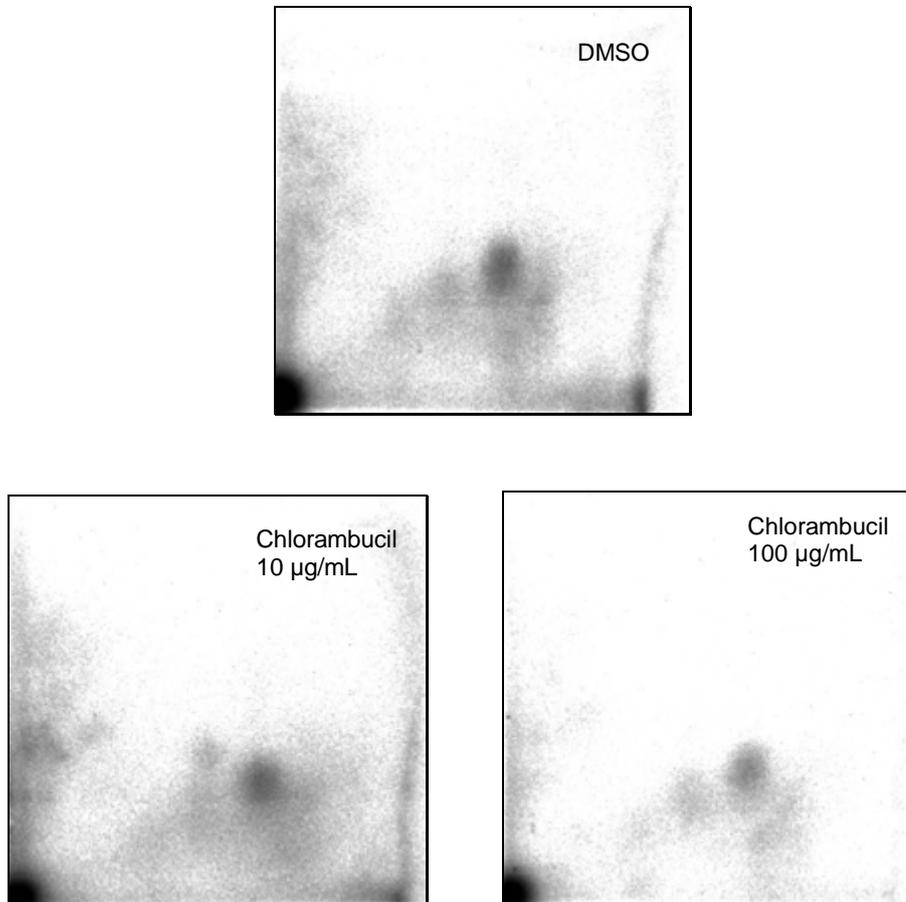


Abbildung 23: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Chlorambucil 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Chlorambucil 100 µg/mL (Rattenleber, w.)
Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. Der Auftragspunkt der Proben befindet sich in der unteren linken Ecke.

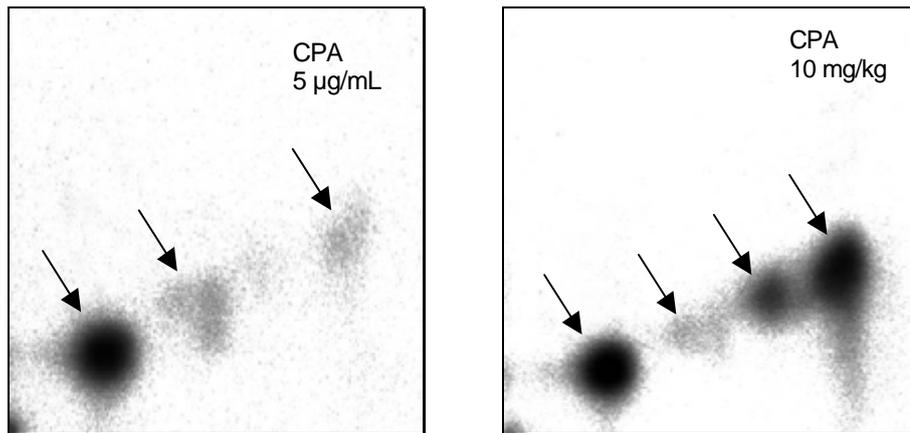


Abbildung 24: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Chlorambucil über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe zu erkennen.

Die chromatographischen Ergebnisse der behandelten Affenleberschnitte (w.) werden in Abbildung 25 dargestellt. Die Ergebnisse der Positivkontrollen werden in der Abbildung 26 dokumentiert.

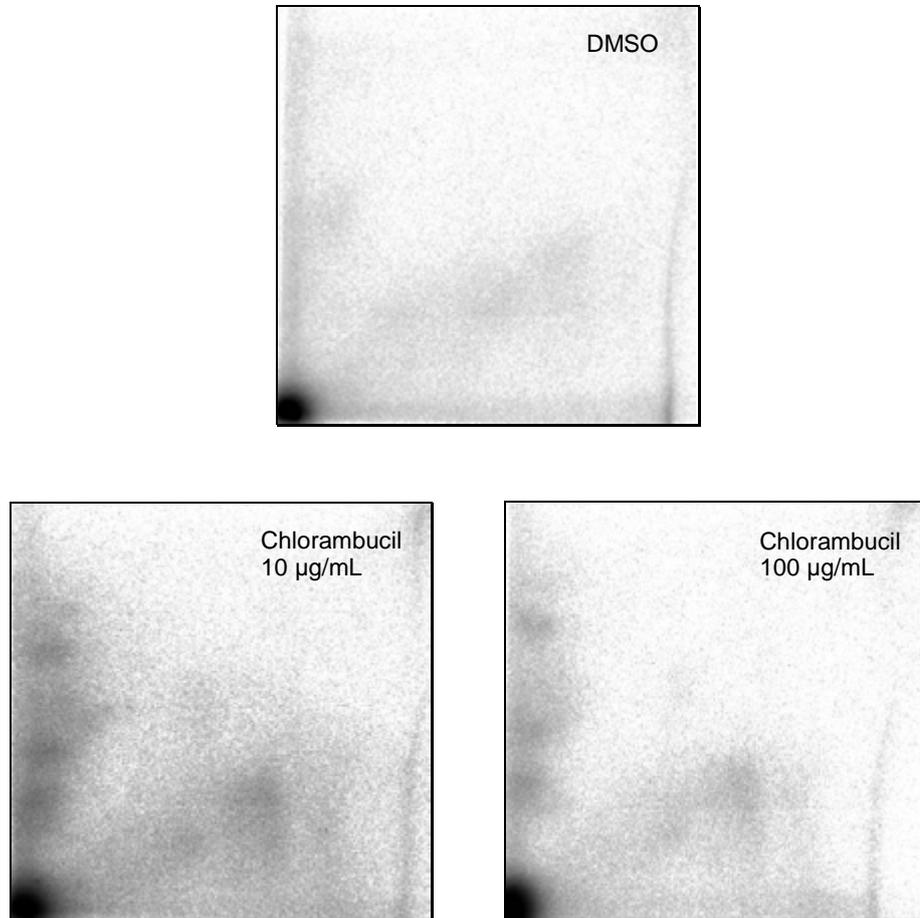


Abbildung 25: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Affenleber, w.), von Chlorambucil 10 µg/mL (Affenleber, w.) und von Chlorambucil 100 µg/mL (Affenleber, w.)

Die Leberschnitte inkubierten über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Adduktanreicherung erfolgte mit Hilfe der Nuklease P1-Methode. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug bei Raumtemperatur 16 Stunden. Der Auftragspunkt der Proben ist in der unteren linken Ecke zu erkennen.

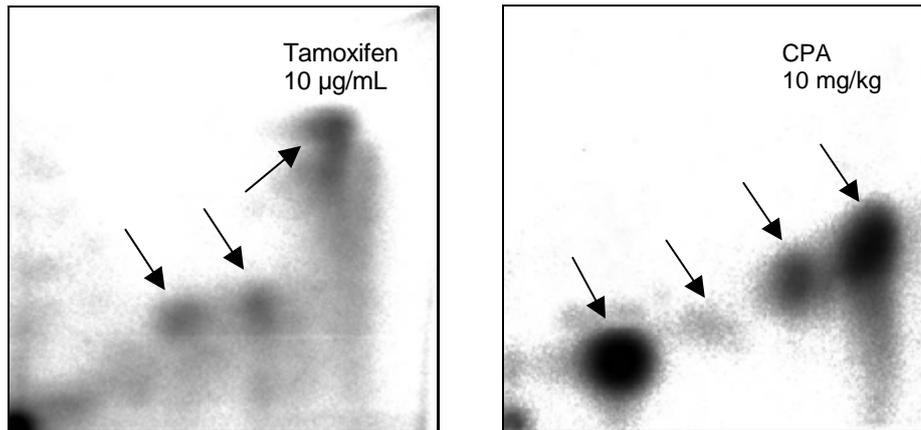
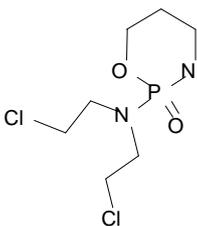


Abbildung 26: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Chlorambucil die Affenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten betrug bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben ist in der unteren linken Ecke sichtbar.

Cyclophosphamid:

Handelsnamen: u.a. Cyclostin , Endoxan

Cyclophosphamid, ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylantien, kommt bei der Behandlung von Morbus Hodgkin (Lymphogranulomatose), Non-Hodgkin-Sarkomen (Lymphosarkome), akuten und chronischen lymphatischen und myeloischen Leukämien und verschiedenen Karzinomen zum Einsatz.

Cyclophosphamid ist ein synthetisches Derivat des Mechloretamins und wird *in vivo* durch mikrosomale Leberenzyme (Cytochrom P 450) zu 4-Hydroxy-cyclophosphamid und Aldophosphamid metabolisiert. Diese Tautomere unterliegen einer zum Teil spontanen, zum Teil enzymatischen Konversion in inaktive und aktive Metaboliten (insbesondere Phosphoramidlost und Acrolein). Die zytostatische Wirkung beruht im wesentlichen auf einer Alkylierung der DNA, welche zu einer Blockade des Zellzyklus in der späten S- und frühen G-2-Phase führt. Acrolein hat keine antineoplastische Aktivität, ist aber für die urotoxischen Nebenwirkungen verantwortlich (Fachinfo, Oktober 2000).

Die Daten zur Genotoxizität und Mutagenität von Cyclophosphamid wurden aus der RTECS Datenbank, aus Kim (1999), aus Sanderson (1996) , aus Shelby (1995) und aus der IARC Bewertung (Supplement 7; 1987; p. 182) erhoben (Tabelle 17):

Tabelle 17: Cyclophosphamid

AMES:	CA:	Dominanter Letaltest:	Mikrokern:	SCE:	UDS:
positiv Gold, 1997 Kim, 1999 IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv Sanderson, 1996 Shelby, 1995 IARC Suppl. 7, 1987	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv Sanderson, 1996 Shelby, 1995 IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv Sanderson, 1996 IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2

Maccubin (1991) identifizierte ein Phosphorester Addukt mit 2'-deoxyguanosine 3'-monophosphat und DNA, jedoch wurde hier in dem *in vitro* Versuch Cyclophosphamid eingesetzt, welches zuvor metabolisch aktiviert wurde. Laut Kallama und Hemminki (1984) besitzen die mit einer HPLC-Methode identifizierten Addukte nur eine Halbwertszeit zwischen 1h und 3,1h bei 37°C und einem pH von 7,4.

Des Weiteren ist Cyclophosphamid in wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur nur wenige Stunden aktiv. Bei Temperaturen über 30°C hydrolysiert Cyclophosphamid und verliert Chloratome (Anderson, 1995).

Aus den in der Literatur beschriebenen Daten lässt sich schließen, dass sich die angewandte Adduktanalyse an Leberschnitten mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren nicht für Cyclophosphamid eignet.

Die Untersuchung im ^{32}P -Postlabeling-Verfahren ließ bei Konzentrationen von 10 und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ weder in Rattenleberschnitten (Abbildung 27) noch in Affenleberschnitten (Abbildung 29) Addukte erkennen. Die jeweiligen Positivkontrollen werden in der Abbildung 28 und in der Abbildung 30 dargestellt. Die in den Chromatogrammen der behandelten Leberschnitte feststellbaren Spots finden sich auch in der Negativkontrolle und werden daher als I-Compounds bewertet.

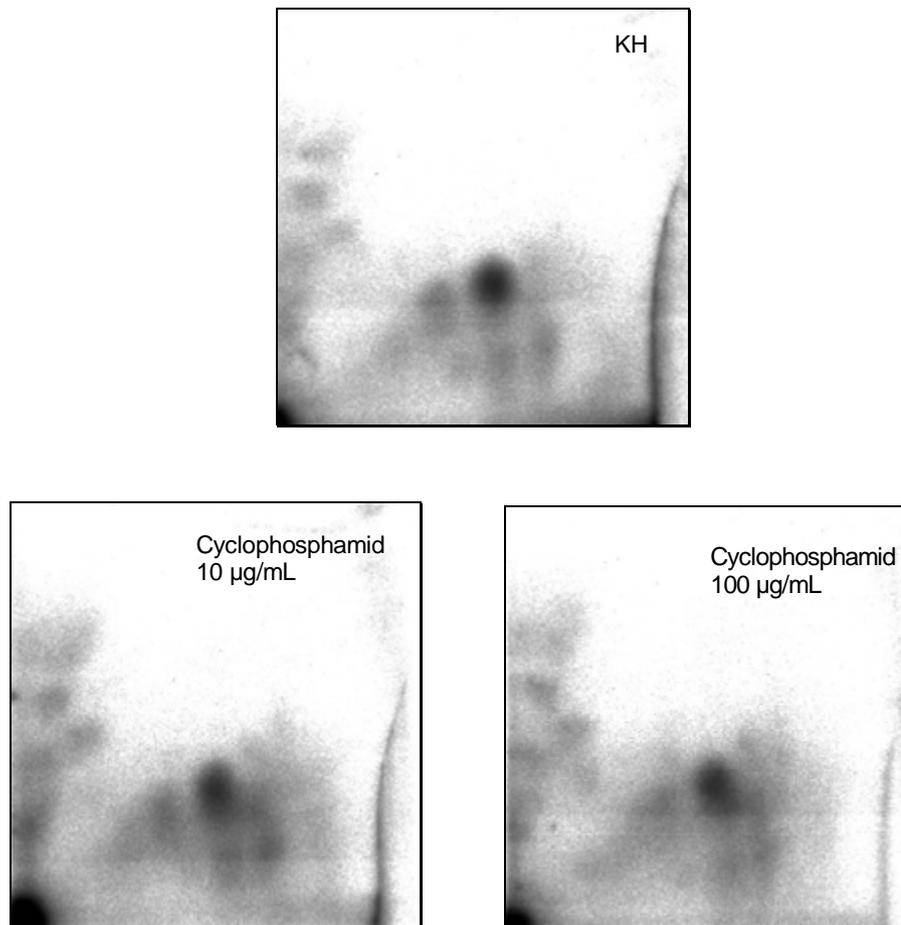


Abbildung 27: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH (Rattenleber, w.), von Cyclophosphamid 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Rattenleber, w.) und von Cyclophosphamid 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung erfolgte mit Hilfe der Nuklease P1-Methode. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Proben zu erkennen.

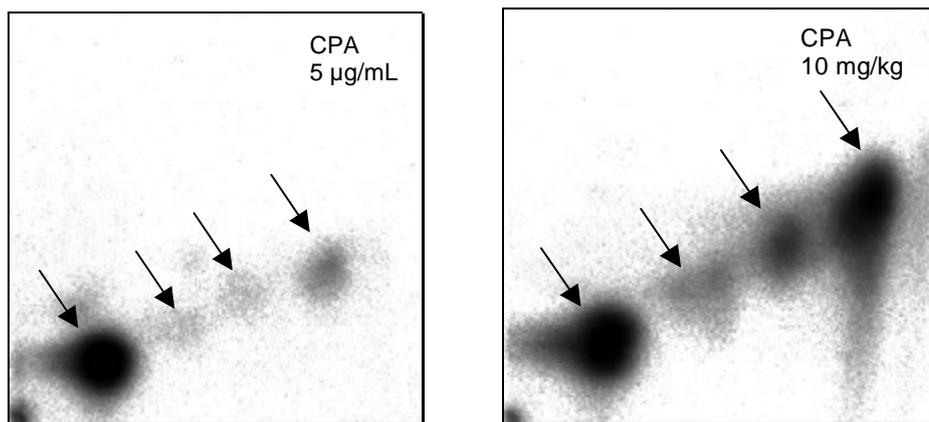


Abbildung 28: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Cyclophosphamid über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe erkennbar.

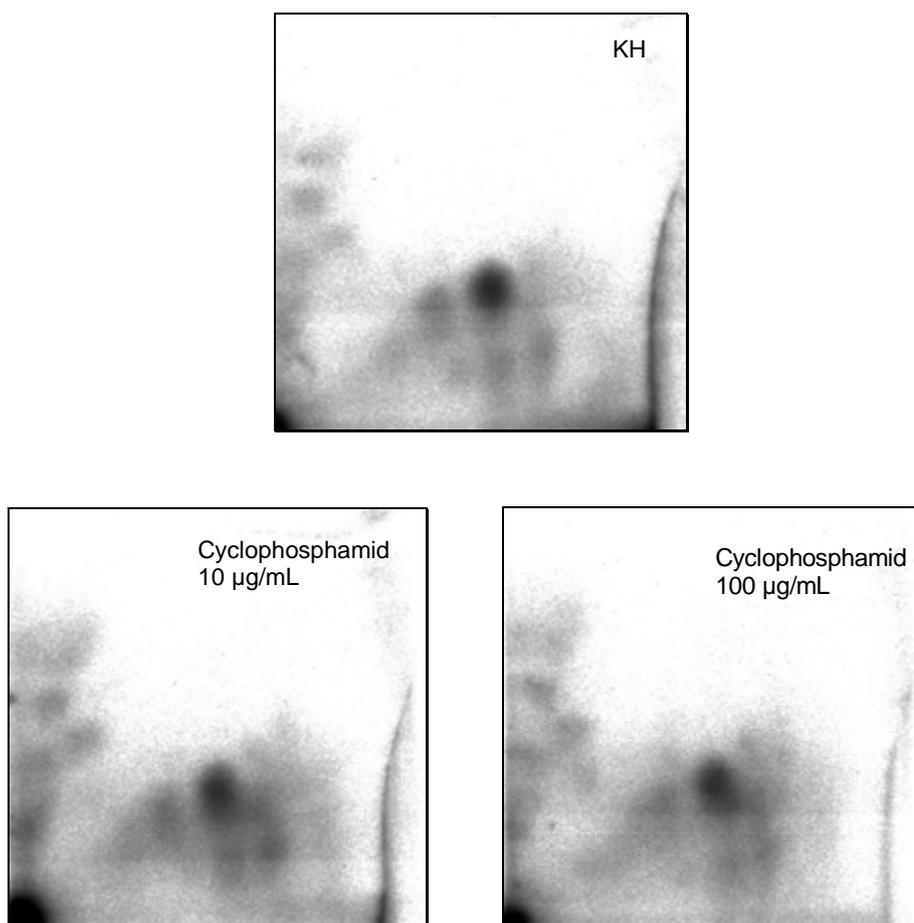


Abbildung 29: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH (Affenleber, w.), von Cyclophosphamid 10 µg/mL (Affenleber, w.) und von Cyclophosphamid 100 µg/mL (Affenleber, w.)

Die Leberschnitte inkubierten über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Adduktanreicherung erfolgte mit Hilfe der Nuklease P1-Methode. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug bei Raumtemperatur 16 Stunden. Der Auftragspunkt der Proben ist in der unteren linken Ecke zu erkennen.

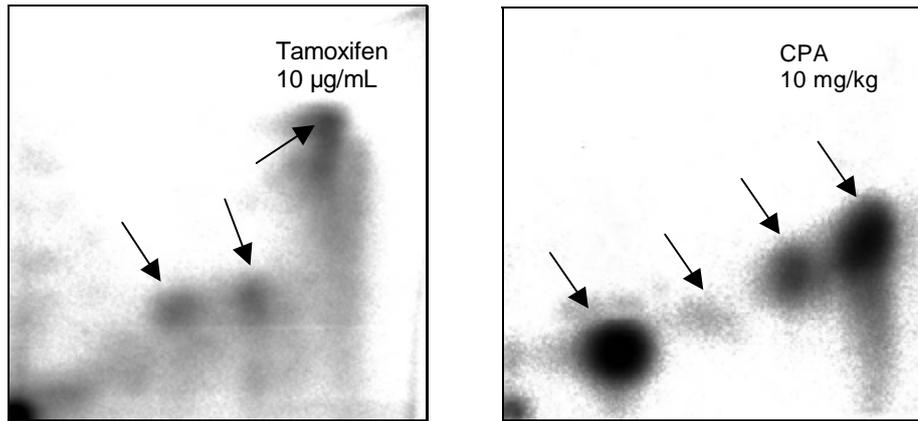
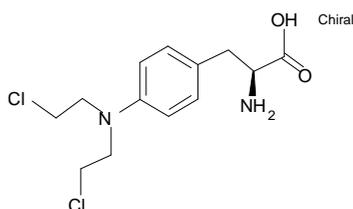


Abbildung 30: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Cyclophosphamid die Affenleberschnitte (w.) 6 Stunden lang bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten dauerte bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben ist in der unteren linken Ecke sichtbar.

Melphalan:

Handelsname: Alkeran

Melphalan, ein Stickstofflost-Derivat, ist als Zytostatikum indiziert bei multiplen Myelomen (Plasmozytomen), Ovarial- und Mammakarzinomen.

Melphalan kann als bifunktionelle, alkylierende Substanz über die Bildung von Carboniumzwischenstufen Guanosinbasen der DNA alkylieren und zwei DNA-Stränge miteinander verknüpfen. Die DNA-Replikation in der Zelle wird aufgrund dieses Wirkmechanismus verhindert (Fachinfo, Januar 1998).

In der Tabelle 18 sind die Ergebnisse zur Genotoxizität und Mutagenität für Melphalan aus den RTECS Daten, aus Gold (1997), aus Kim (1999) und aus der IARC Bewertung (Supplement 7; 1987; p. 239) zusammengefasst:

Tabelle 18: Melphalan

AMES:	CA:	Dominanter Letalttest:	Mikrokern:	SCE:	UDS:
positiv Gold, 1997 Kim, 1999 IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv Kim, 1999 IARC Suppl. 7, 1987	positiv RTECS, 2000-2	positiv Kim, 1999 IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv RTECS, 2000-2

Melphalan ließ bei Konzentrationen von 5 und 50 µg/mL im ³²P-Postlabeling-Verfahren keine Addukte in Rattenleberschnitten erkennen (Abbildung 31). Die Chromatogramme der Positivkontrollen werden in der Abbildung 32 gezeigt. In den Chromatogrammen der mit substanzbehandelten Leberschnitte sind einzelne Spots zu erkennen, die u.a. auf das Alter der Ratten zurückzuführen sind. Dies lässt sich damit begründen, dass diese Spots auch in der Negativkontrolle zu erkennen sind und somit nicht in Verbindung mit der Substanz stehen. Auf den Chromatogrammen der *in vitro* Positivkontrolle sind diese Spots nicht zu erkennen, was mit der kürzeren Expositionszeit der Imaging-Platten zu erklären ist.

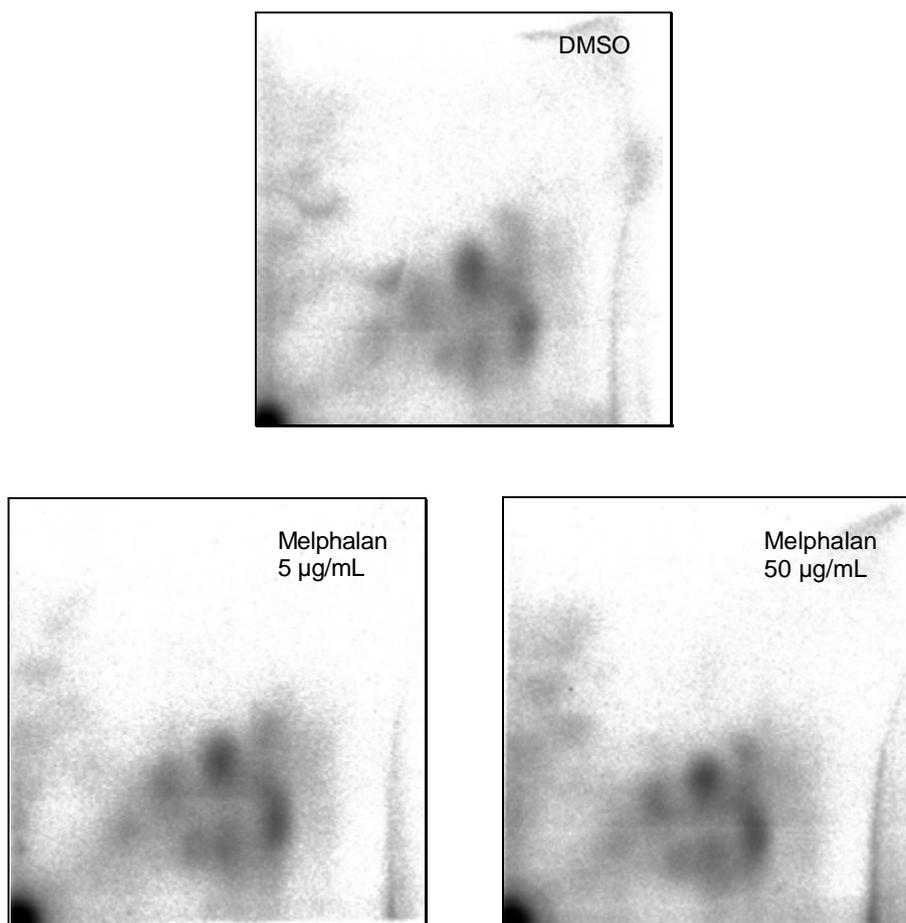


Abbildung 31: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Melphalan 5 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Melphalan 50 µg/mL (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Proben zu erkennen.

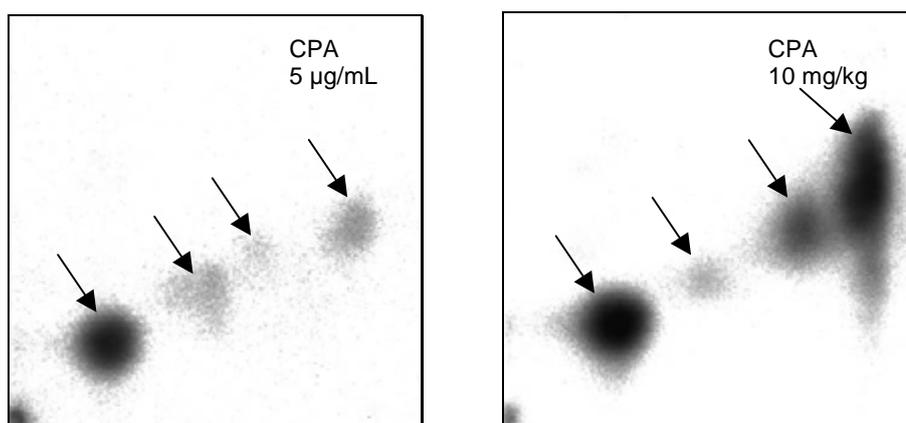
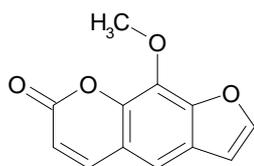


Abbildung 32: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Melphalan über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe sichtbar.

Methoxsalen (8-Methoxypsoralen, Ammoidin):

Handelsname: Meladinine

Methoxsalen gehört in die Stoffgruppe der Dermatika und wird bei schweren Formen der Psoriasis vulgaris, bei Mycosis fungoides und anderen Formen des kutanen T-Zell-Lymphoms, oder auch bei Vitiligo bei entsprechendem Hauttyp (ab Typ III) eingesetzt.

Die therapeutische genutzte Wirkung von Methoxsalen beruht auf dessen photosensibilisierenden Eigenschaften. Methoxsalen wird daher im Rahmen der Photochemotherapie (PUVA = Psoralen + UVA) eingesetzt.

Aufgrund seiner planaren Struktur lagert sich Methoxsalen zwischen den beiden Strängen der DNA-Doppelhelix ein und bildet lockere Komplexe mit den Pyrimidin-Basen (Interkalierung). Unter dem Einfluss von UV-A bildet das interkalierte Methoxsalen mit den Pyrimidin-Basen der DNA Monoaddukte. Werden diese Monoaddukte erneut durch Bestrahlung mit UV-A photoaktiviert, so bilden sich Quervernetzungen zwischen den DNA-Strängen, sogenannte cross-links aus, (phototoxische-Typ-I-Reaktion), die eine Inhibition der Zellproliferation zur Folge hat (Fachinfo, Mai 1998).

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse zur Genotoxizität und Mutagenität für Methoxsalen wurde aus der IARC-Bewertung (Supplement 7; 1987; p. 261), aus der RTECS Datenbank und aus der Literatur von Gold (1997) und von Kim (1999) erhoben und wird in Tabelle 19 wiedergegeben:

Tabelle 19: Methoxsalen ohne UV-A Bestrahlung

AMES:	CA:	Mikrokern:	SCE:	UDS:
positiv Gold, 1997 Kim, 1999 IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv / fraglich Kim, 1999 / IARC Suppl. 7, 1987	fraglich Kim, 1999	positiv / fraglich RTECS, 2000-2 / IARC Suppl. 7, 1987	positiv RTECS, 2000-2

Die DNA-Adduktbestimmung ergab in Rattenleberschnitten bei Konzentrationen von 5; 10; 50 und 100 µg Methoxsalen/mL mit dem Nuklease P1-Anreicherungsverfahren im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMSO) ein positives Ergebnis. Die Konzentrationen von 10 µg/mL und 100 µg/mL wurden in ein und demselben Versuch untersucht (Abbildung 33), wohingegen die Konzentrationen von 5 µg/mL (Abbildung 34) und 50 µg/mL (Abbildung 35) in unterschiedlichen Versuchen mit Rattenleberschnitten inkubiert wurden. Aus diesem Grund, werden in den folgenden Abbildungen auch die zu dem jeweiligen Versuch gehörenden Negativkontrollen extra aufgeführt.

Die Chromatogramme der positiven Kontrollen werden in der Abbildung 36 wiedergegeben.

Der Adduktspiegel lag bei der Konzentration von 100 µg/mL nach Abzug der Negativkontrolle bei 7,0 Addukte/10⁹ Nukleotiden. Bei der Konzentration von 10 µg/mL wurde nur noch ein RAL-Wert von 3,0 Addukte/10⁹ Nukleotiden detektiert. Die Konzentration von 50 µg/mL wies das höchste Adduktlevel von 30 Addukte/10⁹ Nukleotiden auf, wohingegen bei 5 µg/mL nur noch 3,5 Addukte/10⁹ Nukleotiden gefunden wurden.

Die gleiche Untersuchung mit Butanolanreicherung fiel dagegen negativ aus. In den Chromatogrammen der behandelten Schnitten sind einzelne Spots zu erkennen, die auch in den Negativkontrollen auftreten und daher als I-Compounds beschrieben werden können.

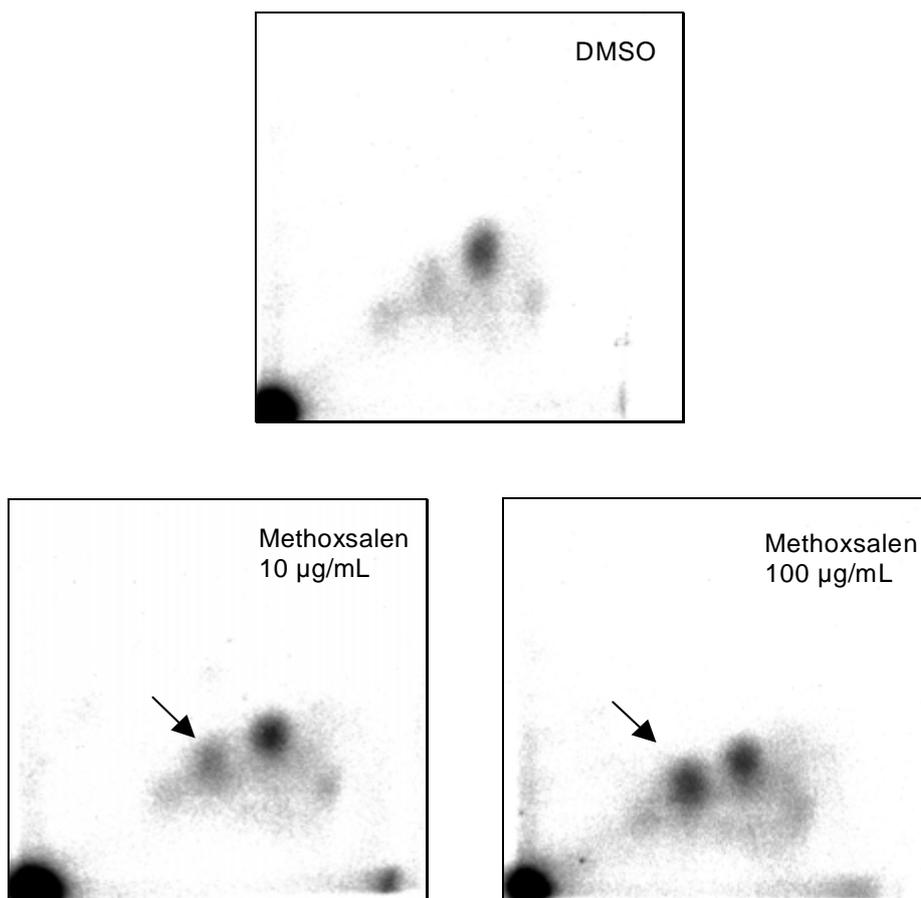


Abbildung 33: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Methoxsalen 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Methoxsalen 100 µg/mL (Rattenleber, w.)
 Die Leberschnitte wurden in 12- well-Platten 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden mit Hilfe der Nuklease P1 angereichert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt befindet sich in der unteren linken Ecke.

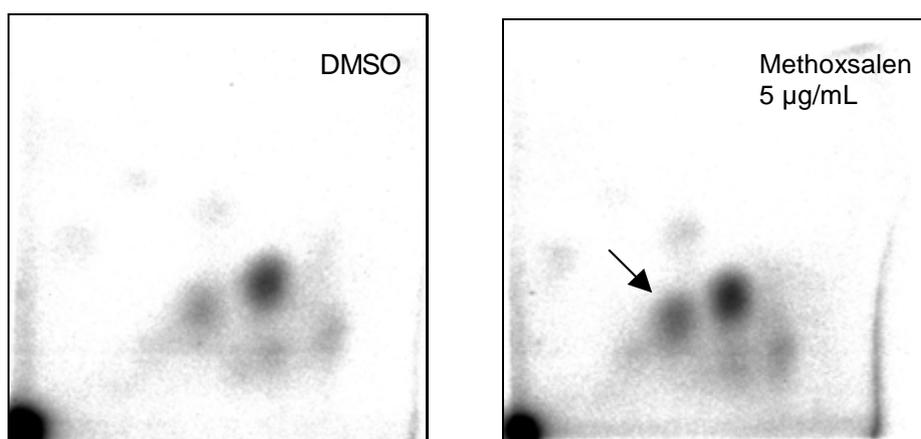


Abbildung 34: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.) und von Methoxsalen 5 µg/mL (Rattenleber, w.)
 Die Leberschnitte inkubierten über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung. Zur Anreicherung der Addukte wurde die Nuklease P1-Methode angewandt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke ist der Auftragspunkt der Proben zu erkennen.

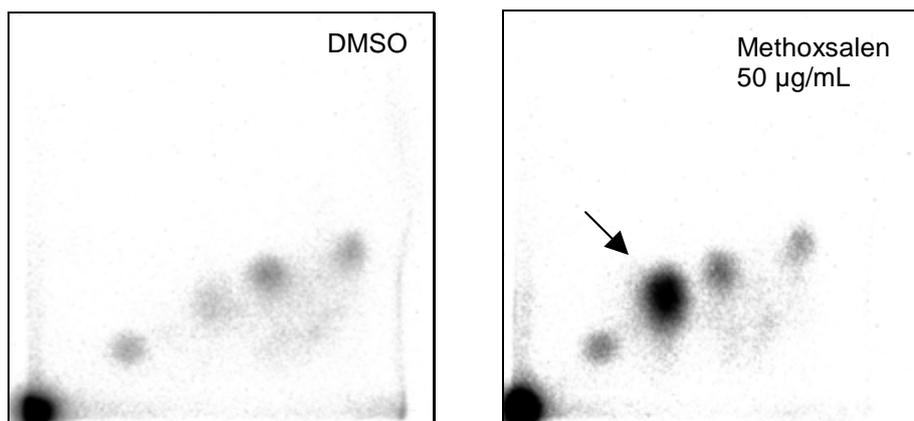


Abbildung 35: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.) und von Methoxsalen 50 µg/mL (Rattenleber, w.) Die Leberschnitte inkubierten 6 Stunden lang bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung. Die Anreicherung der Addukte erfolgte mittels Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

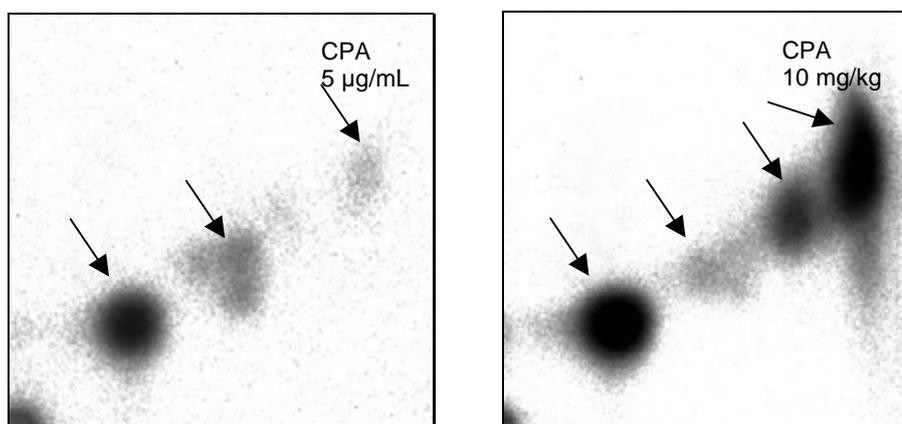
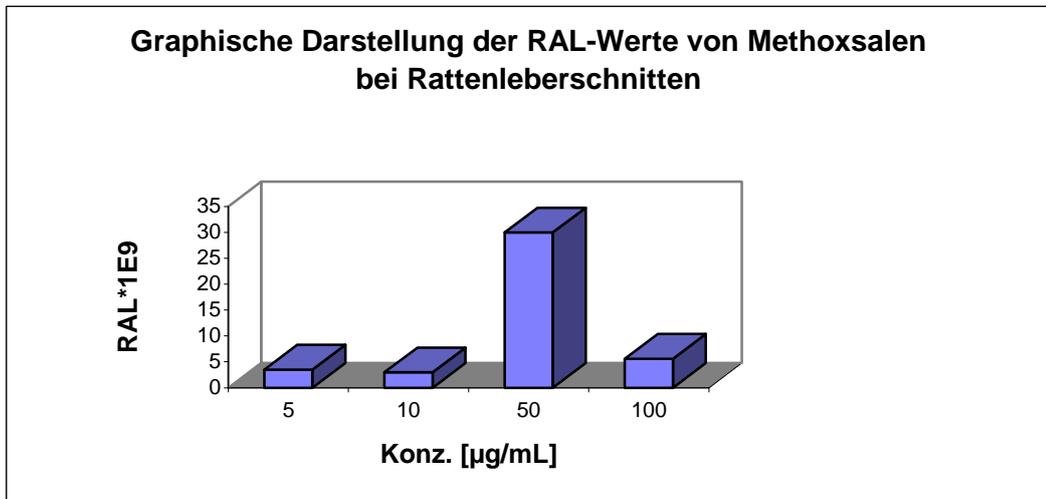


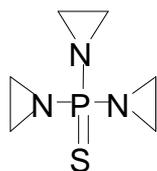
Abbildung 36: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg) Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Methoxsalen über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 15 Minuten. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe sichtbar.

Die folgende Grafik 1 verdeutlicht die RAL-Werte in Bezug zu den eingesetzten Methoxsalen Konzentrationen:



Grafik 1: Adduktlevel von Methoxsalen nach Nuklease P1 Anreicherung

Methoxsalen zeigte in der Kaliumbestimmung bei den untersuchten Konzentrationen keine zytotoxischen Wirkungen.

Thiotepa (Triethylthiophosphoramid):

Handelsname: Thiotepa „Lederle“

Bei Thiotepa handelt es sich um ein Zytostatikum, welches bei folgenden Indikationen zum Einsatz kommt:

Lokale Anwendung bei Blasenpapillomen, Blasenkarzinomen, Kondylomen und karzinomatösen Pleura- und Peritonealgüssen, sowie systemische Behandlung von Mamma-, Ovarial-Karzinomen, chronischen Leukämien und Morbus Hodgkin. Thiotepa gehört zur Gruppe der polyfunktionellen, alkylierenden Substanzen und ist sehr hämatotoxisch. Der Wirkmechanismus dieser Pharmaka beruht auf ihrer Fähigkeit, Alkylgruppen auf biologisch wichtige Zellbestandteile zu übertragen und dadurch deren Funktion zu beeinträchtigen. Diese Substanz besitzt eine zytolytische sowie radiomimetische Wirkung. Sie hemmt die Glykolyse, die Zellatmung, die Proteinsynthese, die Aktivität einer Reihe von Enzymen und insbesondere die Nucleinsäuresynthese (Fachinfo, März 1995).

In der folgenden Tabelle 20 werden die Daten zur Genotoxizität und zur Mutagenität von Thiotepa aus der RTECS Datenbank, aus der IARC Bewertung (Vol.: 50, 1990, p. 123), aus Gold (1997) und aus Chen (1999) zusammengefasst.

Tabelle 20: Thiotepa

AMES:	CA:	Dominanter Letaltest:	Hprt:	Mikrokern:	SCE:	UDS:
positiv Gold, 1997 IARC Vol.: 50, 1990 RTECS, 2000-2	positiv IARC Vol.: 50, 1990	positiv IARC Vol.: 50, 1990 RTECS, 2000-2	positiv Chen, 1999	positiv IARC Vol.: 50, 1990 RTECS, 2000-2	positiv IARC Vol.: 50, 1990 RTECS, 2000-2	positiv IARC Vol.: 50, 1990 RTECS, 2000-2

Die DNA-Adduktbestimmung mit Hilfe des ^{32}P -Postlabeling-Verfahrens fiel in Rattenleberschnitten bei Konzentrationen von 10 und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ negativ aus (Abbildung 37). Die zugehörigen Positivkontrollen werden in Abbildung 38 dargestellt.

Sowohl auf den Chromatogrammen der behandelten Leberschnitte, als auch auf dem Chromatogramm der Negativkontrolle sind einzelne Spots zu erkennen, die als Pseudo-Addukte beurteilt werden können.

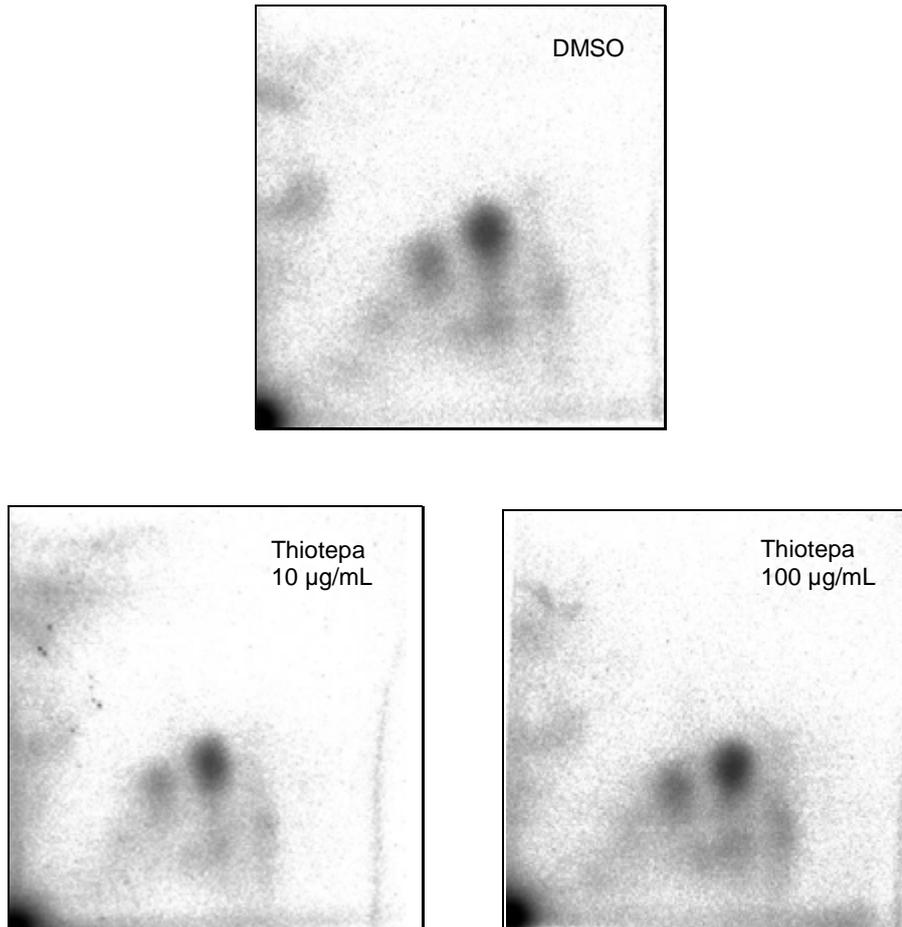


Abbildung 37: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Thiotepa 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Thiotepa 100 µg/mL (Rattenleber, w.)
Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Proben zu erkennen.

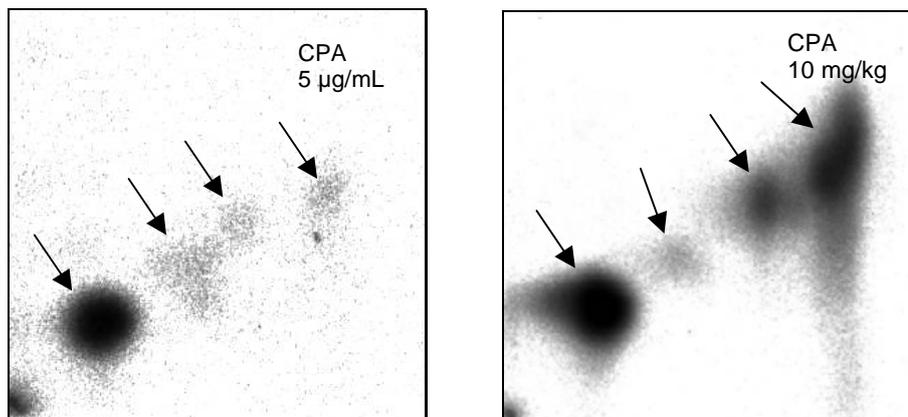


Abbildung 38: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)
Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Thiotepa über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 15 Minuten. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe sichtbar.

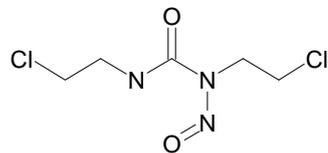
4.1.1.2 IARC 2A

In der Tabelle 21 sind Substanzen zusammengefasst, die von der IARC als wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen bewertet werden.

Tabelle 21: IARC 2A Substanzen

Substanz:	CAS-Nummer:	Mol. Gewicht: [g/mol]	gelöst in:	untersuchte Konzentrationen: [µg/mL]
Carmustin	154-93-8	214	DMSO	10; 100
Chloramphenicol	56-75-7	323	DMSO	10; 100
Doxorubicin Hydrochlorid	25316-40-9	580	DMSO	5; 10; 20; 50; 100;

Carmustin (BCNU = Bischloroethylnitrosourea):



Handelsname: Carmubris

Carmustin ist ein antineoplastisch wirksames Nitrosoharnstoffderivat aus der Reihe der Alkylantien. Aufgrund der starken Lipophilie penetriert Carmustin leicht die Blut-Hirnschranke und wird aus diesem Grund vor allem zur Behandlung von Hirntumoren, wie z.B. Glioblastom, Hirnstammgliom, Medulloblastom, Astrozytom und Ependymom, eingesetzt.

Des weiteren kommt es zur Anwendung bei multiplen Myelomen, bei Morbus Hodgkin und bei Retikulumzellsarkomen.

Es gehört zur Gruppe der Alkylantien und verändert DNA, RNA und Proteine durch Alkylierung, so dass sie für den Zellstoffwechsel unbrauchbar werden. Die unter Alkylantien und Strahlentherapie häufig beobachteten Repair-Mechanismen an der DNA werden durch Carmustin bzw. seine Metaboliten gehemmt. Carmustin wirkt zellzyklusunspezifisch und damit auch auf ruhende Zellen zytotoxisch.

Die nachstehende Tabelle 22 fasst die RTECS Literaturdaten und die Daten aus der IARC Bewertung (Supplement 7; 1987; p. 150) zur Genotoxizität und Mutagenität von Carmustin zusammen.

Tabelle 22: Carmustin

AMES:	CA:	Mikrokern:	SCE:
positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv IARC Suppl. 7, 1987	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2

Die Adduktanalyse mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren ergab bei Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/mL}$ und 100 $\mu\text{g/mL}$ Carmustin in Rattenleberschnitten ein negatives Ergebnis (Abbildung 39).

Die Chromatogramme der Positivkontrollen werden in der Abbildung 40 wiedergegeben.

Auf allen Chromatogrammen sind einzelne Spots zu erkennen, die sich gleichen. Hierbei handelt es sich um Pseudo-Addukte, die nicht mit der Substanzbehandlung in Verbindung stehen, sondern u.a. auf die Ernährung und das Alter der Ratten zurückzuführen sind.

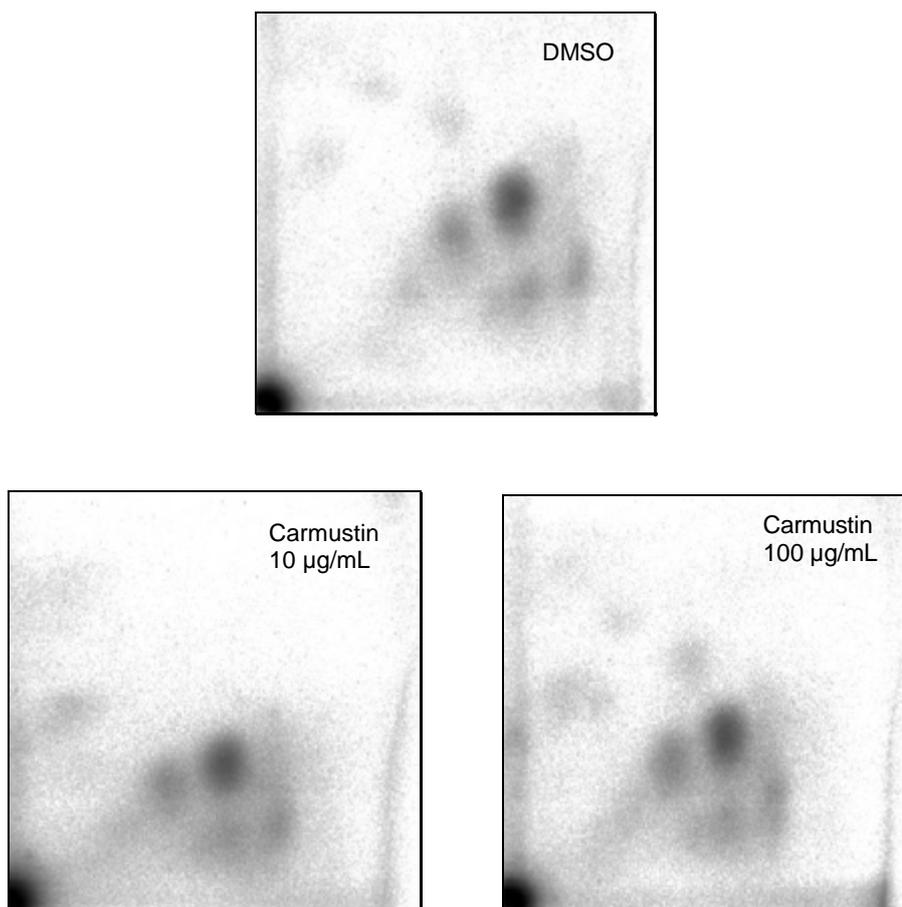


Abbildung 39: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Carmustin 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Carmustin 100 µg/mL (Rattenleber, w.) Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Proben zu erkennen.

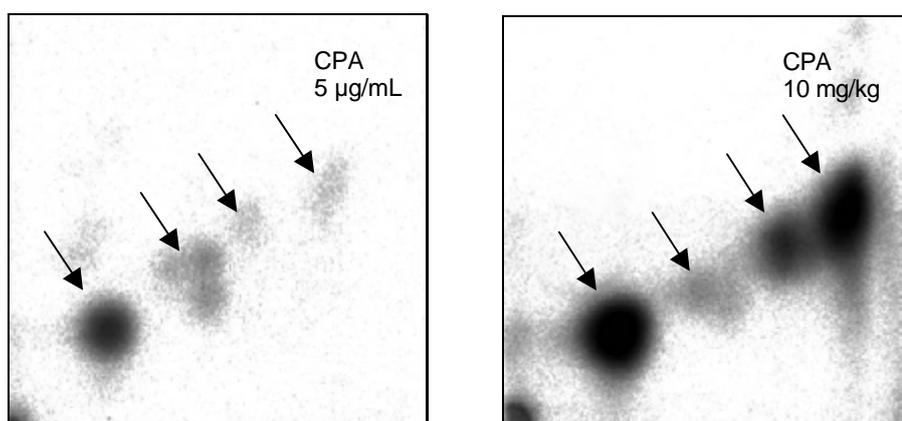
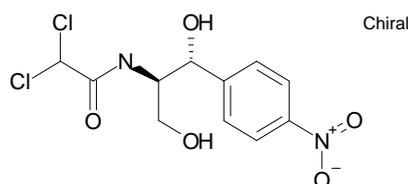


Abbildung 40: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg) Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Carmustin über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 15 Minuten. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe sichtbar.

Chloramphenicol:

Handelsnamen: u.a. Oleomycetin , Paraxin

Chloramphenicol ist ein synthetisch hergestelltes Breitspektrumantibiotikum. Es wirkt bakteriostatisch auf intra- und extrazellulär gelegene Bakterien durch Hemmung der bakteriellen Eiweißsynthese. Das Wirkungsspektrum umfasst eine Reihe von grampositiven und gramnegativen aeroben Bakterien sowie die meisten sporenlösen Anaerobier. Chloramphenicol wirkt auch gegen Salmonellen, Rickettsien, Chlamydien, Mykoplasmen und Leptospiren. Die minimalen Hemmkonzentrationen liegen *in vitro* bei sensiblen Bakterien zwischen 1 und 10 mg/mL.

Die Literaturdaten zur Genotoxizität und Mutagenität von Chloramphenicol werden aus dem IARC Volumen (50, 1990, p. 169); aus der RTECS Datenbank und aus Gold (1997) in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Chloramphenicol

AMES:	CA:	Dominanter Letaltest:	Maus Lymphoma:	SCE:	UDS:
negativ Gold, 1997 IARC Vol.: 50, 1990	positiv IARC Vol.: 50, 1990	fraglich IARC Vol.: 50, 1990	positiv IARC Vol.: 50, 1990 RTECS, 2000-2	positiv IARC Vol.: 50, 1990 RTECS, 2000-2	positiv RTECS, 2000-2

Mit Hilfe des ^{32}P -Postlabeling-Verfahrens wurden in Rattenleberschnitten bei Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/mL}$ und 100 $\mu\text{g/mL}$ Chloramphenicol keine Addukte detektiert (Abbildung 41). Die Abbildung 42 zeigt den Ausfall der Positivkontrollen im ^{32}P -Postlabeling Assay nach Nuklease P1 Adduktanreicherung.

Die vorgefundenen Spots auf den Chromatogrammen der behandelten Leberschnitte stellen sich auch in dem Chromatogramm der Negativkontrolle dar und werden aus diesem Grund als I-Compounds beurteilt, die nicht mit der Substanzbehandlung im Zusammenhang stehen.

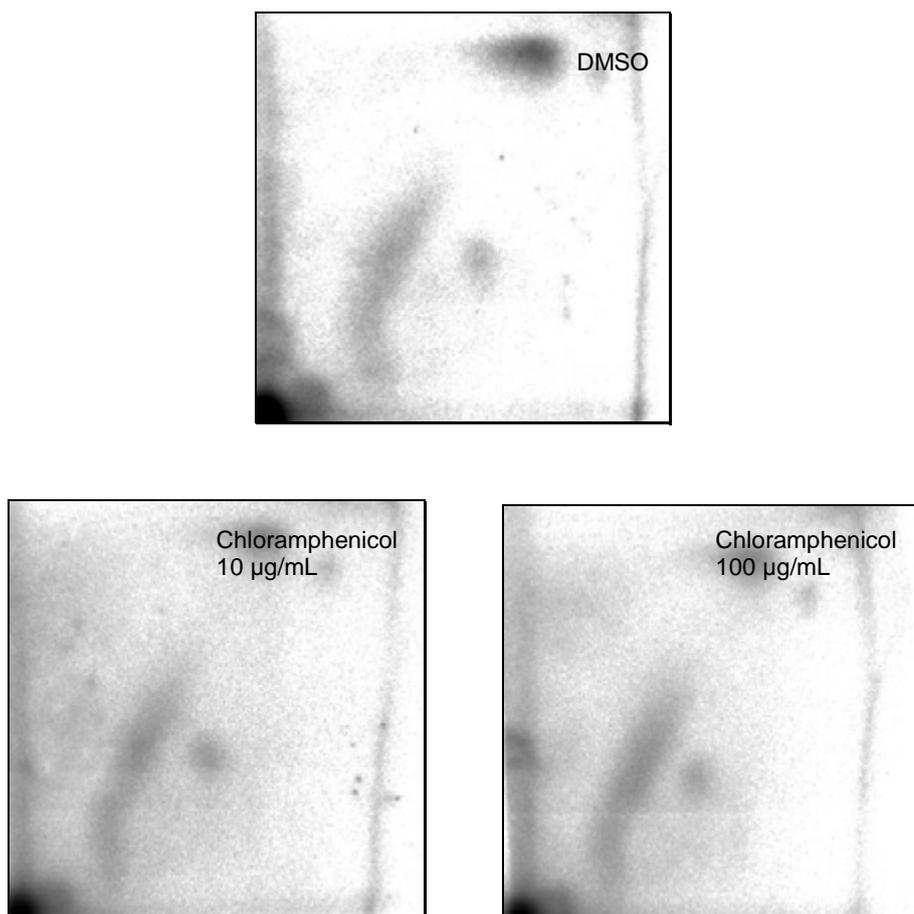


Abbildung 41: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Chloramphenicol 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Chloramphenicol 100 µg/mL (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte inkubierten über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Adduktanreicherung wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. Der Auftragspunkt der Proben befindet sich in der unteren linken Ecke.

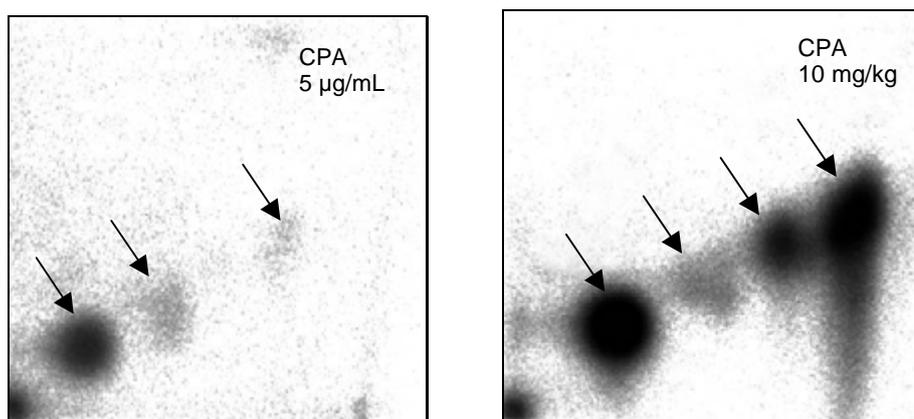
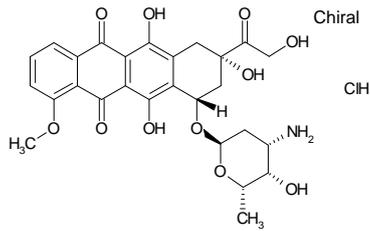


Abbildung 42: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle inkubierten die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Chloramphenicol über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe sichtbar.

Doxorubicin (Adriamycin) Hydrochlorid:

Handelsnamen: u.a. Adriblastin , Adrimedac

Doxorubicin Hydrochlorid gehört zu den Zytostatika aus der Gruppe der Anthrazykline und wird zur Behandlung von Mammakarzinomen, Endometriumkarzinomen, Non-Hodgkin-Lymphomen, Hodgkin-Lymphomen, multiple Myelomen, Magen-, Harnblasen-, Ovarialkarzinomen, Weichteil-, Osteo- und Rhabdomyosarkomen eingesetzt.

Doxorubicin Hydrochlorid ist ein Fermentationsprodukt des Pilzes *Streptomyces peuceticus* var. *caesius* mit antineoplastischen Eigenschaften. Es ist direkt wirksam und bedarf keiner metabolischen Aktivierung, um seine zytostatische Wirkung zu entfalten. Durch Spaltung der Glykosidbindung wird es inaktiviert. Der exakte Wirkungsmechanismus ist nicht vollständig geklärt, beruht jedoch höchstwahrscheinlich auf der DNA-Bindungsfähigkeit und daraus folgender Interkalation zwischen Basenpaaren, was zu einer sterischen Behinderung der DNA- und RNA-Synthese führt. Weitere Wirkungsmechanismen, die diskutiert werden, sind die Bildung freier Radikale, eine direkte Membranwirkung sowie die Chelatbildung mit Metallionen. Doxorubicin reagiert zellzyklusphasenunspezifisch und ist kardiotoxisch.

Der Metabolismus des Doxorubicin Hydrochlorids erfolgt über eine Reduktion der Oxofunktion in der Seitenkette am C-13, wobei das ebenfalls zytotoxisch wirksame Doxorubicinol entsteht. Weitere Umwandlungen führen zu Endprodukten, die nicht mehr zytostatisch wirksam sind (Fachinfo, Juni 2000).

Die Daten zur Genotoxizität und Mutagenität von Doxorubicin Hydrochlorid wurden den RTECS und den IARC- Daten (Suppl.7, 1987, p. 81) entnommen und in Tabelle 24 zusammengestellt.

Tabelle 24: Doxorubicin Hydrochlorid

AMES:	CA:	Dominanter Letalttest:	Mikrokern:	SCE:	UDS:
positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv IARC Suppl. 7, 1987	positiv RTECS, 2000-2	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-2	positiv RTECS, 2000-2

Mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren wurden nach der Nuklease P1-Anreicherung in Rattenleberschnitten bei Konzentrationen von 5, 10 und 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxorubicin Hydrochlorid jeweils vier Addukte mit Gesamt-RAL-Werten von 21, 73 und 50 Addukte/ 10^9 Nukleotiden detektiert. Die Konzentrationen von 5 und 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden in ein und demselben Versuch inkubiert (Abbildung 45), wohingegen die Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in einem einzelnen Versuch untersucht wurde (Abbildung 43). Daher werden in den folgenden Abbildungen auch die zum jeweiligen Versuch gehörenden Negativkontrollen extra aufgeführt.

Die Ergebnisse der zugehörigen Positivkontrollen werden auf den Chromatogrammen der Abbildung 44 und der Abbildung 46 gezeigt.

Die Chromatogramme der behandelten Leberschnitte weisen neben den 4 Addukten auch noch einen weiteren Spot auf, der auch in der Negativkontrolle zu finden ist.

Bei diesem Spot handelt es sich um ein Pseudo-Addukt, welches als I-Compound bezeichnet werden kann. Es steht nicht in Verbindung mit der Substanzbehandlung.

Anhand der Kaliumbestimmung wurden bei Konzentrationen von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxorubicin Hydrochlorid cytotoxische Effekte ermittelt.

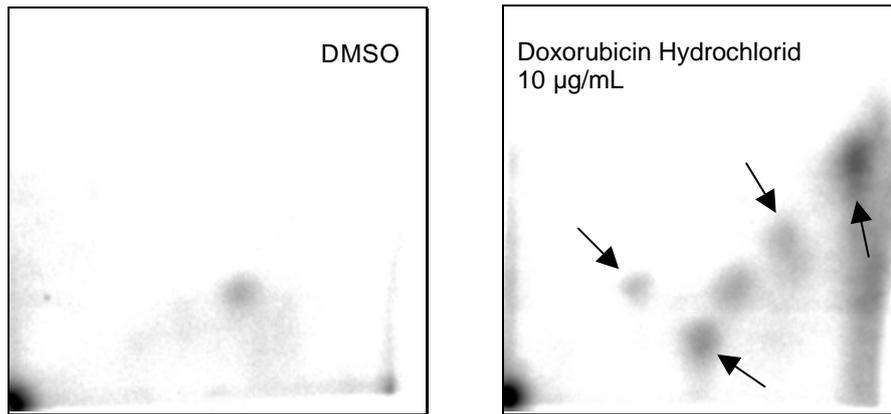


Abbildung 43: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.) und von Doxorubicin Hydrochlorid 10 µg/mL (Rattenleber, w.) Über 6 Stunden wurden die Leberschnitte in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der mit Pfeilen markierten Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt zu erkennen.

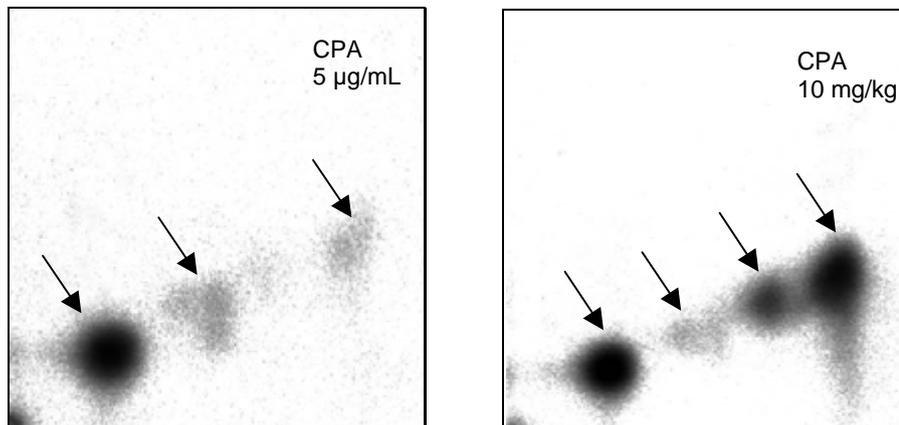


Abbildung 44: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg) Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Doxorubicin über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten dauerte 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe zu erkennen.

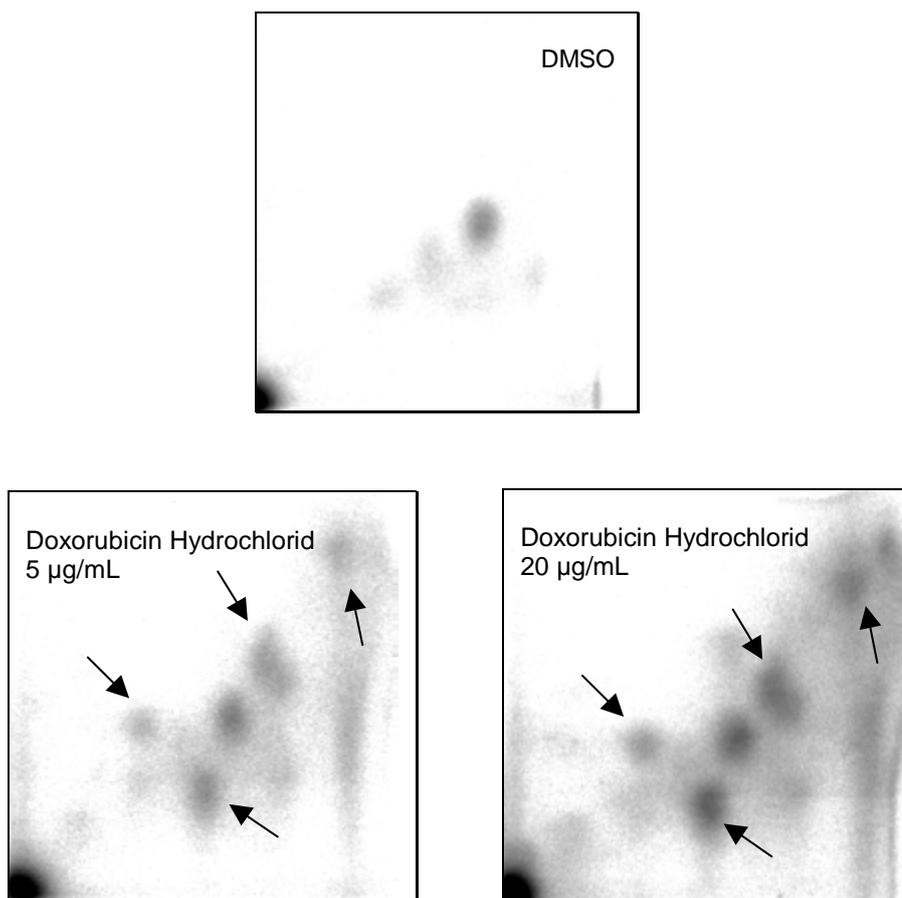


Abbildung 45: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Doxorubicin Hydrochlorid 5 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Doxorubicin Hydrochlorid 20 µg/mL (Rattenleber, w.) 6 Stunden lang wurden die Leberschnitte in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der mit Pfeilen markierten Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt ist in der linken unteren Ecke zu erkennen.

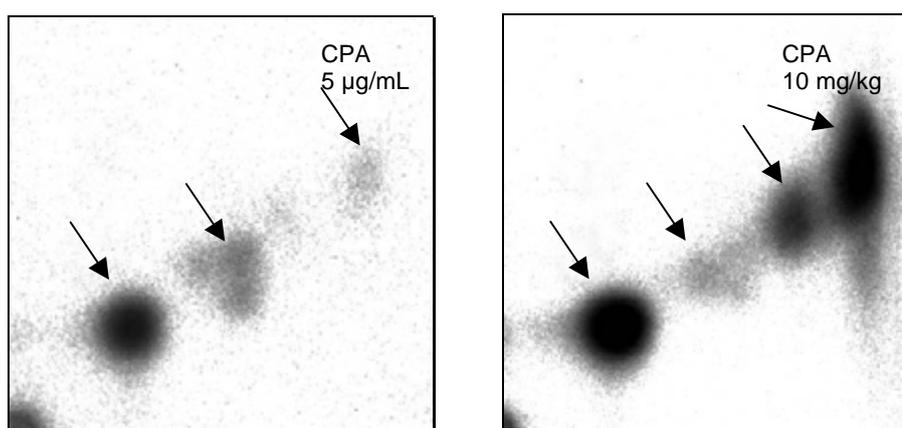
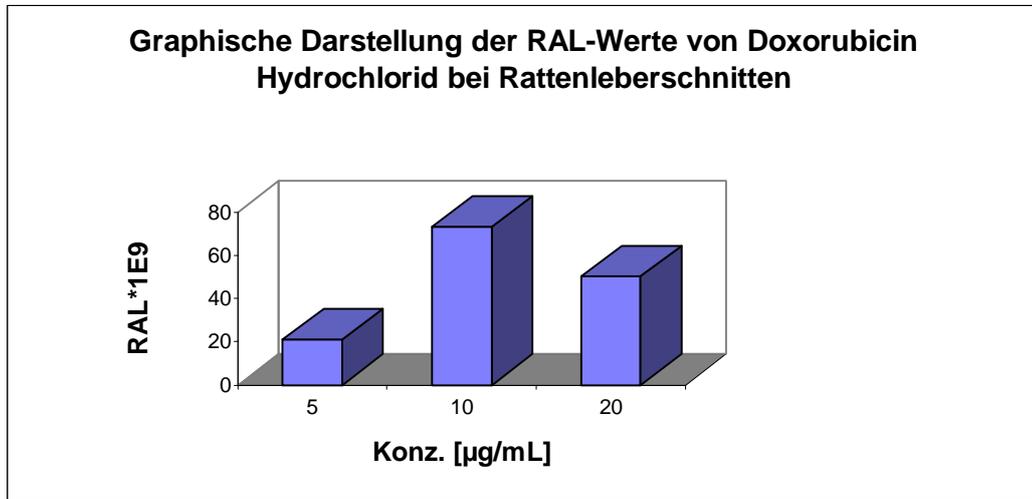


Abbildung 46: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg) Bei der *in vitro*-Positivkontrolle inkubierten die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Doxorubicin Hydrochlorid 6 Stunden lang bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung. Bei Raumtemperatur wurden die Imaging-Platten 15 Minuten exponiert. Der Auftragspunkt der Probe wird in der linken unteren Ecke sichtbar.

Die Grafik 2 fasst die RAL-Werte in Rattenleberschnitten in Bezug zu den eingesetzten Konzentrationen von Doxorubicin Hydrochlorid zusammen.



Grafik 2: Adduktlevel von Doxorubicin Hydrochlorid in Rattenleberschnitten (w.) nach Nuklease P1 Anreicherung

Doxorubicin Hydrochlorid ergab auch in Affenleberschnitten (w.) bei Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/mL}$ und 20 $\mu\text{g/mL}$ positive Adduktergebnisse (Abbildung 47). Auffallend ist, dass die Adduktlevel wesentlich stärker ausgeprägt sind, als bei den Rattenleberschnitten und dass in Affenleberschnitten 5 Addukte detektiert werden konnten. Die Gesamt-RAL-Werte belaufen sich nach Abzug der Kontrollen bei 10 $\mu\text{g/mL}$ auf 167,5 Addukte / 10^9 Nukleotide und bei 20 $\mu\text{g/mL}$ auf 546 Addukte / 10^9 Nukleotide.

Als positive *in vitro* Kontrolle wurde in diesem Versuch Tamoxifen (10 $\mu\text{g/mL}$) neben der *in vivo* Kontrolle von CPA (10 mg/kg) eingesetzt (Abbildung 48).

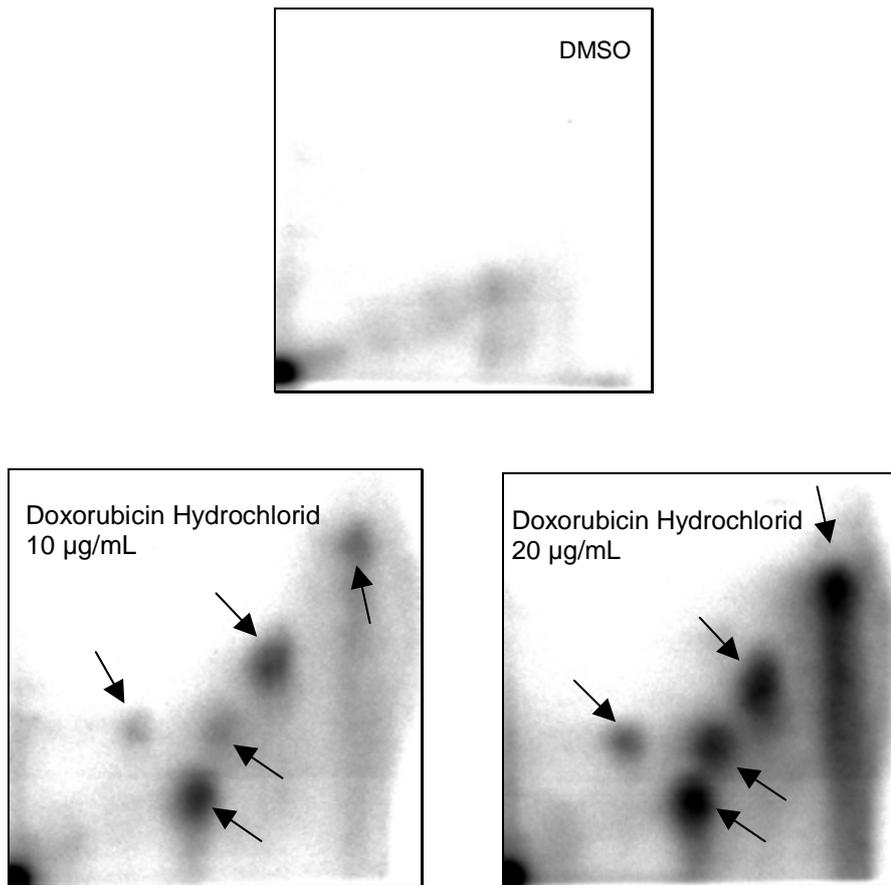


Abbildung 47: DNA-Adduktumuster von DMSO (Affenleber, w.), von Doxorubicin Hydrochlorid 10 µg/mL (Affenleber, w.) und von Doxorubicin Hydrochlorid 20 µg/mL (Affenleber, w.)

Die Leberschnitte inkubierten über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die mit Pfeilen markierten Addukte wurden mit Hilfe der Nuklease P1 Methode angereichert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke ist der Auftragspunkt erkennbar.

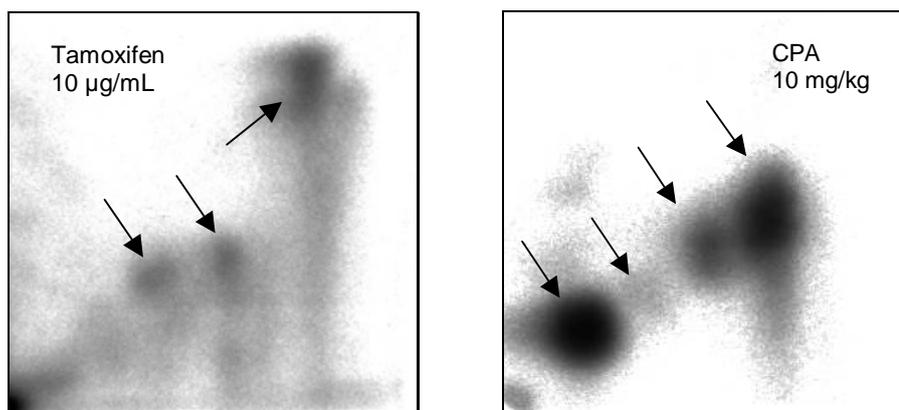
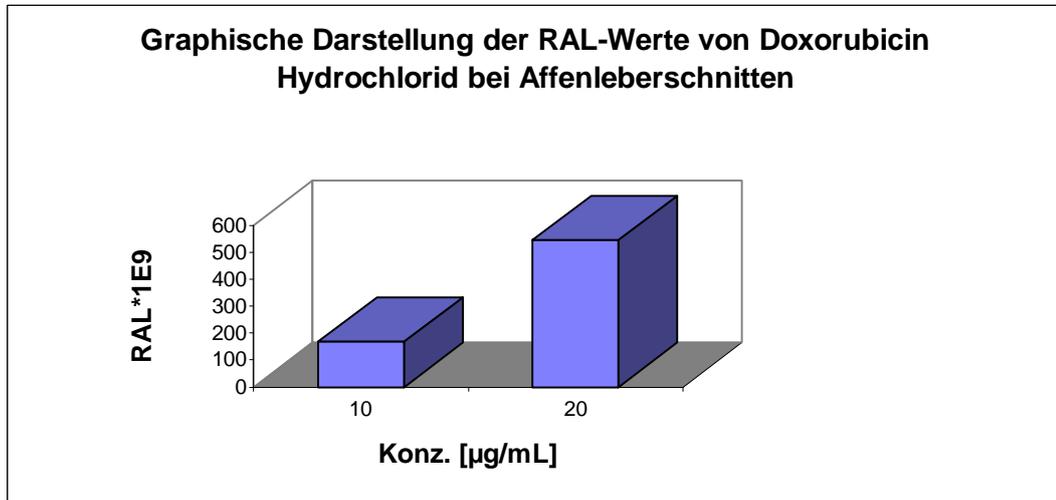


Abbildung 48: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Doxorubicin Hydrochlorid die Affenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten betrug bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben befindet sich in der unteren linken Ecke.

Die folgende Grafik 3 veranschaulicht die RAL-Werte in Affenleberschnitten in Bezug zu den untersuchten Konzentrationen von Doxorubicin Hydrochlorid nach dem Nuklease P1 Anreicherungsverfahren:



Grafik 3: Adduktlevel von Doxorubicin Hydrochlorid in Affenleberschnitten (w.) nach Nuklease P1 Anreicherung

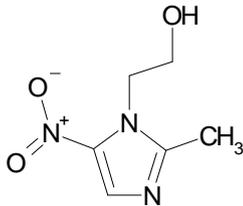
4.1.1.3 IARC 2B

Tabelle 25 beinhaltet Substanzen, die von der IARC als möglicherweise kanzerogen für den Menschen bewertet werden.

Tabelle 25: IARC 2B Substanzen

Substanz:	CAS-Nummer:	Mol. Gewicht: [g/mol]	gelöst in:	untersuchte Konzentrationen: [µg/mL]
Metronidazol	443-48-1	171	DMSO	10; 100
Propylthiouracil	51-52-5	170	DMSO	10; 100

Metronidazol:



Handelsnamen: u.a. Clont , Flagyl , Fossyl

Metronidazol ist ein Chemotherapeutikum und kommt bei der Behandlung von Trichomoniasis, Aminkolpitis, Amöbiasis, Lambliasis und zur Infektionsprophylaxe bei operativen Eingriffen im gynäkologischen Bereich oder Magen-Darm-Trakt zum Einsatz.

Metronidazol gehört zur Stoffklasse der Nitroimidazole. In empfindlichen Protozoen und strikt anaerob wachsenden Bakterien wird es reduziert, wobei Acetamid und N-(2-Hydroxyethyl)-oxamidsäure gebildet werden. Durch Interaktion mit der DNA kommt es zur Hemmung der Nukleinsäuresynthese der betroffenen Mikroorganismen, was zum Absterben dieser Erreger führt.

Die verschiedenen, teilweise widersprüchlichen Daten aus der Literatur in Bezug auf die Genotoxizität und die Mutagenität von Metronidazol sind in der Tabelle 26 zusammengefasst:

Tabelle 26: Metronidazol

AMES:	CA:	COMET:	Mikrokern:	SCE:	UDS:
positiv Snyder, 2001 Waters, 1999 IARC Suppl. 7, 1987 RTECS, 2000-4	positiv Snyder, 2001	positiv Ré, 1997	positiv Snyder, 2001	positiv Snyder, 2001 RTECS, 2000-4	positiv Martelli, 1997
	negativ Dobiás, 1994 Waters, 1999 IARC Suppl. 7, 1987		negativ Dobiás, 1994 Waters, 1999 IARC Suppl. 7, 1987	fraglich Dobiás, 1994	negativ Dobiás, 1994

Metronidazol wird nach der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) mit der Entstehung von Cervixkrebs in Verbindung gebracht.

Im ³²P-Postlabeling-Verfahren wurden bei Konzentrationen von 10 und 100 µg/mL in Ratten- und Affenleberschnitten keine Addukte gefunden (Abbildung 49).

Die Chromatogramme der Positivkontrollen werden in Abbildung 50 dargestellt.

In den Chromatogrammen der mit substanzbehandelten Leberschnitte sind einzelne Spots zu erkennen, die u.a. auf die Ernährung und das Alter der Ratten zurückzuführen sind. Dies lässt sich damit begründen, dass diese Spots auch in der Negativkontrolle zu erkennen sind und somit nicht in Verbindung mit der Substanz stehen.

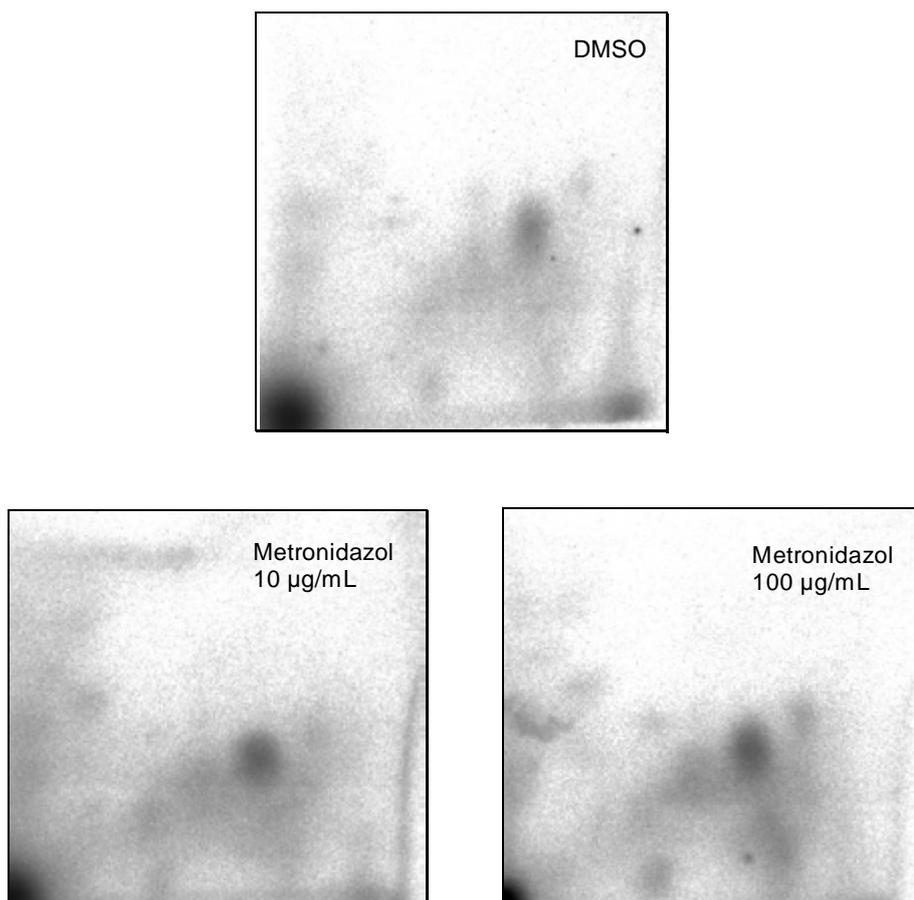


Abbildung 49: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Metronidazol 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Metronidazol 100 µg/mL (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte inkubierten über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Addukte wurden mit Hilfe der Nuklease P1-Methode angereichert. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. Der Auftragspunkt der Proben ist in der unteren linken Ecke zu erkennen.

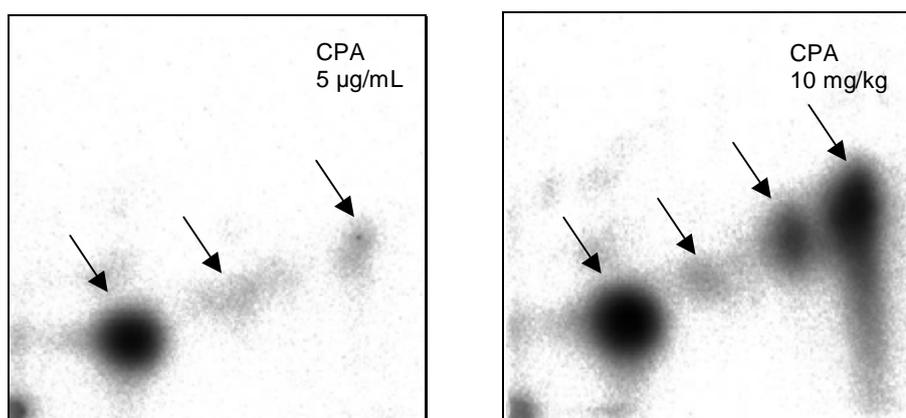
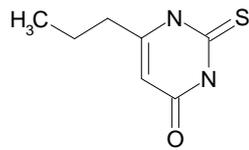


Abbildung 50: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle inkubierten die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Metronidazol über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke wird der Auftragspunkt der Probe sichtbar.

Propylthiouracil:

Handelsnamen: Propycil , Thyreostat

Bei Propylthiouracil handelt es sich um ein Thyreostatikum, welches bei Schilddrüsenüberfunktion (Hyperthyreose) bei Morbus Basedow und bei Schilddrüsen-Autonomie zur Anwendung kommt.

Die Thiouracile wirken thyreostatisch durch Hemmung des intrathyreoidalen Peroxidase-Systems. Sie vermindern den Iodeinbau in Thyreoglobulin und damit die Thyroxin-Produktion. Daneben wird die im Thyreoglobulin-Molekül stattfindende Kupplungsreaktion von bereits iodierten Tyrosyl-Resten gehemmt. Durch Propylthiouracil verarmt die Schilddrüse an Iod. Weiterhin vermindert es die Konversion von Thyroxin zu Triiodthyronin im peripheren Gewebe.

In der Literatur sind bisher keine Daten zur Genotoxizität und Mutagenität von Propylthiouracil zu finden.

Laut der Literatur von van den Eeden (1995) wird Propylthiouracil mit der Entstehung von Lungenkrebs assoziiert.

Die Untersuchungen im ³²P-Postlabeling-Verfahren ließen in Rattenleberschnitten bei Konzentrationen von 10 und 100 µg/mL keine DNA-Addukte erkennen (Abbildung 51).

In der Abbildung 52 werden die Chromatogramme der Positivkontrollen dargestellt. Auf den Chromatogrammen der behandelten Schnitte erscheinen einzelne Pseudo-Addukte, die als I-Compounds beschrieben werden können, da diese Spots auch in der Negativkontrolle zu verzeichnen sind.

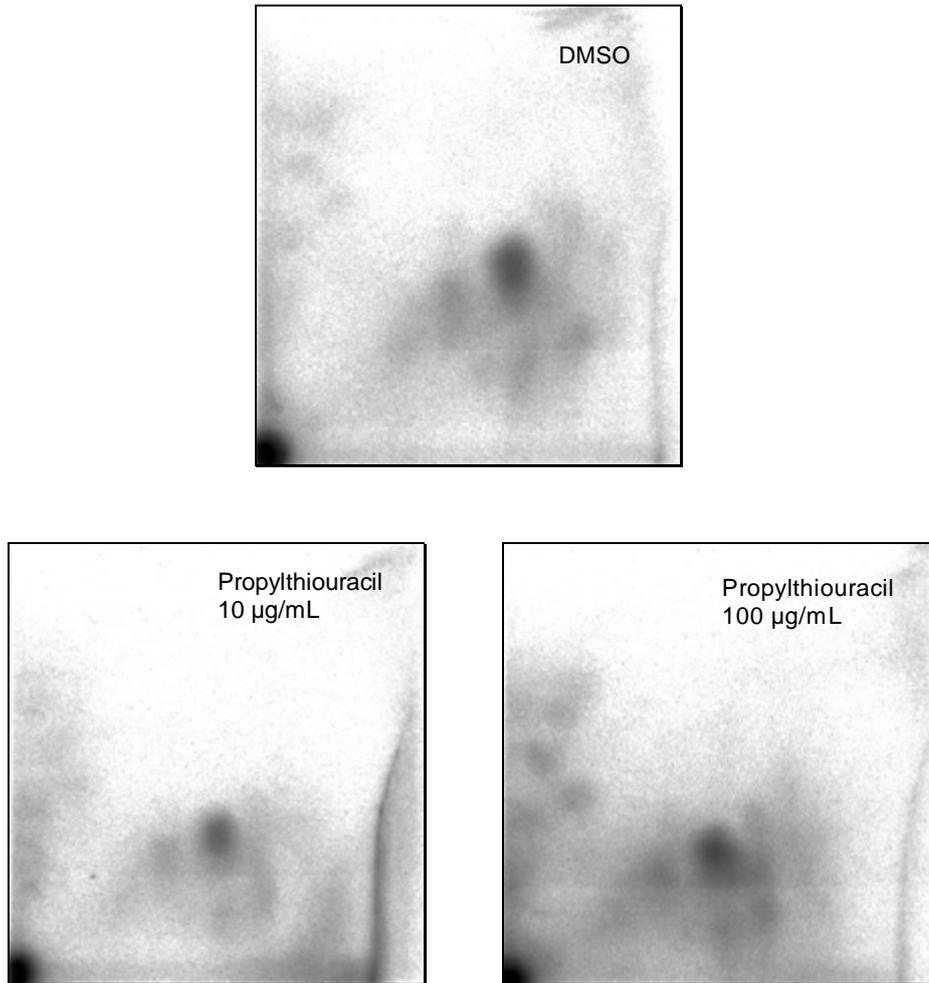


Abbildung 51: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Propylthiouracil 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Propylthiouracil 100 µg/mL (Rattenleber, w.)
Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte wurden mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. Der Auftragspunkt der Proben ist in der unteren linken Ecke zu erkennen.

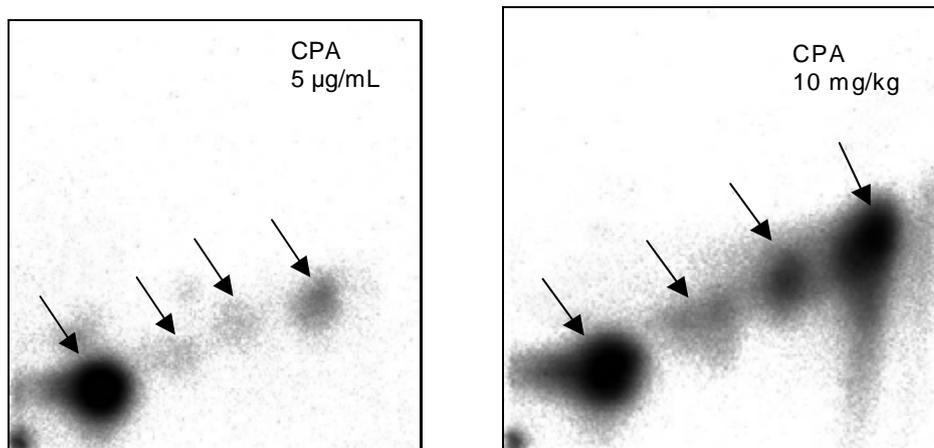


Abbildung 52: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)
Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Propylthiouracil über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke wird der Auftragspunkt der Probe erkennbar.

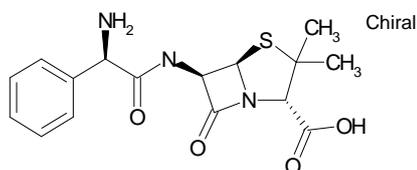
4.1.2 Ergebnisse der Gruppe 2

Substanzen, die von der IARC als nicht kanzerogen für den Menschen klassifiziert wurden (IARC 3).

Tabelle 27: IARC 3

Substanz:	CAS-Nummer:	Mol. Gewicht: [g/mol]	gelöst in:	untersuchte Konzentrationen: [µg/mL]
Ampicillin	69-53-4	349	DMSO	10; 100
Chloralhydrat	302-17-0	165	KH	50; 500
Furazolidon	67-45-8	225	DMSO	1; 5; 10; 20;50
Isoniazid	54-85-3	137	DMSO	10; 100
Nitrofurantoin	67-20-9	238	DMSO	5; 10; 50; 100
Paracetamol	103-90-2	151	KH	1.51 mg/ml
Theophyllin	58-55-9	180	DMSO	10; 100

Ampicillin:



Handelsnamen: u.a. Binotal , Unacid

Ampicillin ist ein Antibiotikum, welches bei akuten und chronischen bakteriellen Infektionen mit ampicillinempfindlichen Erregern an verschiedenen Stellen des Körpers, wie z.B. Infektionen von Hirnhaut, Herzklappen und Knochenmark, sowie Sepsis; Infektionen des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs; Infektionen der Atemwege einschließlich Keuchhusten; Infektionen der Harn- und Geschlechtsorganen; Infektionen der Gallenblase und der Gallenwege; Infektionen des Magen-Darm-Kanals; Infektionen der Haut und Weichteile; Infektionen im Bereich der Augen und Listeriose eingesetzt wird.

Ampicillin ist ein bakterizid wirkendes Antibiotikum, dessen Wirkungsspektrum grampositive (z.B. Streptokokken, Enterokokken, nicht-penicillinasebildende Staphylokokken, Pneumokokken, Listerien, Corynebakterien, Clostridien, Bacillus anthracis, Erysipelothrix rhusiopathiae) und vor allem gramnegative Keime (z.B. Haemophilus influenza, Meningokokken, Gonokokken, Bordetella pertussis, Proteus mirabilis, Salmonellen, Shigellen, E.coli) umfaßt. Ampicillin ist nicht penicillinasefest (Fachinfo, Juli 2001).

Aus der Literatur (Waters, 1999), aus dem IARC Monograph (Vol.: 50, 1990, p. 153) und aus der RTECS Datenbank sind folgende Ergebnisse zur Genotoxizität und Mutagenität von Ampicillin entnommen worden (Tabelle 28):

Tabelle 28: Ampicillin

AMES:	CA:	Maus-Lymphoma:	Mikrokern:	SCE:
negativ Waters, 1999 IARC Vol.: 50, 1990	negativ Waters, 1999	negativ IARC Vol.: 50, 1990	negativ Waters, 1999	negativ IARC Vol.: 50, 1990
RTECS, 2000-2	positiv IARC Vol.: 50, 1990			

Laut Selby (1989) wird Ampicillin in Verbindung zu Lungentumoren gebracht. In der Adduktanalyse mit dem ³²P-Postlabeling-Verfahren wurden bei Konzentrationen von 10 µg/mL und 100 µg/mL Ampicillin in Ratten- und Affenleberschnitten keine Addukte detektiert (Abbildung 53).

Die Chromatogramme der Positivkontrollen werden nachfolgend in der Abbildung 54 dargestellt.

Bei den einzelnen Spots auf den Chromatogrammen der behandelten Leberschnitte, als auch auf dem Chromatogramm der Negativkontrolle handelt es sich um Pseudo-Addukte, die dem Alter, der Ernährung und den Umwelteinflüssen der Ratten zuzuschreiben sind. Sie entstehen unabhängig von der Substanzbehandlung.

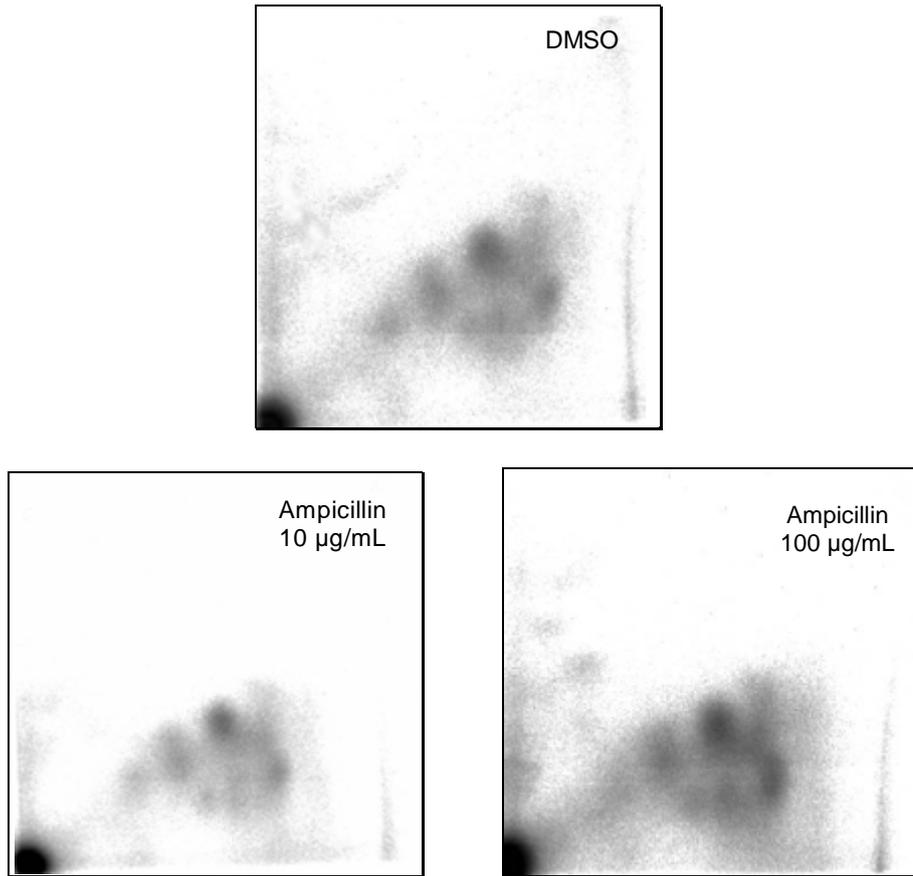


Abbildung 53: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Ampicillin 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Ampicillin 100 µg/mL (Rattenleber, w.)
Die Leberschnitte inkubierten über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Addukte wurden mit Hilfe der Nuklease P1-Methode angereichert. Bei Raumtemperatur wurden die Imaging-Platten für 16 Stunden exponiert. Der Auftragspunkt der Proben wird in der unteren linken Ecke sichtbar.

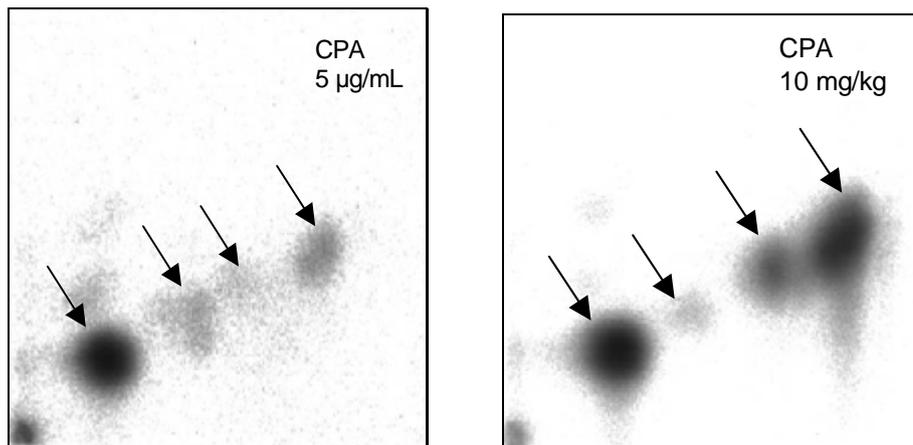
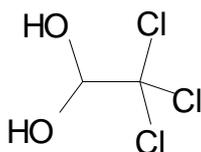


Abbildung 54: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)
Bei der *in vitro*-Positivkontrolle inkubierten die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Ampicillin 6 Stunden lang bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke wird der Auftragspunkt der Probe deutlich.

Chloralhydrat:

Handelsname: Chloraldurat

Das Hypnotikum wird bei Schlafstörungen und zur Beruhigung bei Erregungszuständen organischer und /oder psychischer Genese, wie zum Beispiel bei cerebralsklerotisch bedingten Unruhezuständen, eingesetzt. Es ist das älteste zur Zeit benutzte Schlafmittel.

Die Wirkung beruht auf einer Reizabschirmung des Zentralnervensystems. Der Wirkmechanismus beruht möglicherweise auf einer verminderten Produktion von freiem Acetylcholin und einer Reduktion der Acetylcholinaktivität. Hauptwirkort ist die Hirnrinde, wohingegen das Schlafsteuerzentrum im Gebiet des Zwischen- und Mittelhirns unbeeinflusst bleibt. Die Schlafrhythmik mit Tiefschlaf- und REM-Phasen wird daher nicht verändert.

Aufgrund eines ausgeprägten First-pass-Effektes wird Chloralhydrat hauptsächlich in der Leber, aber auch im Gewebe und den Erythrozyten durch die Alkoholdehydrogenase in die eigentlich aktive Form, das Trichlorethanol, umgewandelt. Zu einem geringeren Teil entsteht aus diesem Trichlorethanol auch die unwirksame Trichloressigsäure. Trichlorethanol wird zum größten Teil in der Leber glukuronidiert und als Urochloralsäure ausgeschieden. (Fachinfo, September 1997)

In Tabelle 29 werden die Literaturdaten aus Gold (1997), Waters (1999), aus der RTECS Datenbank und aus der IARC Bewertung (Vol.: 63, 1995, p. 245) zur Genotoxizität und Mutagenität von Chloralhydrat dargestellt.

Tabelle 29: Chloralhydrat

AMES:	CA:	Mikrokern:	SCE:
positiv Gold, 1997	positiv Waters, 1999	positiv Waters, 1999	positiv RTECS, 2001-4
Waters, 1999 RTECS, 2001-4	fraglich IARC Vol.: 63, 1995	IARC Vol.: 63, 1995 RTECS, 2001-4	fraglich IARC Vol.: 63, 1995

Chloralhydrat wird nach der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) mit der Entstehung von Lungenkrebs in Verbindung gebracht.

Die Adduktanalyse mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren fiel für die untersuchten Konzentrationen von 50 $\mu\text{g/mL}$ und 500 $\mu\text{g/mL}$ Chloralhydrat in Rattenleberschnitten negativ aus (Abbildung 55).

Der Ausfall der Positivkontrollen in der Adduktanalyse wird in der Abbildung 56 dokumentiert.

In allen Chromatogrammen sind einzelne Spots zu erkennen, die als I-Compounds zu deuten sind und nicht auf die Behandlung mit Chloralhydrat zurückzuführen sind. Dies lässt sich dadurch unterstützen, dass dieselben Spots auch in der Negativkontrolle zu finden sind.

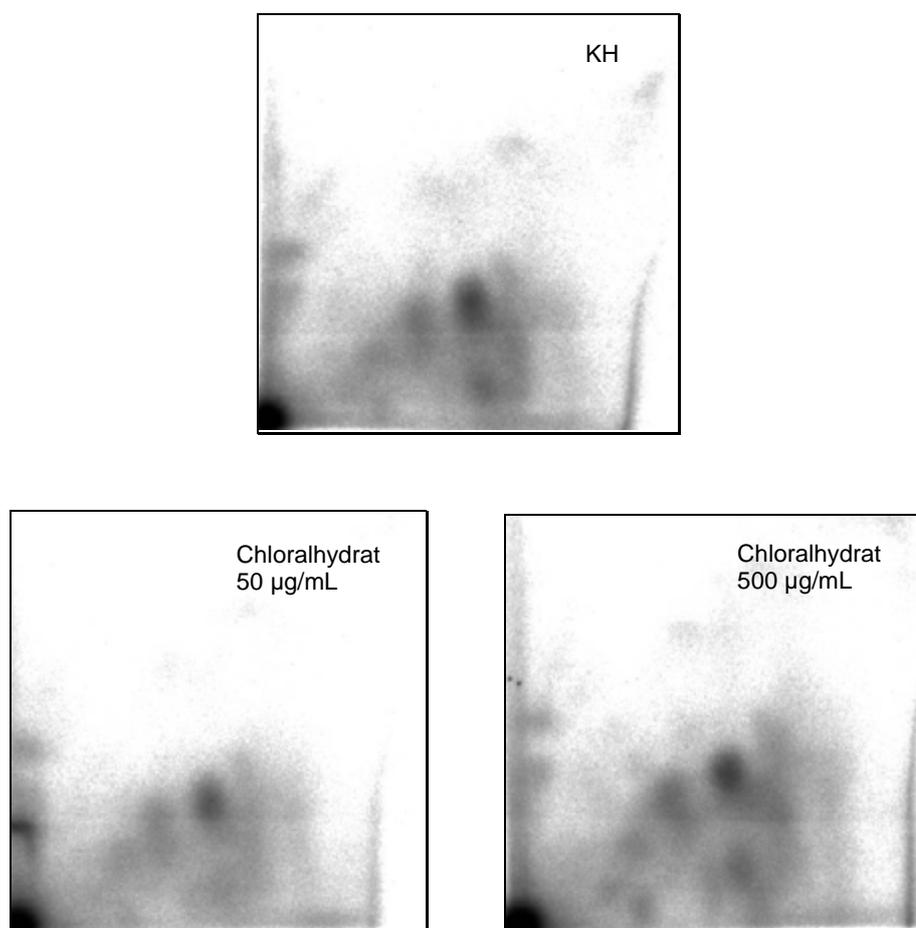


Abbildung 55: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH (Rattenleber, w.), von Chloralhydrat 50 $\mu\text{g/mL}$ (Rattenleber, w.) und von Chloralhydrat 500 $\mu\text{g/mL}$ (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Proben zu erkennen.

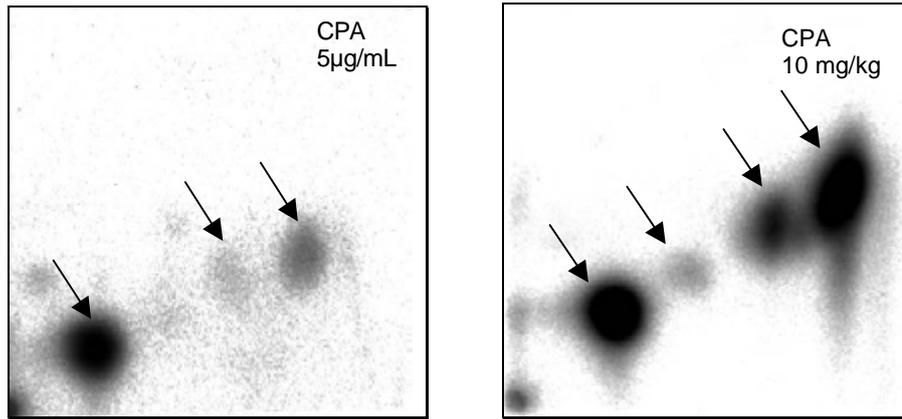
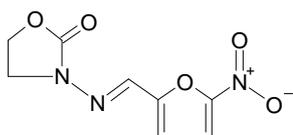


Abbildung 56: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Chloralhydrat über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 15 Minuten. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe sichtbar.

Furazolidon:

Handelsname: Nifuran

Furazolidon ist ein Breitbandantibiotikum gegen grampositive und gramnegative Bakterien (Staphylokokken, Streptokokken, Clostridien, Salmonellen, Shigellen, E.coli, Klebsiellen) und ein Anti-Protozoenmittel (gegen Trichomonaden und Coccidien). Furazolidon gehört in die Gruppe der Nitrofurane, welche als essentielle Struktur-Wirkungs-Voraussetzung eine Nitrogruppe in Position 5 des Furanringes besitzen. Es wird im Darm durch mikrobielle Reduktasen unter Bildung wirksamer reaktiver Intermediate zu inaktiven Metaboliten abgebaut. Dadurch entfaltet dieser Wirkstoff eine therapeutische antimikrobielle Wirkung im Darmlumen und wird daher auch als Hohlraumtherapeutikum bezeichnet.

Es wird angenommen, dass der bakteriostatische Effekt bei niedrigen Wirkstoffspiegeln ($< 10 \mu\text{g/mL}$) auf eine gestörte Energiebilanz und einer Beeinträchtigung der Protein- und Nucleinsäuresynthese zurückzuführen ist. Bakterizidie resultiert bei höheren Konzentrationen aus einer Schädigung der DNA in Form von Doppelstrangbrüchen. Als auslösender molekularer Mechanismus werden reduktive Veränderungen der 5-Nitrogruppe angenommen.

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse zur Genotoxizität und Mutagenität aus der Literatur (Snyder, 2001), aus der RTECS Datenbank und der IARC Bewertung (Vol.: 31, 1983, p. 141) findet sich für Furazolidon in Tabelle 30.

Tabelle 30: Furazolidon

AMES:	CA:	SCE:	UDS:
positiv Snyder, 2001 IARC Vol.: 31, 1983 RTECS, 2000-1	positiv Snyder, 2001	positiv Snyder, 2001 RTECS, 2000-1	positiv IARC Vol.: 31, 1983 RTECS, 2000-1

Furazolidon wird in der Literatur von van den Eeden (1995) mit der Entstehung von zervikalem Krebs in Beziehung gesetzt.

Im ^{32}P -Postlabeling-Verfahren wurden in den Konzentrationen von 1, 5 und $10 \mu\text{g/mL}$ Furazolidon keine Addukte detektiert (Abbildung 57). Die Ergebnisse der Positivkontrollen im ^{32}P -Postlabeling-Verfahren werden in der Abbildung 58 wiedergegeben.

Auf den Chromatogrammen der behandelten Leberschnitte sind einzelne Spots zu erkennen, die als nicht substanzbedingt identifiziert werden können, da diese Spots ebenfalls in der Negativkontrolle auftreten.

In der Kaliumbestimmung fiel eine Cytotoxizität bei 20 und 50 µg/mL Furazolidon auf.

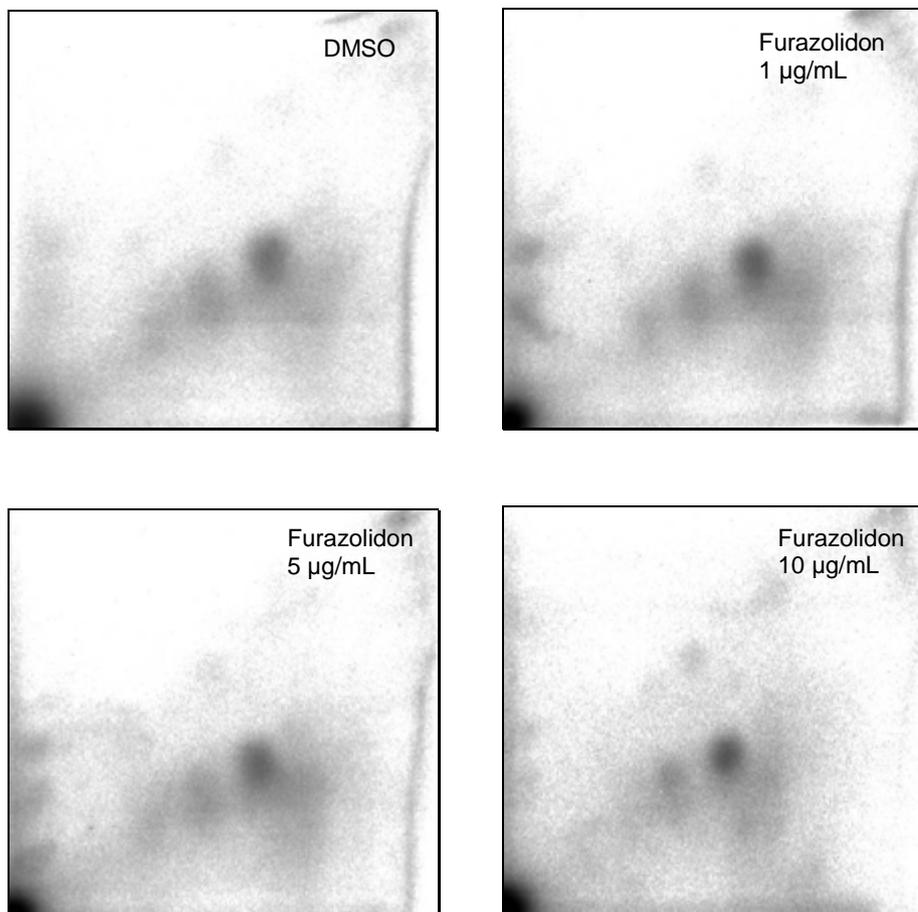


Abbildung 57: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Furazolidon 1 µg/mL (Rattenleber, w.) , von Furazolidon 5 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Furazolidon 10 µg/mL (Rattenleber, w.) Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Proben zu erkennen.

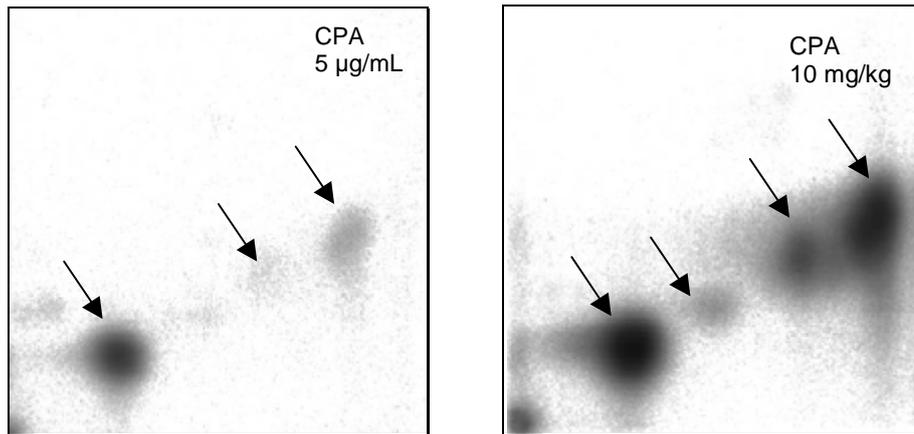
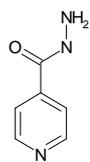


Abbildung 58: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Furazolidon über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten dauerte bei Raumtemperatur 15 Minuten. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe sichtbar.

Isoniazid (Isonikotinsäure-Hydrazid, INH):

Handelsnamen: u.a. Isoprodian , Isozid , Rifinah , Tebesium

Isoniazid dient der Chemotherapie der Tuberkulose in allen Formen und Stadien. Auch bei Erkrankungen durch sog. atypische Mykobakterien (Mykobakteriosen) wird Isoniazid je nach Empfindlichkeit der Erreger eingesetzt, sowie in der Kombinationsbehandlung der Lepra. INH wirkt auf Mykobakterien bakteriostatisch und bakterizid, letzteres vor allem bei proliferierenden Keimen. Sein Wirkungsmechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Am umfassendsten ist die Isonikotinsäure-(INS)-Hypothese. Danach wird INH intrabakteriell zu INS oxidiert und diese an Stelle von Nikotinsäure in das Nikotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) eingebaut, so dass NAD seine wasserstoffübertragende Funktion nicht mehr ausüben kann. Infolgedessen reichert sich Wasserstoffsuperoxid an, das die Bakterien schließlich irreversibel schädigt. Außerdem bewirkt INH Störungen des Zellwandausbaues der Erreger.

Die Hepatotoxizität von INH entsteht durch die Aktivierung seines Stoffwechselproduktes Hydrazin zum toxischen Wirkstoff durch das Cytochrom P-450-Monooxygenase-System der Leber. Unter INH-Behandlung kommt es zu einer erhöhten Ausscheidung von Pyridoxin. Die Neurotoxizität von INH beruht im Bereich des ZNS vermutlich in der Störung des gamma-Aminobuttersäure-(GABA)-Stoffwechsels. In hoher Dosierung hemmt INH die Glutamatdecarboxylase und führt dadurch zur Herabsetzung der GABA-Konzentration in verschiedenen Teilen des ZNS. Niedrigere INH-Dosen können durch Hemmung der GABA-Aminotransferase den GABA-Abbau vermindern und damit die GABA-Spiegel im ZNS erhöhen. Im Bereich des peripheren Nervensystems beruht die INH-Toxizität vielmehr in der Interferenz mit dem Pyridoxin-Stoffwechsel.

INH wird zu Azetyl-INH metabolisiert, Azetyl-INH wird weiter in INS und Monoazetylhydrazin umgebaut. Diese INH-Stoffwechsel-Produkte sind antimykobakteriell nicht wirksam (Fachinfo, August 1997).

Verschiedene Literaturdaten aus der IARC Bewertung (Supplement 7, 1987, p. 227) aus Gold (1997) und aus Henry (1998) werden zur Genotoxizität und Mutagenität von Isoniazid in der Tabelle 31 wiedergegeben:

Tabelle 31: Isoniazid

AMES:	CA:	Maus Lymphoma:	SCE:	UDS:
positiv Gold, 1997 IARC Suppl. 7, 1987	fraglich IARC Suppl. 7, 1987	negativ Henry, 1998	fraglich IARC Suppl. 7, 1987	negativ IARC Suppl. 7, 1987

In der Literatur sind mit Hilfe einer Chromatographie auf Partisil-10 ODSII DNA-Addukte aus *in vivo* Versuchen an Mäusen, die mit Isoniazid und Tritium markiertem Desoxycytidin behandelt wurden, detektiert worden (Maru, 1987). *In vitro* Reaktionen haben gezeigt, dass Isoniazid auch mit Cytosin-Resten in der DNA reagiert, und dass Einzelstrang Substrate, z.B. denaturierte DNA bzw. RNA, bessere Substrate sind als native DNA (Bhide, 1981).

Isoniazid wird nach der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) mit der Entstehung von Gallenblasenkrebs in Verbindung gebracht.

In dem eingesetzten ³²P-Postlabeling-Verfahren wurden bei Konzentrationen von 10 µg/mL und 100 µg/mL in Rattenleberschnitten keine Addukte gefunden (Abbildung 59). In Abbildung 60 werden die Chromatogramme der Positivkontrollen dargestellt.

Sowohl auf den Chromatogrammen der behandelten Leberschnitte, als auch auf dem Chromatogramm der Negativkontrolle sind einzelne Spots zu erkennen, die als Pseudo-Addukte beurteilt werden können. Diese Spots sind unabhängig von der Substanzbehandlung.

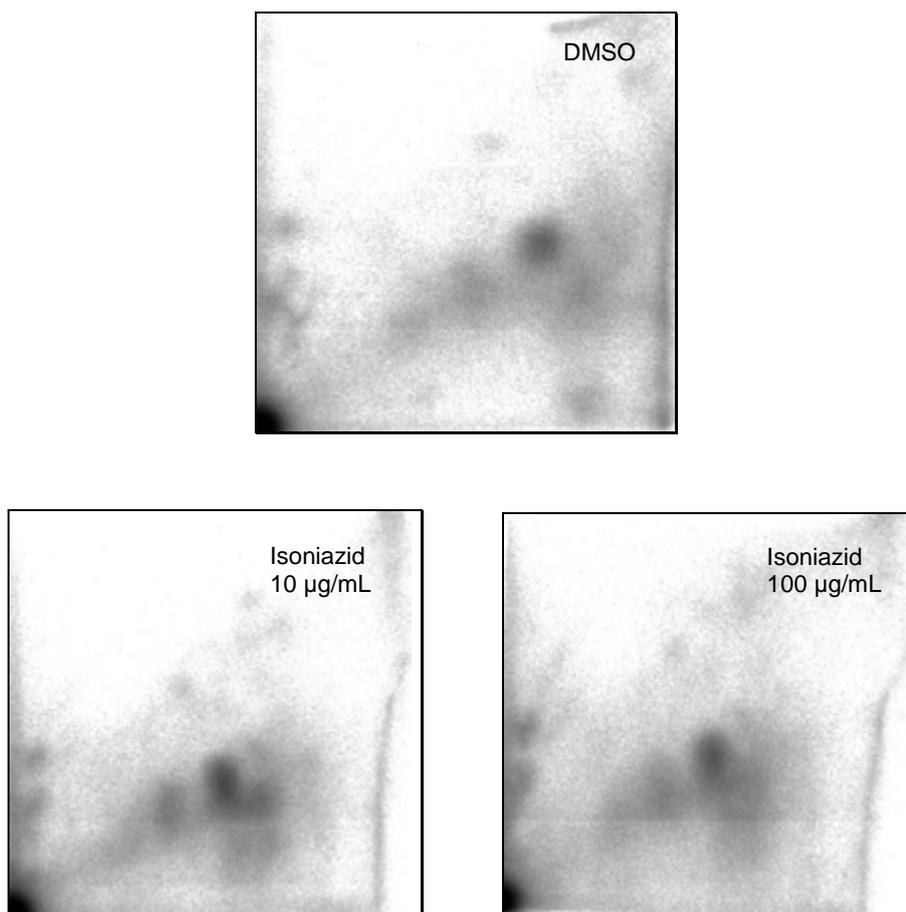


Abbildung 59: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Isoniazid 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Isoniazid 100 µg/mL (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte wurden in 12- well-Platten 6 Stunden lang bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden mit Hilfe der Nuklease P1 angereichert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt befindet sich in der unteren linken Ecke.

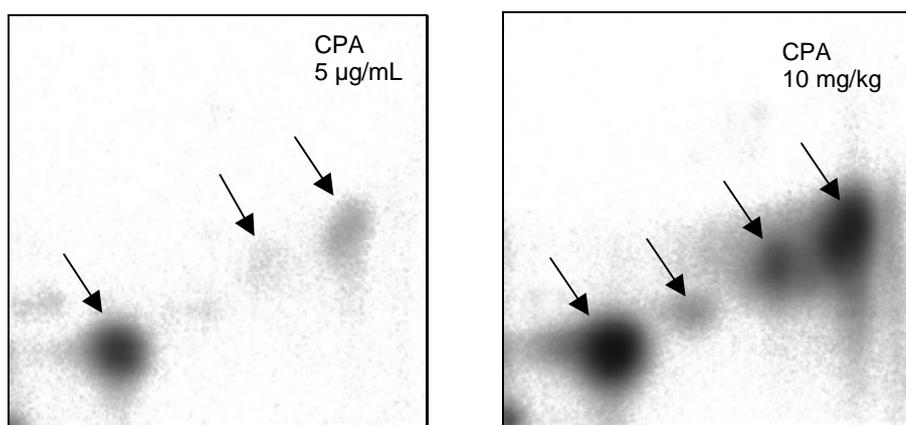
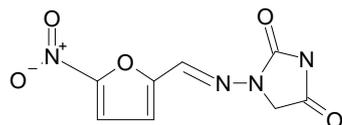


Abbildung 60: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Isoniazid über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 15 Minuten. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe sichtbar.

Nitrofurantoin:

Handelsnamen: u.a. Furadantin , Nifurantin , Urospasmon

Nitrofurantoin ist ein synthetisches Harnwegs-Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Nitrofurane. Es wird zur Hohlraumdesinfektion der ableitenden Harnwege bei Infektionen durch Kolibakterien, Klebsiellen, Enterokokken, Enterobacter, Proteus und Staphylokokken eingesetzt. Die vorwiegend bakteriostatische Wirkung geht nicht von Nitrofurantoin selbst aus, sondern von dessen intramikrobiell gebildeten Metaboliten. Die Reduktionsmetaboliten führen durch Adduktbildung mit der DNA zu teilweise deletären Strangbrüchen und hemmen zahlreiche Stoffwechselaktivitäten durch Elektronenentzug (Fachinfo, September 1993). Seine Wirksamkeit ist an das Vorliegen eines pH-Wertes von < 5,5 gebunden. Nitrofurantoin wirkt neuro-, hepato- und pulmotoxisch.

Literaturdaten zur Genotoxizität und Mutagenität von Nitrofurantoin werden aus, Henry (1998), aus Lee (1996) aus Snyder (2001), aus der RTECS Datenbank und aus der IARC Bewertung (Vol.: 50, 1990, p. 211) entnommen und in der Tabelle 32 zusammengefasst:

Tabelle 32: Nitrofurantoin

AMES:	CA:	Maus Lymphoma:	SCE:	UDS:
positiv Lee, 1996 Snyder, 2001 RTECS, 2000-1	positiv Snyder, 2001 IARC Vol.: 50, 1990	positiv Henry, 1998 Snyder, 2001	positiv IARC Vol.: 50, 1990 RTECS, 2000-1	negativ IARC Vol.: 50, 1990

Nitrofurantoin wird nach der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) mit der Entstehung von Lippenkrebs in Verbindung gebracht.

Nitrofurantoin zeigte im eingesetzten ³²P-Postlabeling-Verfahren bei Konzentrationen von 5, 10 und 20 µg/mL in Rattenleberschnitten keine Addukte (Abbildung 61). Auch in Affenleberschnitten wurden bei Konzentrationen von 5 und 10 µg/mL keine Addukte detektiert. Das Adduktmuster der Positivkontrollen wird in der Abbildung 62 dargestellt.

In den Chromatogrammen der behandelten Schnitten sind einzelne Spots zu erkennen, die auch in den Negativkontrollen auftreten und daher als I-Compounds beschrieben werden können.

Bei Konzentrationen von 50 und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde anhand der Kaliumbestimmung eine Cytotoxizität in den Rattenleberschnitten festgestellt. Aus diesem Grund wurden die mit diesen Konzentrationen behandelten Leberschnitte nicht mit dem ^{32}P -Postlabeling Verfahren untersucht.

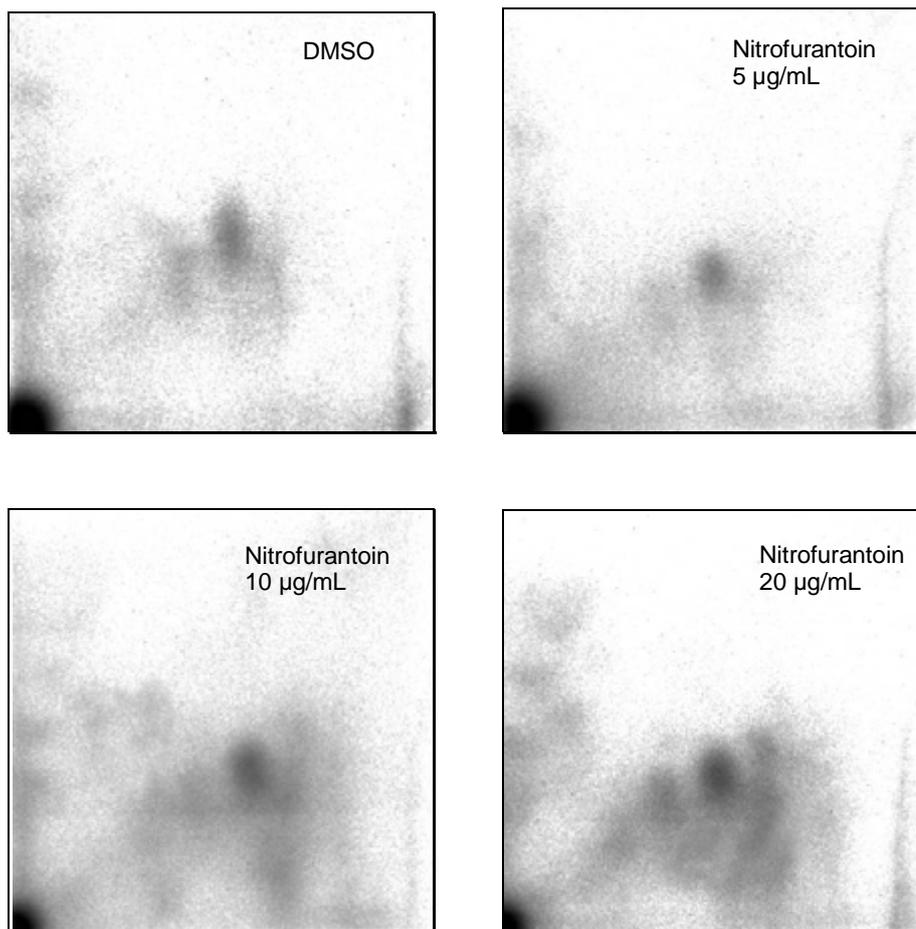


Abbildung 61: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO, von Nitrofurantoin 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, von Nitrofurantoin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und von Nitrofurantoin 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (jeweils Rattenleber, w.)

Über 6 Stunden wurden die Leberschnitte in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der mit Pfeilen markierten Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten dauerte 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt zu erkennen.

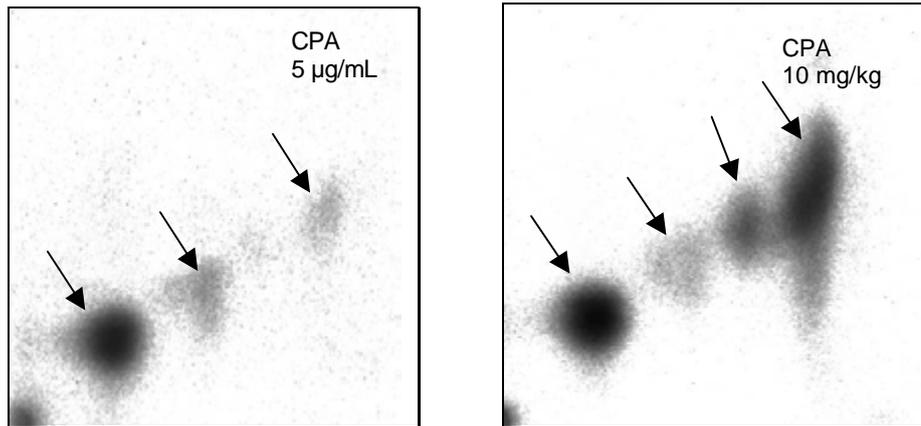
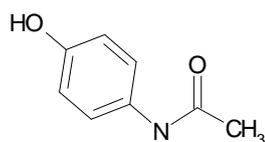


Abbildung 62: Adduktmuster der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Nitrofurantoin über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug bei Raumtemperatur 15 Minuten. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Probe zu erkennen.

Paracetamol (Acetaminophen):

Handelsnamen: u.a. Benuron , Captin , Doloreduct , Fensum

Paracetamol ist eine analgetisch und antipyretisch, jedoch sehr schwach antiphlogistisch wirkende Substanz. Der Wirkungsmechanismus ist nicht eindeutig geklärt. Nachgewiesen ist, dass durch Paracetamol eine deutlich stärkere Hemmung der zentralen als der peripheren Prostaglandinsynthese bewirkt wird. Ferner kommt es zu einer Hemmung des Effektes endogener Pyrogene auf das hypothalamische Temperaturregulationszentrum als wahrscheinliches Korrelat zur antipyretischen Wirkung. Die enzymatische Umformung erfolgt überwiegend in der Leber, in erster Linie durch direkte Konjugation mit Glukuron- und Schwefelsäure. In kleineren Mengen entstehen p-Aminophenol und das N-Hydroxiderivat, die in gewebe-toxische Chinonimine übergehen. Diese werden dosisabhängig durch Glutathion gebunden und über die Niere ausgeschieden.

Wird Paracetamol überdosiert (>10 g), so kommt es nicht nur zur Konjugation, sondern auch zur Oxidation. Das vermutete, instabile N-Acetylbenzochinonimin kann beim Vorhandensein reaktiver SH-Gruppen (Glutathion) mit diesen reagieren und zu atoxischem Mercapturat konjugiert werden. Bei Überlastung dieses Konjugationssystems kommt es aber zur kovalenten Bindung des instabilen Zwischenprodukts mit zellulären Makromolekülen (Proteine und DNA) und damit zum Zelltod von Leberzellen.

Tabelle 33 zeigt die aus der Literatur entnommenen Daten zur Genotoxizität und Mutagenität von Paracetamol / Acetaminophen:

Tabelle 33: Paracetamol / Acetaminophen

AMES:	CA:	Maus Lymphoma:	Mikrokern:	SCE:	UDS:
negativ Bergmann, 1996 Gold, 1997 Lee, 1996	positiv Bergmann, 1996 Müller, 2000	positiv Bergmann, 1996	positiv bei tox. Dosen Bergmann, 1996	positiv Bergmann, 1996	fraglich Bergmann, 1996

Van den Eeden beschreibt in seiner Veröffentlichung von 1995 einen Zusammenhang zwischen der Behandlung mit Paracetamol und vermehrt auftretendem Prostatakrebs.

Laut Prenez (1998) werden in Rattenhepatocyten mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren und Nuklease P1-Anreicherung nur DNA-Addukte gefunden, wenn unter Glutathiondepletion inkubiert wurde.

Diese Aussage unterstützt das vorliegende Ergebnis, denn bei einer Konzentration von 1,51 mg/mL wurden im ^{32}P -Postlabeling-Verfahren in Rattenleberschnitten keine Addukte gefunden (Abbildung 63). Die Chromatogramme der Positivkontrollen werden nachfolgend in der Abbildung 64 gezeigt.

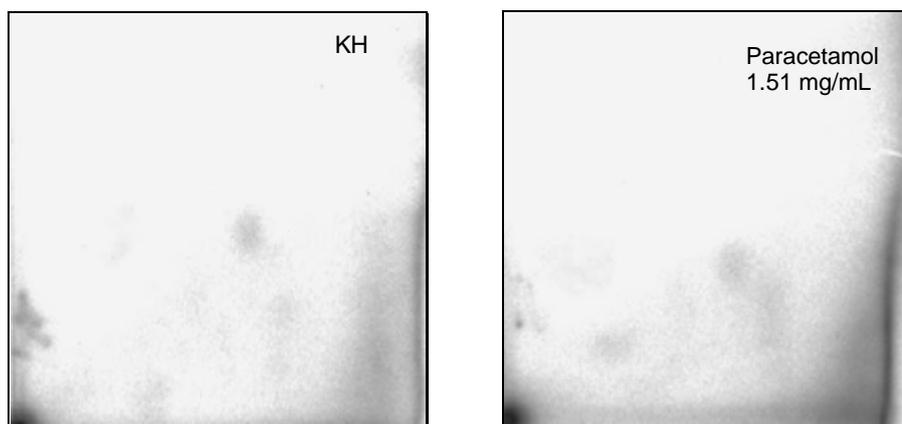


Abbildung 63: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH (Rattenleber, w.) und von Paracetamol 1,51 mg/mL (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Proben zu erkennen.

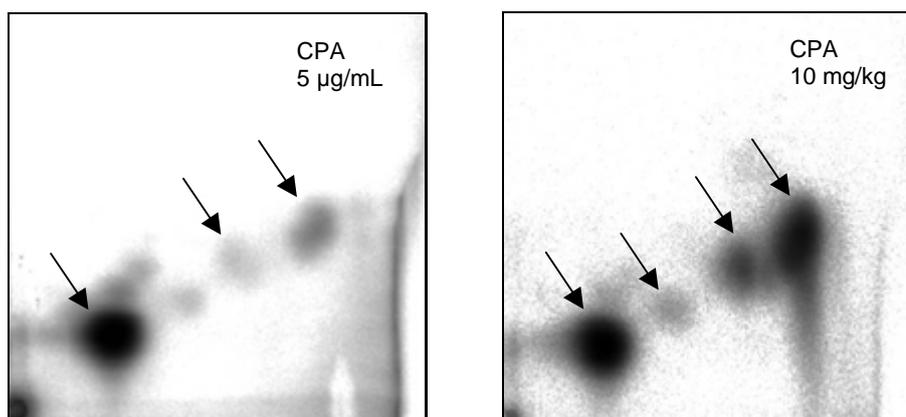
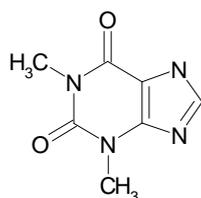


Abbildung 64: Chromatographische Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Paracetamol über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben wird in der linken unteren Ecke sichtbar.

Theophyllin:

Handelsnamen: u.a. Afonilum , Bronchoparat , Euphylong , Solosin

Theophyllin ist ein Bronchospasmolytikum und wird zur Akutbehandlung von Atemnotzuständen aufgrund von Einengung der Atemwege (Bronchokonstriktion) bei Asthma bronchiale und chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen eingesetzt. Theophyllin gehört zur Gruppe der Methylxanthine (Purin-Derivate). Das breite pharmakologische Wirkungsspektrum umfaßt:

Wirkungen auf das respiratorische System, wie z.B. Relaxation der glatten Bronchialmuskulatur und der Pulmonalgefäße; Besserung der mukoziliären Clearance; Hemmung der Freisetzung von Mediatoren aus Mastzellen und anderen Entzündungszellen; Abschwächung der provozierten Bronchokonstriktion; Abschwächung der asthmatischen Sofort- und Spätreaktion; Verstärkung der Zwerchfellkontraktion.

Extrapulmonale Wirkungen, wie z.B. Minderung des Dyspnoeempfindens; Gefäßdilatation; Relaxation der glatten Muskulatur (z.B. Gallenblase, Gastro-Intestinaltrakt); Inhibierung der Kontraktilität des Uterus; positive Ino- und Chronotropie am Herzen; Stimulation der Skelettmuskulatur; Steigerung der Diurese; Stimulation von Sekretions- und Inkretionsorganen (z.B. vermehrte Salzsäuresekretion im Magen, verstärkte Freisetzung von Katecholaminen aus der Nebenniere).

Ausschlaggebend für die Wirksamkeit von Theophyllin ist der aus einer Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase oder einer Blockierung von Adenosin (A₁)-Rezeptoren resultierende Anstieg an intrazellulärem cAMP. Von cAMP in Gang gesetzte Folgereaktionen führen sowohl zu einer Relaxation der Bronchialmuskulatur als auch zu einer Hemmung der Ausschüttung von Mediator-substanzen aus Mastzellen und Leukozyten.

Die Elimination von Theophyllin erfolgt durch Biotransformation in der Leber und renale Exkretion. Die Hauptmetaboliten sind 1,3-Dimethyl-Harnsäure (40%), 3-Methyl-Xantin (36%) und 1-Methyl-Harnsäure (17%); (Salyers, 1994). Davon ist das 3-Methyl-Xantin pharmakologisch aktiv, jedoch ist diese Aktivität schwächer als die von Theophyllin.

Literaturdaten zur Genotoxizität und Mutagenität von Theophyllin werden in der Tabelle 34 zusammengefasst:

Tabelle 34: Theophyllin

AMES:	CA:	Mikrokern:	SCE:	UDS:
negativ Kim, 1999 Waters, 1999 IARC, Vol.: 51, 1991	negativ Kim, 1999 IARC, Vol.: 51, 1991 (humane Zellen)	negativ IARC, Vol.: 51, 1991	positiv RTECS, 2001-4 IARC, Vol.: 51, 1991	positiv RTECS, 2001-4
positiv RTECS, 2001-4	positiv Waters, 1999 IARC, Vol.: 51, 1991 (Tierzellen in vitro)	positiv Kim, 1999 Waters, 1999		

Theophyllin zeigte im ^{32}P -Postlabeling-Verfahren in Rattenleberschnitten bei Testkonzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ keine DNA-Addukte (Abbildung 65). In der Abbildung 66 wird das Adduktmuster der Positivkontrollen verdeutlicht.

Auf allen Chromatogrammen sind einzelne Spots zu erkennen, die sich gleichen. Hierbei handelt es sich um I-Compounds, die nicht mit der Substanzbehandlung in Verbindung stehen, sondern u.a. auf die Ernährung und das Alter der Ratten zurückzuführen sind.

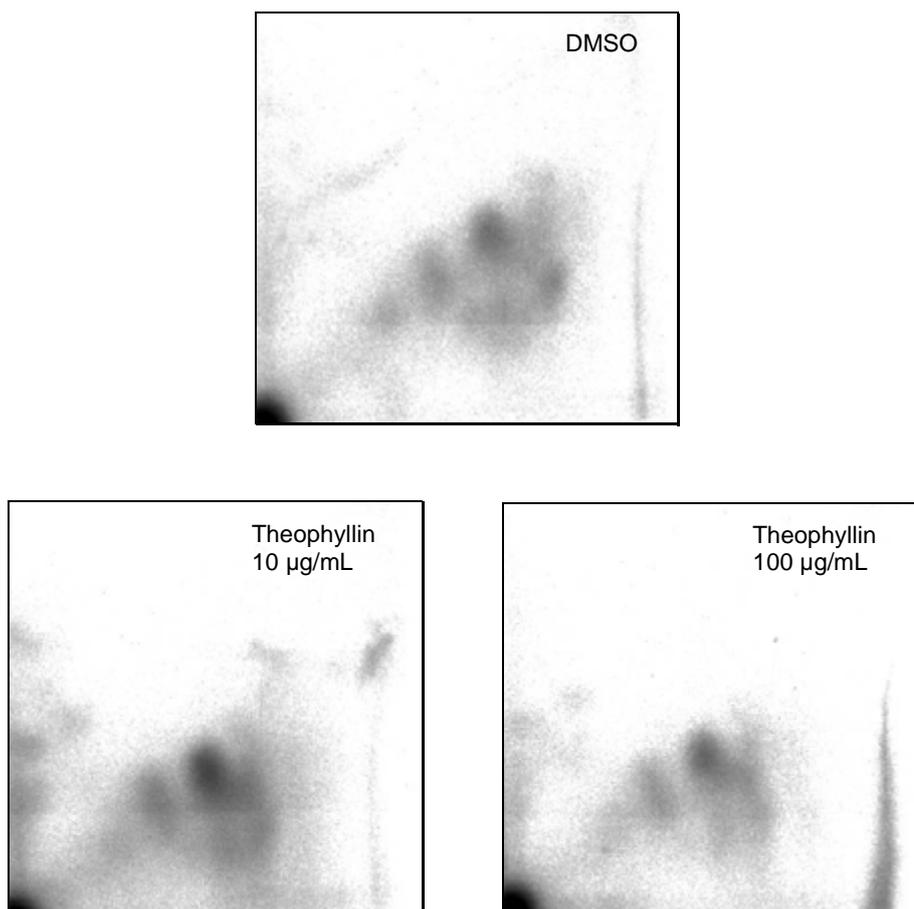


Abbildung 65: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Theophyllin 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Theophyllin 100 µg/mL (Rattenleber, w.)
 Die Leberschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung erfolgte mit Hilfe der Nuklease P1-Methode. 16 Stunden wurden die Imaging-Platten bei Raumtemperatur exponiert. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt der Proben zu erkennen.

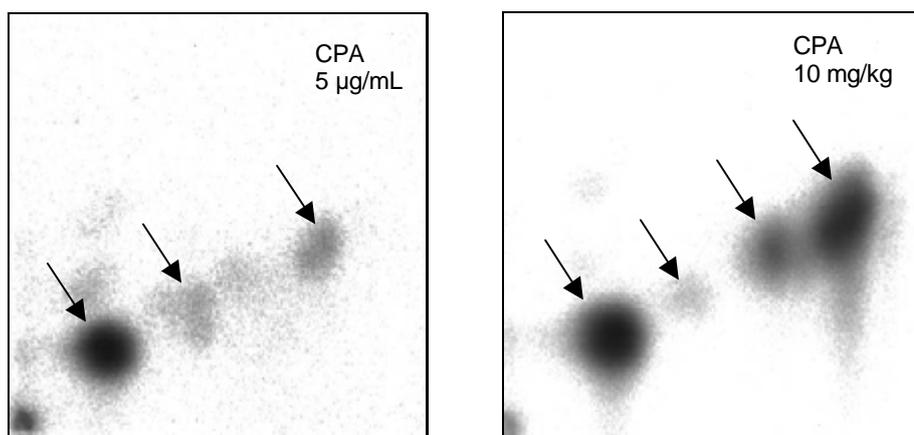


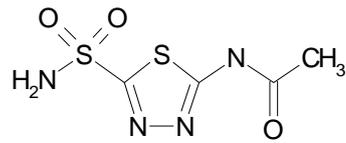
Abbildung 66: Adduktmuster der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)
 Bei der *in vitro*-Positivkontrolle inkubierten die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Theophyllin über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. In der linken unteren Ecke wird der Auftragspunkt der Probe sichtbar.

4.1.3 Ergebnisse der Gruppe 3

Substanzen, die in DEREK aufgrund spezieller Substrukturen einen Kanzerogenitäts- oder Mutagenitätsverdacht aufwiesen bzw. in der epidemiologischen Literatur (van den Eeden, 1995) mit einem entsprechenden Verdacht berichtet wurden. Die Steroide wurden zusätzlich aufgrund der Strukturanalogie zu CPA ausgewählt und untersucht.

Tabelle 35: DEREK positive Substanzen bzw. Substanzen mit berichtetem Verdacht von van den Eeden

Substanz:	CAS-Nummer:	Mol.Gewicht: [g/mol]	gelöst in:	untersuchte Konzentrationen: [µg/mL]
Acetazolamid	59-66-5	222	DMSO	10; 20; 50; 100
Chlorpromazin Hydrochlorid	69-09-0	355	KH	5; 10; 50; 100
Clindamycin Hydrochlorid	21462-39-5	461	KH	50; 500
Gentamicinsulfat	105-41-0	Gemisch	KH	5; 50
Phenylephrin Hydrochlorid	61-76-7	204	DMSO	10; 100
Procainamid Hydrochlorid	614-39-1	272	KH	10; 100
Promethazin Hydrochlorid	58-33-3	321	DMSO	5; 10; 20; 50; 100
Propranolol Hydrochlorid	318-98-9	296	KH	5; 10; 50; 100
STEROIDE:				
Fluocinolonacetonid	67-73-2	452	DMSO	10; 100
Hydrocortison	50-23-7	362	DMSO	50; 100; 500; 1000
Kaliumcanrenoat	2181-04-6	397	KH	0.2; 20; 200; 398; 3.98 mg/ml
Medryson	2668-66-8	344	DMSO	10; 40; 80
Triamcinolon	124-94-7	394	DMSO	4; 40

Acetazolamid:

Handelsnamen: Diamox , Glaupax

Acetazolamid ist ein Inhibitor der Carboanhydrase und kommt bei der Behandlung von Glaukomen, Ödemen verschiedener Genese, Ateminsuffizienz mit respiratorischer Azidose, Epilepsie, Hirnödemen und Morbus Meniere zum Einsatz. Aufgrund der Hemmung der Carboanhydrase wird die tubuläre Rückresorption von Bicarbonationen stark eingeschränkt und es kommt zur vermehrten Ausscheidung von Natrium- und Kaliumionen. Außerdem wird eine hyperchlorämische Azidose ausgebildet. Im Auge führt Acetazolamid zu einer Reduzierung des Bicarbonatgehaltes im Kammerwasser, wodurch der intraokulare Druck gesenkt wird. Die Ausscheidung von Acetazolamid erfolgt fast vollständig ohne wesentliche Metabolisierung über die Niere (glomerulär und tubulär).

In der Literatur und auch in der RTECS Datenbank sind keine Daten zur Genotoxizität und Mutagenität zu finden.

In DEREK besteht für Acetazolamid ein Warnhinweis für Kanzerogenität und Mutagenität aufgrund des aromatischen Amids. Des weiteren ist das Aryl-Sulphonamid verantwortlich für einen Verdacht auf Schilddrüsentoxizität und auf Hyperplasie des Harnblasenurothels.

Laut der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) wird Acetazolamid mit der Entstehung von Endometriumkrebs und lymphatischen Leukämien in Verbindung gebracht.

Acetazolamid zeigte im ³²P-Postlabeling-Verfahren in Rattenleberschnitten bei einer Konzentration von 100 µg/mL im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMSO) ein positives Ergebnis. Es wurde ein Addukt detektiert (Abbildung 67). Der Adduktspiegel lag bei der Konzentration von 100 µg/mL nach Abzug der Negativkontrolle bei 13 Addukte/10⁹ Nukleotide.

Die DNA-Addukt-Analyse in Rattenleberschnitten bei Konzentrationen von 10, 20 und 50 µg/mL (Abbildung 67) fiel mit der ³²P-Postlabeling-Methode negativ aus.

Allerdings sind bei allen Chromatogrammen Spots festzustellen, die als I-Compound beschrieben werden können, da sie auch in der Negativkontrolle auftauchen und so nicht im Zusammenhang mit der zu untersuchenden Substanz stehen. Die Chromatogramme der Positivkontrollen werden in der Abbildung 68 dargestellt.

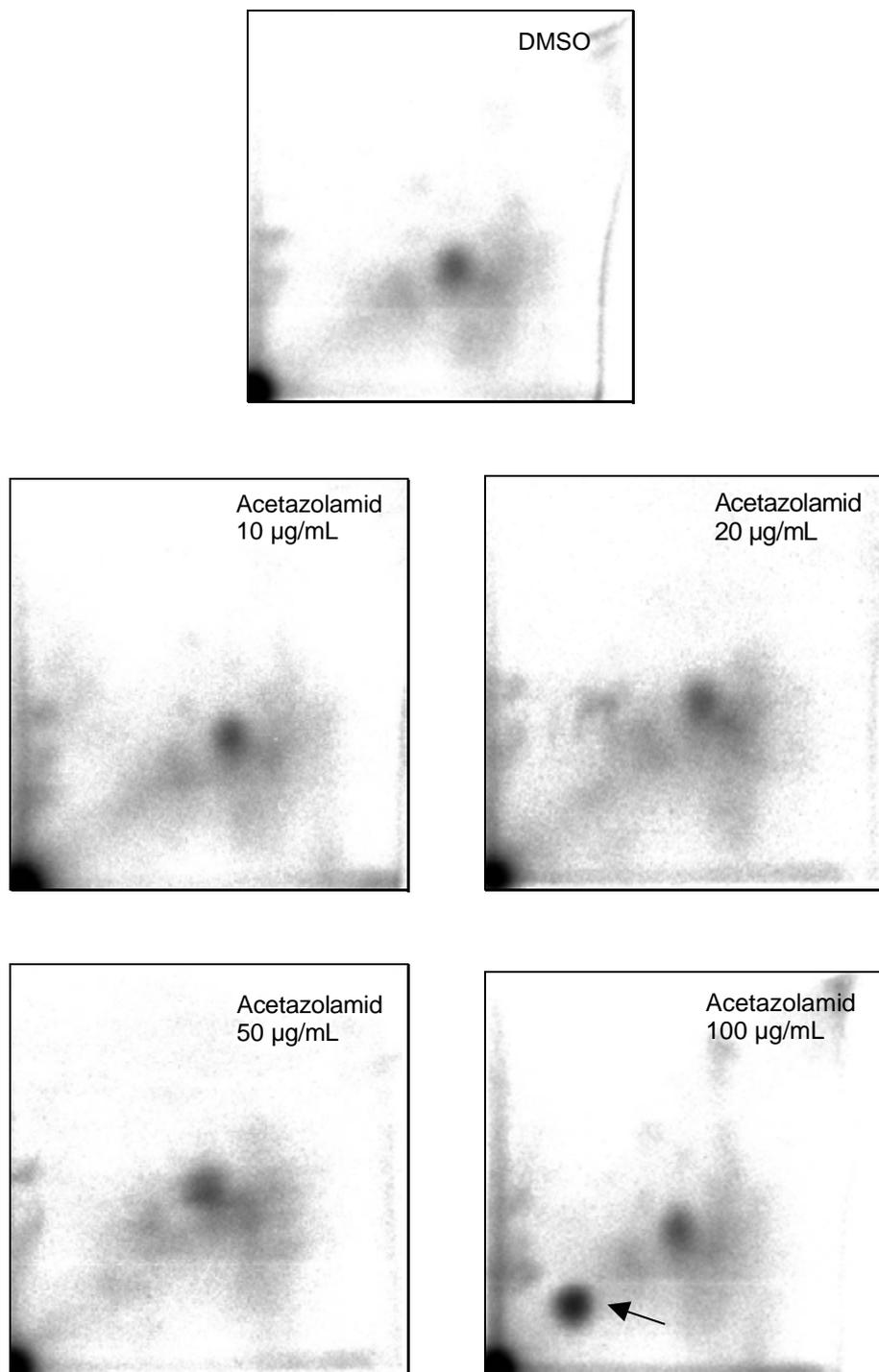


Abbildung 67: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO, von Acetazolamid 10 µg/mL, von Acetazolamid 20 µg/mL, von Acetazolamid 50 µg/mL und von Acetazolamid 100 µg/mL in Leberschnitten weiblicher Ratten. Die Schnitte wurden in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

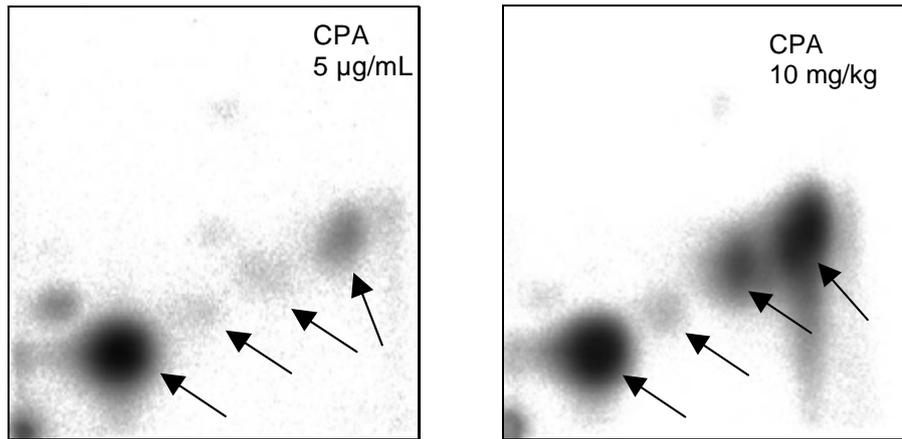


Abbildung 68: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Acetazolamid die Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Zur Anreicherung der Addukte wurde bei beiden Positivkontrollen die Nuklease P1-Methode angewandt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

In Affenleberschnitten (männlich und weiblich) wurden in der DNA-Addukt-Analyse bei Konzentrationen von 100 und 200 µg/mL keine Addukte detektiert (Abbildung 69 und Abbildung 71). Die chromatographischen Ergebnisse der jeweiligen Positivkontrollen werden in der Abbildung 70 und der Abbildung 72 dokumentiert.

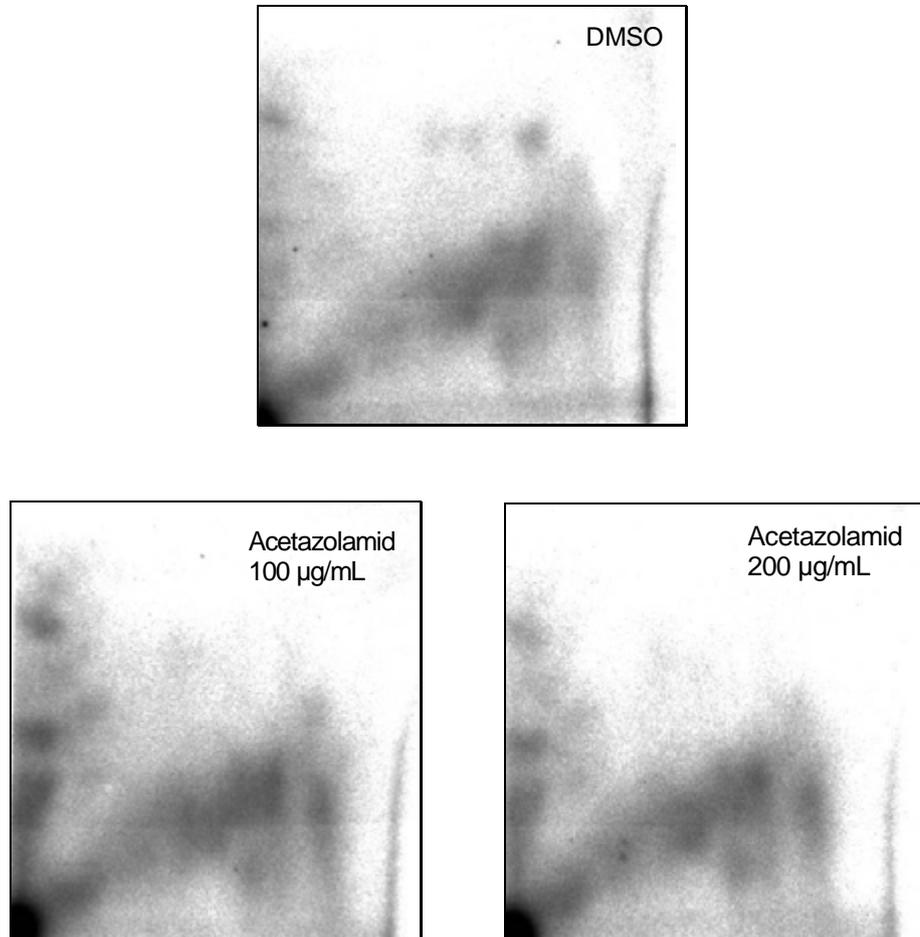


Abbildung 69: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO, von Acetazolamid 100 µg/mL und von Acetazolamid 200 µg/mL. Die Leberschnitte des männlichen Affen wurden in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke ist der Auftragspunkt erkennbar.

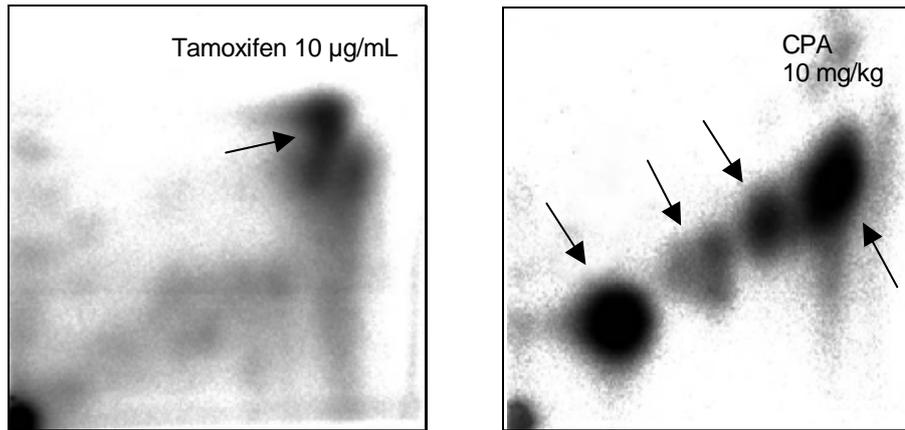


Abbildung 70: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Acetazolamid die Affenleberschnitte (m.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten betrug bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben befindet sich in der unteren linken Ecke.

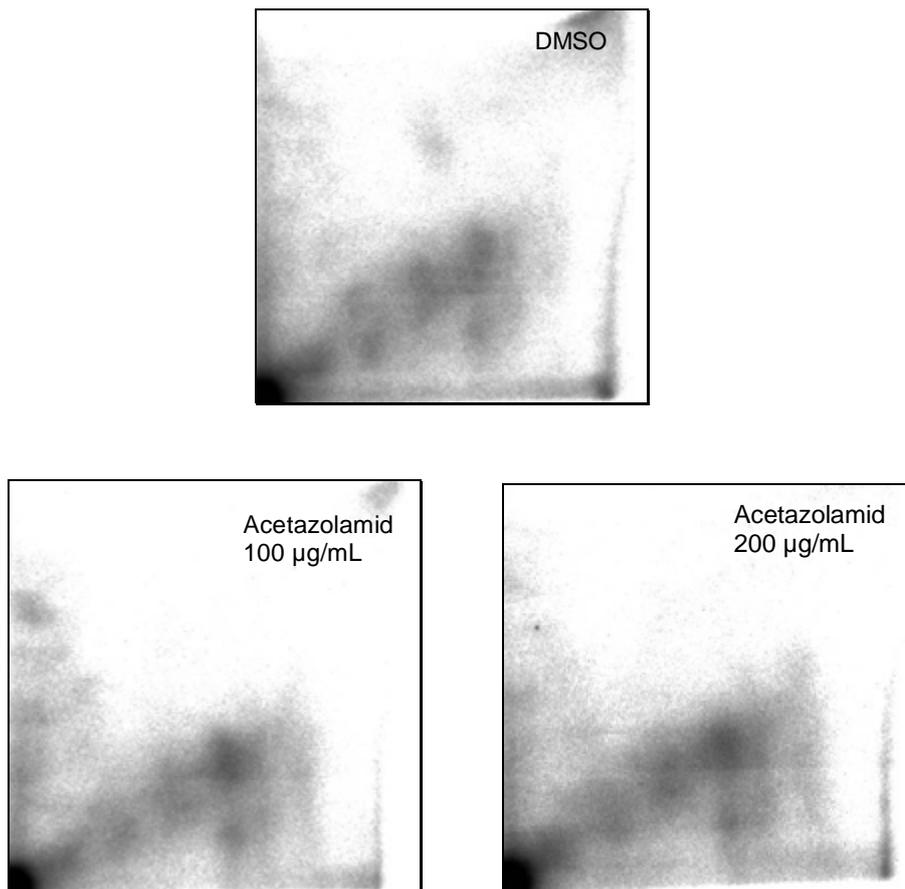


Abbildung 71: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO, von Acetazolamid 100 µg/mL und von Acetazolamid 200 µg/mL

Die Leberschnitte des weiblichen Affen inkubierten in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Addukt-Anreicherung erfolgte mit der Nuklease P1-Methode. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

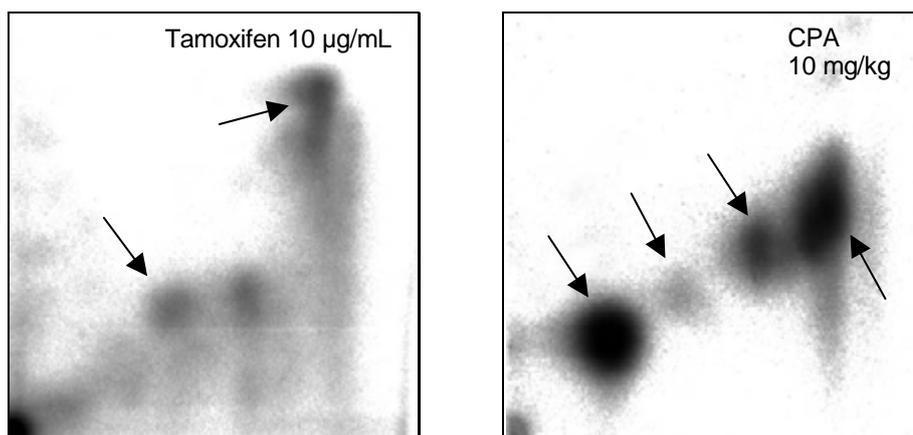


Abbildung 72: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Acetazolamid die Affenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten betrug bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben ist in der unteren linken Ecke sichtbar.

Da es sich bei Acetazolamid um einen Carboanhydrase-Antagonist handelt, wurden weitere Versuche mit Nierenschnitten durchgeführt, um einem weiteren Zielorgan dieser Substanz Rechnung zu tragen.

In Nierenschnitten von männlichen und weiblichen Affen wurden mit dem ³²P-Postlabeling-Verfahren bei Acetazolamid Konzentrationen von 100 und 200 µg/mL keine Addukte gefunden (Abbildung 73 und Abbildung 75).

Tamoxifen, hier als positive *in vitro* Kontrolle eingesetzt, fiel in männlichen Affennierenschnitten ebenfalls negativ aus (Abbildung 74). In weiblichen Affennierenschnitten fiel Tamoxifen schwach positiv aus (Abbildung 76).

In der Kaliumbestimmung war nur bei den männlichen Affennierenschnitten eine Cytotoxizität bei den Acetazolamid Konzentrationen von 100 und 200 µg/mL zu verzeichnen. Allerdings werden die Chromatogramme trotzdem abgebildet, um einen Vergleich mit den Chromatogrammen der weiblichen Affennierenschnitte ziehen zu können.

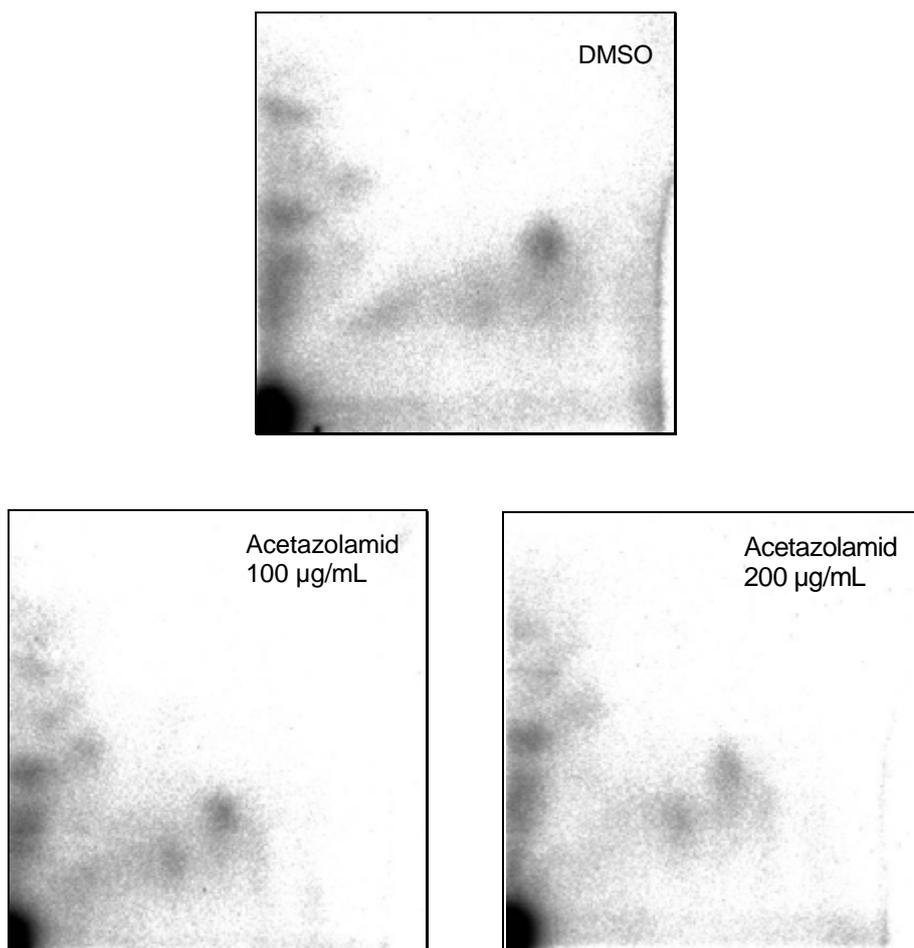


Abbildung 73: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Affenniere, m.), von Acetazolamid 100 µg/mL (Affenniere, m.) und von Acetazolamid 200 µg/mL (Affenniere, m.)

Die Nierenschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung erfolgte mit Hilfe der Nuklease P1-Methode. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

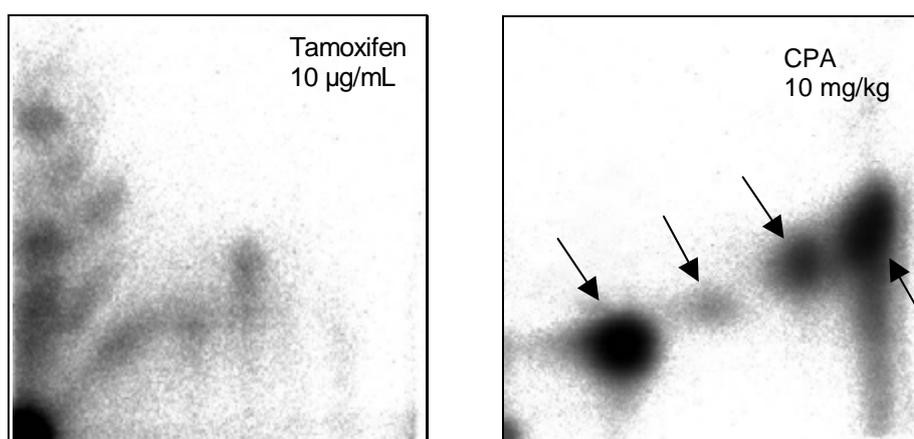


Abbildung 74: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Acetazolamid die Affennierenschnitte (m.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten betrug bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

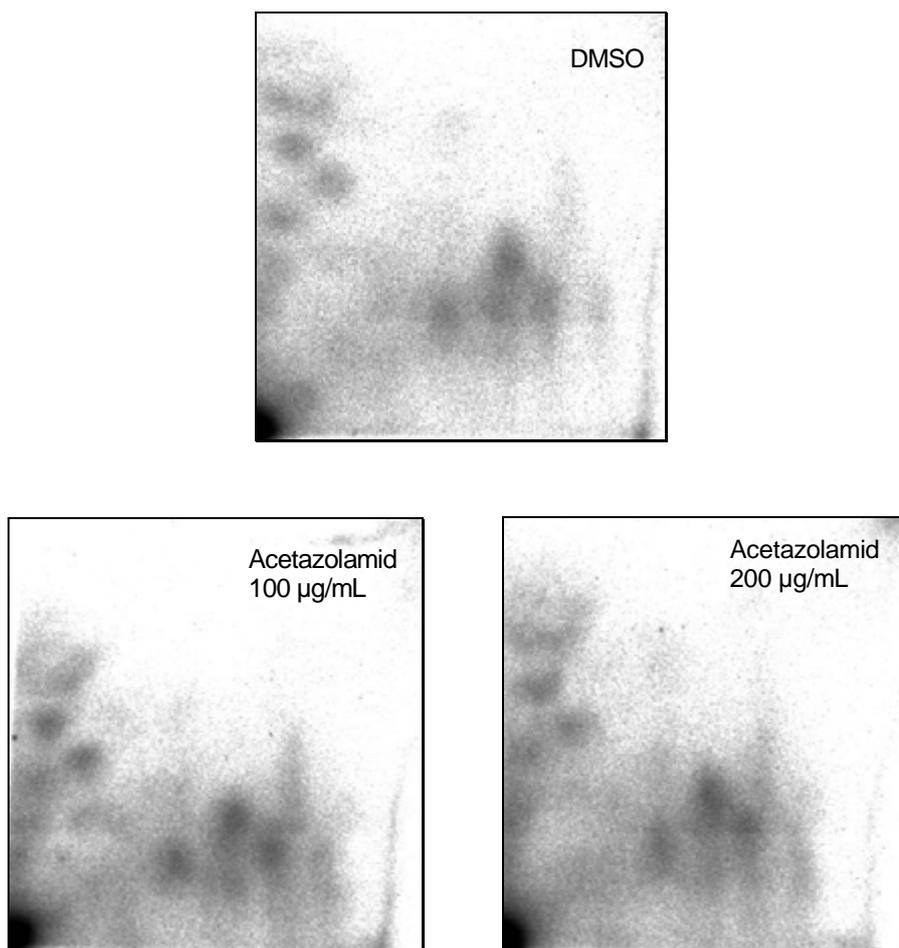


Abbildung 75: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Affenniere, w.), von Acetazolamid 20 µg/mL (Affenniere, w.) und von Acetazolamid 50 µg/mL (Affenniere, w.)

Die Nierenschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung erfolgte mit Hilfe der Nuklease P1-Methode. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

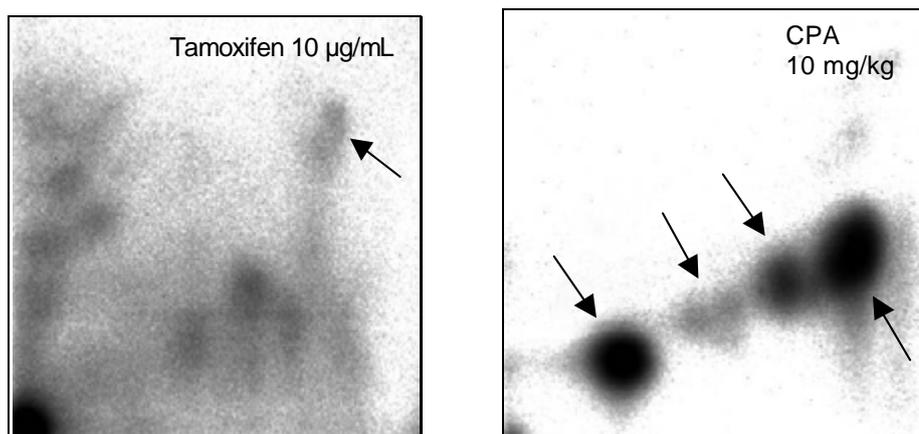
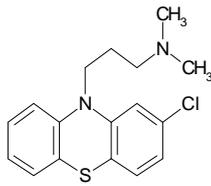


Abbildung 76: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Acetazolamid die Affennierenschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten betrug bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Chlorpromazin Hydrochlorid:

ClH

Handelsname: Propaphenin

Chlorpromazin (früher Megaphen) wurde 1952 als erstes antipsychotisches Neuroleptikum in die Therapie eingeführt. Es wirkt ferner zentral dämpfend, antiemetisch, lokalanästhetisch, ganglienblockierend, anticholinergisch, adrenolytisch und antihistaminisch. Es stört ferner die Wärmeregulation durch Beeinflussung des Wärmezentrums.

Die Indikationen liegen bei hebephrenen Schizophrenien, schizophrenen Endzuständen, Singultus, juckenden Dermatosen und kontrollierten Hypothermien. Chlorpromazin wird als Phenothiazin-Derivat intensiv verstoffwechselt. Durch N-Dealkylierung der Seitenkette entstehen noch wirksame Metaboliten, während den Sulfoxiden nur noch eine schwache Wirkung zukommt. Daneben finden aromatische Hydroxylierung an den Benzen-Ringen sowie oxidative Deaminierung und Oxidation am Stickstoff der Seitenkette statt. Die Metaboliten (bis zu 40 bekannte) werden größtenteils als Glucuronide renal über den Darm ausgeschieden.

In der Literatur (RTECS, November, 2001-4) ist ein positiver Ames Test beschrieben.

Chlorpromazin Hydrochlorid wird in DEREK als karzinogen und als photoallergieauslösend beurteilt. Diese DEREK-Warnungen werden mit dem aromatischen Amin und mit der halogenierten aromatischen Verbindung erklärt. Bei den ausgewählten Konzentrationen von 5 und 10 µg/mL wurden im ³²P-Postlabeling-Verfahren in Rattenleberschnitten keine Addukte detektiert.

In der Kaliumbestimmung fiel eine Cytotoxizität bei Konzentrationen von 50 und 500 µg/mL auf.

Zur Verdeutlichung der negativen Ergebnisse folgen im Anschluss die Bilder der Chromatogramme der Negativkontrolle, sowie die Chromatogramme der untersuchten Substanz (Abbildung 77) mit den dazugehörigen Positivkontrollen (Abbildung 78).

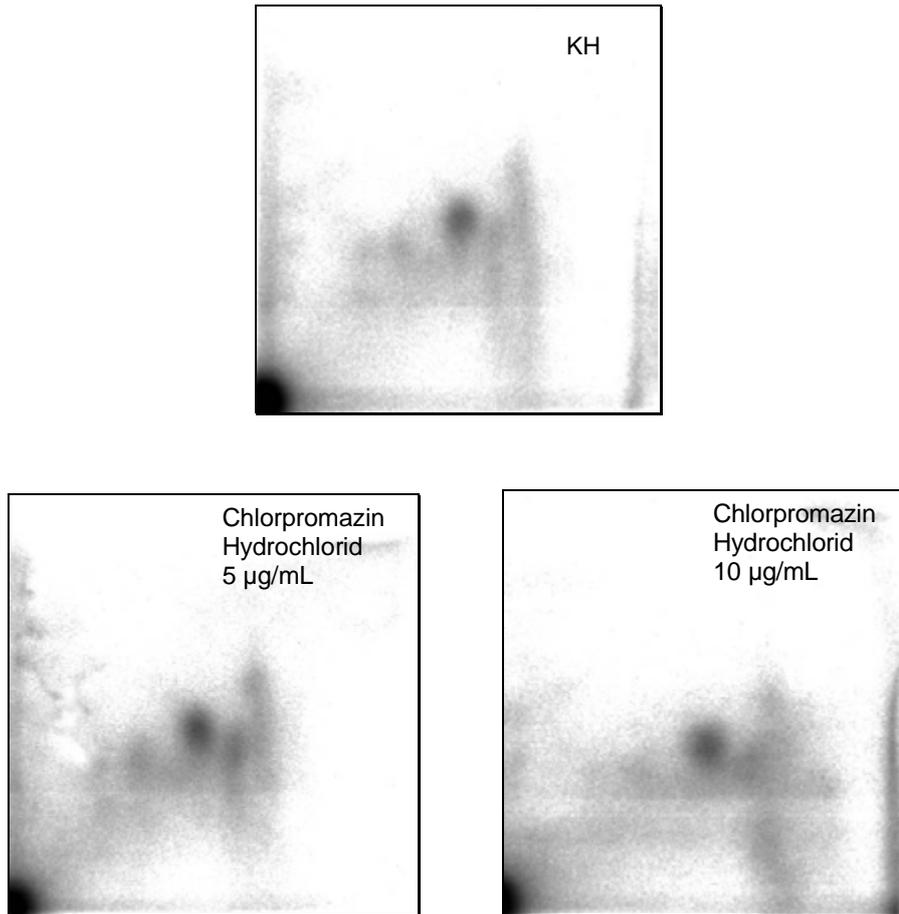


Abbildung 77: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH, von Chlorpromazin Hydrochlorid 5 µg/mL und von Chlorpromazin Hydrochlorid 10 µg/mL. Die Leberschnitte von weiblichen Ratten wurden in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

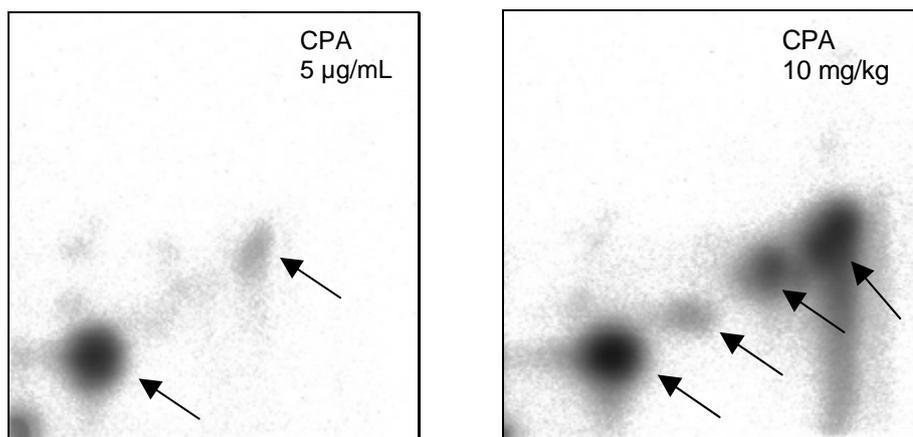
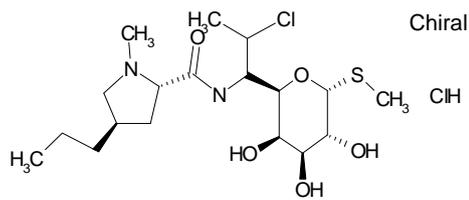


Abbildung 78: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg). Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog der zu untersuchenden Substanz Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Zur Anreicherung der Addukte wurde bei beiden Positivkontrollen die Nuklease P1-Methode angewandt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Clindamycin Hydrochlorid:

Handelsnamen: u.a. Aclinda , Clindahexal , Sobelin

Clindamycin gehört in die Gruppe der Antibiotika und ist ein halbsynthetisches Derivat des Lincomycins. Eingesetzt wird Clindamycin gegen akute und chronische bakterielle Infektionen durch Clindamycin-empfindliche Erreger, wie z.B. bei Infektionen der Knochen und Gelenke, des HNO-Bereiches, des Zahn- und Kieferbereiches, der tiefen Atemwege, des Becken- und Bauchraumes, der weiblichen Geschlechtsorgane, der Haut und Weichteile, bei Scharlach, Septikämie und Endokarditis.

Es wirkt durch die Hemmung der ribosomalen Proteinsynthese überwiegend bakteriostatisch und in Abhängigkeit von der Konzentration am Ort der Infektion und von der Empfindlichkeit der Erreger bakterizid.

In der Literatur und auch in der RTECS Datenbank sind keine Daten zur Genotoxizität und Mutagenität vorhanden.

In der DEREK-Beurteilung erhielt Clindamycin Hydrochlorid jeweils eine Warnung auf Karzinogenität, Mutagenität und Hautsensibilisierung. Die Kanzerogenität und die Mutagenität wird mit dem alkylierenden Agens begründet, wohingegen sich der Verdacht auf Hautsensibilisierung auf das Haloalkan stützt.

Nach der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) wird Clindamycin mit der Entstehung von Brust- und Magenkrebs assoziiert.

Clindamycin Hydrochlorid zeigte im ^{32}P -Postlabeling-Verfahren bei Konzentrationen von 50 und 500 $\mu\text{g/mL}$ in Rattenleberschnitten keine DNA-Addukte (Abbildung 79). Der Ausfall der positiven Kontrollen (*in vitro* und *in vivo*) wird in der Abbildung 80 verdeutlicht.

Auffällig war in der Kaliumbestimmung eine Cytotoxizität bei der Clindamycin Hydrochlorid Konzentration von 500 $\mu\text{g/mL}$.

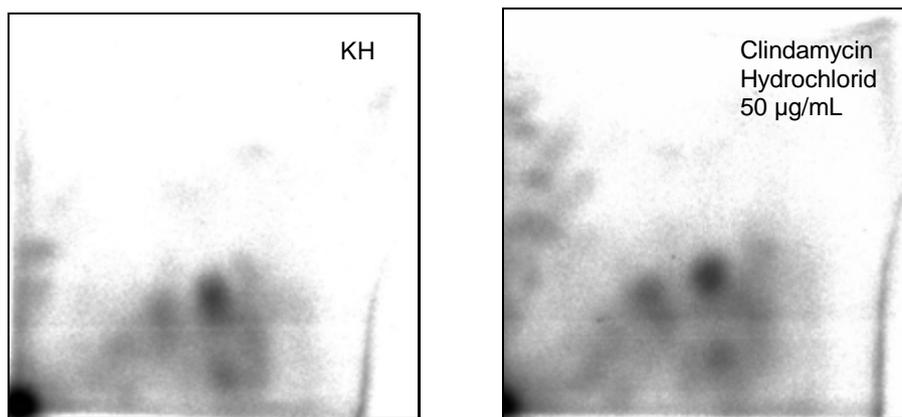


Abbildung 79: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH und von Clindamycin Hydrochlorid 50 µg/mL
Die Leberschnitte von weiblichen Ratten wurden in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

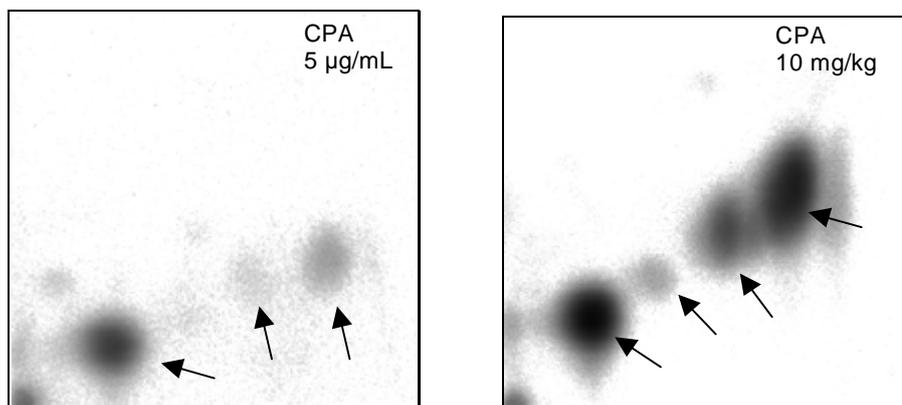
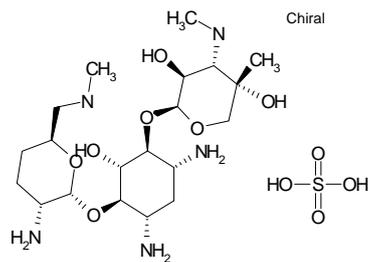


Abbildung 80: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)
Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Clindamycin Hydrochlorid Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Zur Anreicherung der Addukte wurde bei beiden Positivkontrollen die Nuklease P1-Methode angewandt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Gentamicinsulfat:

Handelsnamen: u.a. Dispagent , Gencin , Refobacin

Gentamicin ist ein aus *Micromonospora purpurea* gewonnenes Aminoglykosid-Antibiotikum. Es stellt ein Gemisch aus den strukturell sehr ähnlichen Homologen Gentamicin C₁, C_{1a} und C₂ dar. Das Gentamicin-Homologe C₂ gilt als die Komponente mit der größten Toxizität gegenüber Prokaryonten.

Der Einsatz von Gentamicin erstreckt sich auf Behandlungen von schweren Infektionen, die durch Gentamicin-empfindliche Erreger verursacht wurden. Diese sind z.B. Infektionen der Harn- und Geschlechtsorgane, nosokomiale Pneumonien, Endokarditis, intraabdominale Infektionen, nosokomiale Sepsis, Meningitis durch gramnegative Erreger, Osteomyelitis und eitrige Arthritis.

Gentamicin besitzt eine bakterizide Wirksamkeit sowohl in Proliferations-, als auch im Ruhestadium der Bakterien. Die Proteinsynthese der Bakterien wird dadurch gehemmt, dass sich Gentamicin an die 30S-Untereinheiten der Ribosomen bindet und diese dadurch sterisch so verändert, dass weder die Initiation der Proteinsynthese noch die Fertigstellung begonnener Peptide (Elongation) ausgeführt werden kann. Darüber hinaus verursacht Gentamicin Ablesefehler des Codes auf der mRNA. Als Nebenwirkungen sind u.a. die nephro- und ototoxische Wirkung von Gentamicin zu beachten.

In der Literatur und auch in der RTECS Datenbank sind keine Daten zur Genotoxizität und Mutagenität von Gentamicinsulfat vorhanden.

Gentamicinsulfat wird nach der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) mit der Entstehung von myeloischen Leukämien in Beziehung gesetzt.

Gentamicinsulfat zeigte im ³²P-Postlabeling-Verfahren bei Konzentrationen von 5 und 50 µg/mL in Rattenleberschnitten keine DNA-Addukte (Abbildung 81).

Alle Chromatogramme weisen einheitlich einige Spots auf, die als I-Compound beschrieben werden können. Da sie auch in der Negativkontrolle zu finden sind, werden diese Spots als nicht substanzbedingt beurteilt.

Die chromatographischen Ergebnisse der im Versuch mitgeführten Positivkontrollen werden in der Abbildung 82 wiedergegeben.

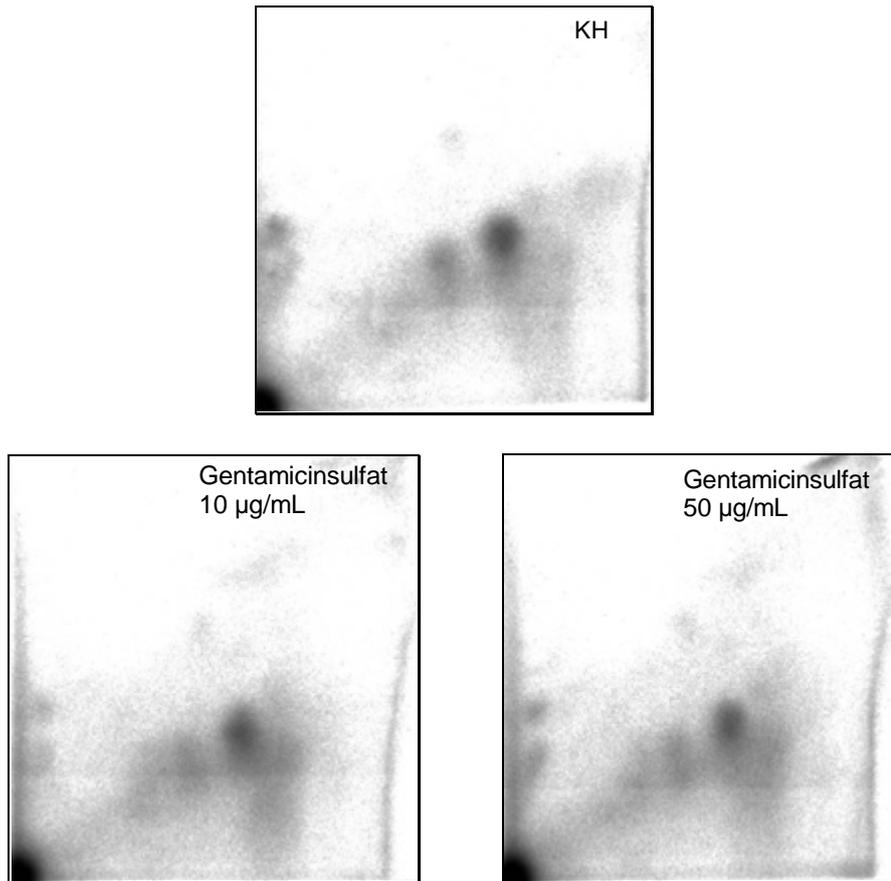


Abbildung 81: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH, Gentamicinsulfat 50 µg/mL und von Gentamicinsulfat 10 µg/mL. Die Leberschnitte von weiblichen Ratten inkubierten in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Anreicherung der Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

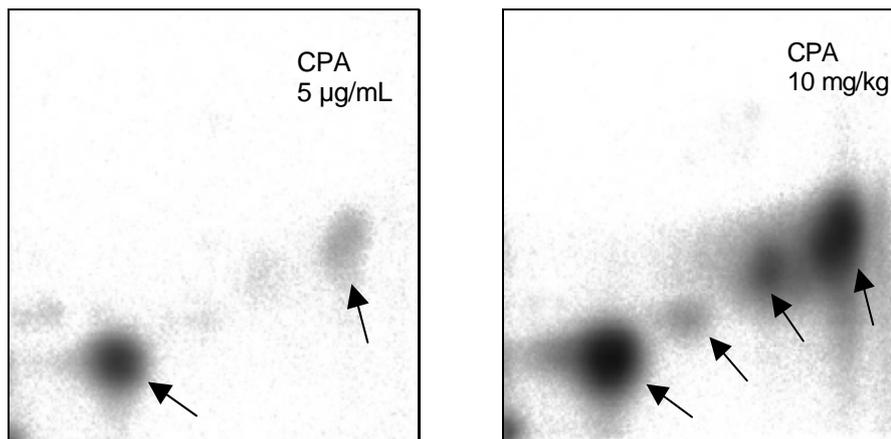
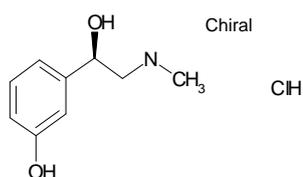


Abbildung 82: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg). Bei der *in vitro*-Positivkontrolle inkubierten analog zu Gentamicinsulfat die Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung. Die Anreicherung der Addukte erfolgte bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode. Die Imaging-Platten wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur exponiert. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Phenylephrine Hydrochlorid:

Handelsnamen: u.a. Vistosan

Phenylephrinhydrochlorid gehört in die Gruppe der α_1 -Sympathomimetika (α_1 -Rezeptoragonist) und wird als Vasokonstringens lokal eingesetzt. Es kommt zur raschen Linderung bei leichteren Reizungen des Auges, wie sie bei Heuschnupfen, Erkältung, Staub, Wind, Sonneneinwirkung, Rauch oder durch das Tragen von Kontaktlinsen zum Einsatz.

Phenylephrin weist nur eine geringe Lipidlöslichkeit auf und stellt bei physiologischem pH-Wert nur eine schwache Base dar. Es wird bereits im Hornhautepithel teilweise metabolisiert.

In der Literatur (Gold, 1997; Rosenkranz, 1999) wird ein negativer Ames Test berichtet.

Phenylephrine-Hydrochlorid wird aufgrund der DEREK-Beurteilung als kanzerogen und als hautsensibilisierend eingestuft. Die Kanzerogenität wird mit dem sekundären Amin und die Hautsensibilisierung mit der Phenolgruppe begründet. Die Untersuchungen von Phenylephrin-Hydrochlorid mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren ließen in Rattenleberschnitten bei Konzentrationen von 10 und 100 $\mu\text{g/mL}$ keine Addukte erkennen (Abbildung 83).

In dieser Abbildung weisen sämtliche Chromatogramme einen Spot auf, der aber nicht im Zusammenhang mit der zu testenden Substanz steht, sondern als Pseudo-Addukt (I-Compound) angesehen werden kann.

Die Ergebnisse der Positivkontrollen werden in Abbildung 84 wiedergegeben.

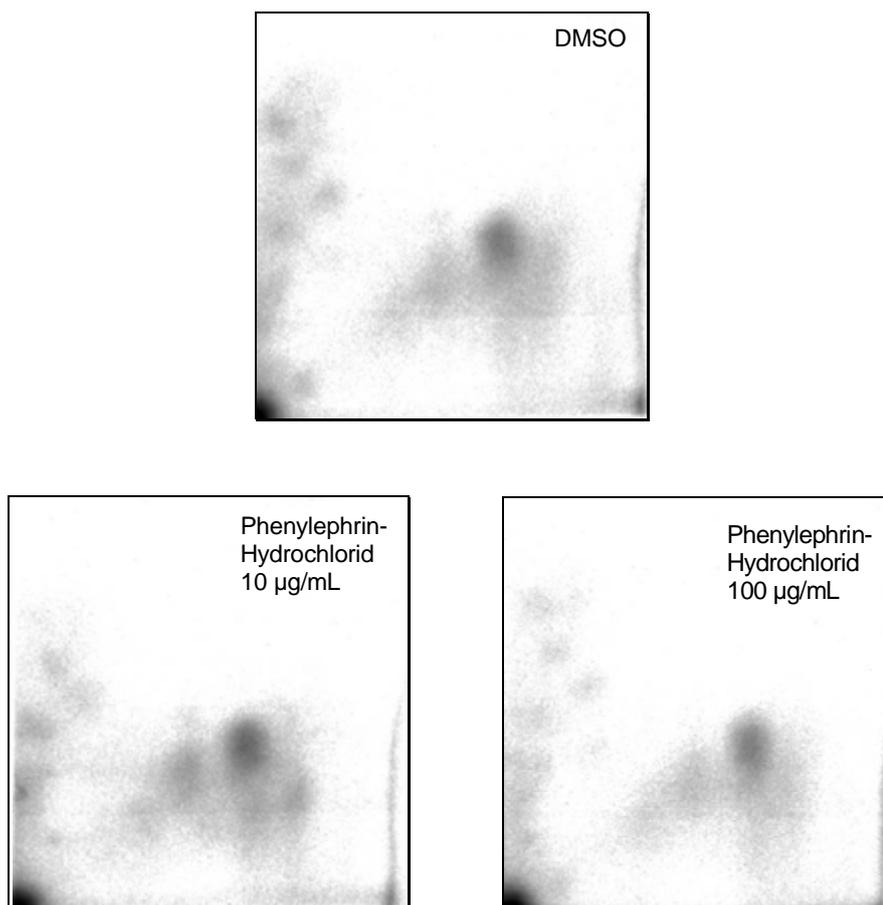


Abbildung 83: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO, von Phenylephrin Hydrochlorid 10 µg/mL und von Phenylephrin Hydrochlorid 100 µg/mL. Die Inkubation der Leberschnitte von weiblichen Ratten erfolgte in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Anreicherung der Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

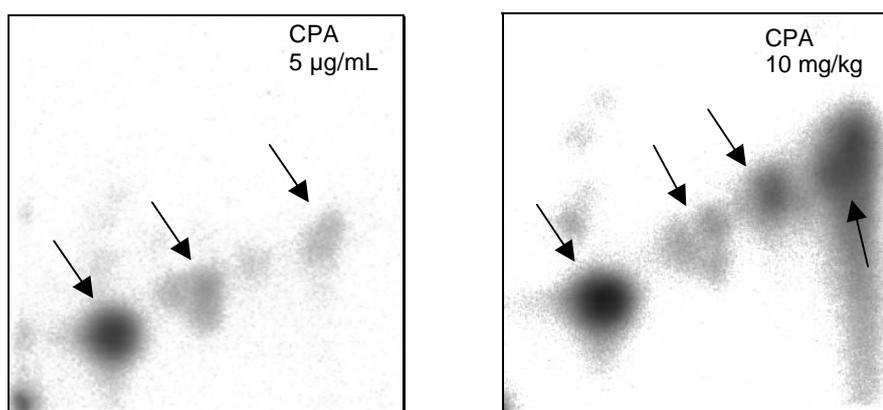
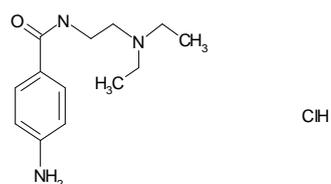


Abbildung 84: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg). Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Phenylephrin Hydrochlorid Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Zur Anreicherung der Addukte wurde bei beiden Positivkontrollen die Nuklease P1-Methode angewandt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Procainamid Hydrochlorid:

Handelsnamen: u.a. Procainamid Duriles

Procainamid Hydrochlorid ist ein Antiarrhythmikum und wird zur Behandlung von symptomatischen und behandlungsbedürftigen tachykarden supraventrikulären Herzrhythmusstörungen, wie z.B. AV-junktionale Tachykardien, supraventrikuläre Tachykardien bei WPW-Syndrom oder paroxysmale Vorhofflimmern angewendet. Außerdem werden auch schwerwiegende symptomatische ventrikuläre tachykarde Herzrhythmusstörungen und Dystrophia myotonica mit Procainamidhydrochlorid behandelt.

Die Literaturdaten zur Genotoxizität und Mutagenität beschränken sich auf einen negativen UDS Test (Martelli, 1997) und einen negativen Mikrokerntest (Mereto, 1995).

Bei Procainamid Hydrochlorid besteht laut DEREK aufgrund des aromatischen Amins ein Verdacht auf Karzinogenität und durch das primäre oder sekundäre Amin der Verdacht auf Hautsensibilisierung.

Van den Eeden beschreibt in seiner Veröffentlichung von 1995 einen Zusammenhang zwischen der Behandlung mit Procainamid Hydrochlorid und dem vermehrten Auftreten von Brustkrebs.

Die Adduktanalyse von Procainamid Hydrochlorid mit dem ³²P-Postlabeling-Verfahren ergab bei Konzentrationen von 10 und 100 µg/mL in Rattenleberschnitten ein negatives Ergebnis (Abbildung 85).

Die Ergebnisse der im Versuch verwendeten Positivkontrollen werden in Abbildung 86 dokumentiert.

Die in den Chromatogrammen der behandelten Rattenleberschnitte feststellbaren Spots finden sich auch in der Negativkontrolle wieder. Bei diesen Spots handelt es sich um I-Compounds.

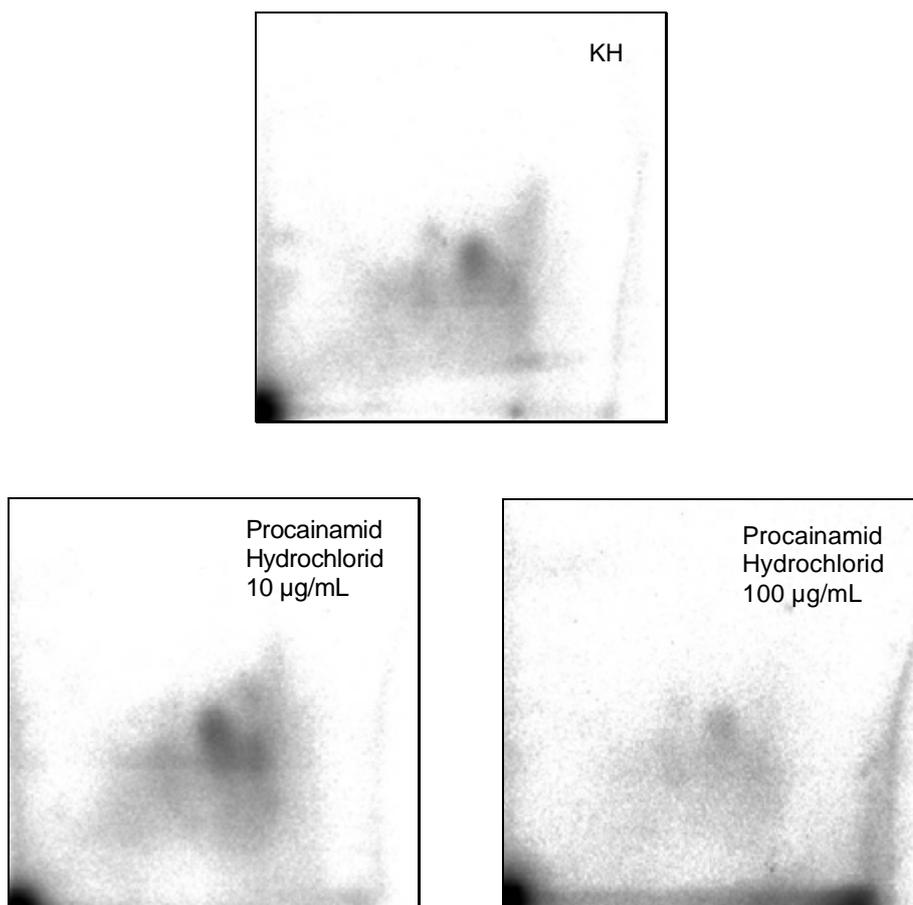


Abbildung 85: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH, von Procainamid Hydrochlorid 10 µg/mL und von Procainamid Hydrochlorid 100 µg/mL. Die Leberschnitte von weiblichen Ratten inkubierten in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Anreicherung der Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke liegt der Auftragspunkt.

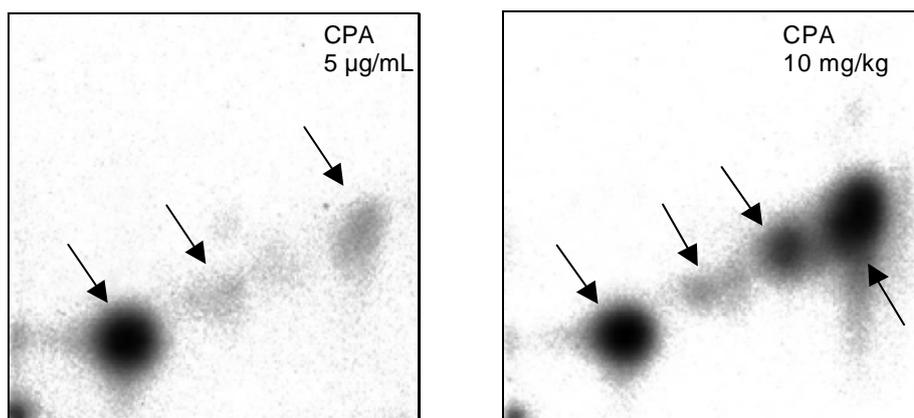
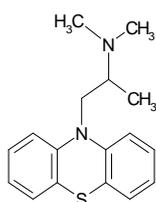


Abbildung 86: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg). Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Procainamid Hydrochlorid die Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Zur Anreicherung der Addukte wurde bei beiden Positivkontrollen die Nuklease P1-Methode angewandt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Promethazin Hydrochlorid:

ClH

Handelsnamen: u.a. Atosil , Closin , Prothazin

Promethazinhydrochlorid gehört in die Gruppe der Phenothiazine und wird zur Behandlung von allergischen Erkrankungen und von Unruhe- und Erregungszuständen eingesetzt. Dieses Phenothiazin-Derivat mit verzweigter basischer Seitenkette, ist ein potentes H₁-Antihistaminikum mit stark sedierender Wirkung, das keine antipsychotischen Eigenschaften besitzt. Es wirkt antihistaminerg, anticholinerg, antiseronerg und membranstabilisierend. Ferner blockiert es Alpha-Rezeptoren. Im Tierexperiment wirkt es nicht antagonistisch auf Dopaminrezeptoren und weist *in vitro* eine extrem geringe Affinität zu [³H]-Haloperidol-markierten Dopaminrezeptoren auf. Infolgedessen wird die Prolaktinsekretion nicht erhöht, die apomorphin- und amphetaminbedingte Hyperaktivität nicht gemindert, und es tritt keine Katalepsie und keine Hemmung des bedingten Fluchreflexes ein. Weiterhin wirkt Promethazinhydrochlorid auch antiemetisch (Fachinfo, Dezember 1999).

Daten zur Genotoxizität und zur Mutagenität von Promethazin Hydrochlorid wurden der Literatur (NTP, 1993; Rosenkranz, 1999; Snyder, 2001) entnommen und in Tabelle 36 zusammengestellt.

Tabelle 36: Promethazin Hydrochlorid

AMES:	CA:	SCE:	UDS:
negativ Snyder, 2001 NTP, 1993 Rosenkranz, 1999	negativ NTP, 1993	fraglich Snyder, 2001 NTP, 1993	negativ NTP, 1993

Promethazinhydrochlorid weist im DEREK-Programm durch das aromatische Amin einen Verdacht auf Kanzerogenität auf.

Laut der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) wird Promethazin Hydrochlorid mit der Entstehung von Leberkrebs in Verbindung gebracht.

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 87 und Abbildung 88) lassen die Chromatogramme der Adduktanalyse von Promethazinhydrochlorid und die zugehörigen Kontrollen erkennen. Die in verschiedenen Versuchen untersuchten Konzentrationen (5, 10 und 20 µg/mL) zeigten in den Adduktanalysen mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren keine Addukte.

Bei den erkennbaren Spots auf den Chromatogrammen handelt es sich um I-Compounds, da sie sowohl in den behandelten Schnitten als auch in der Negativkontrolle auftreten.

Bei der Kaliumbestimmung fiel eine Cytotoxizität bei den untersuchten Promethazin Hydrochlorid Konzentrationen von 50 und 100 µg/mL auf.

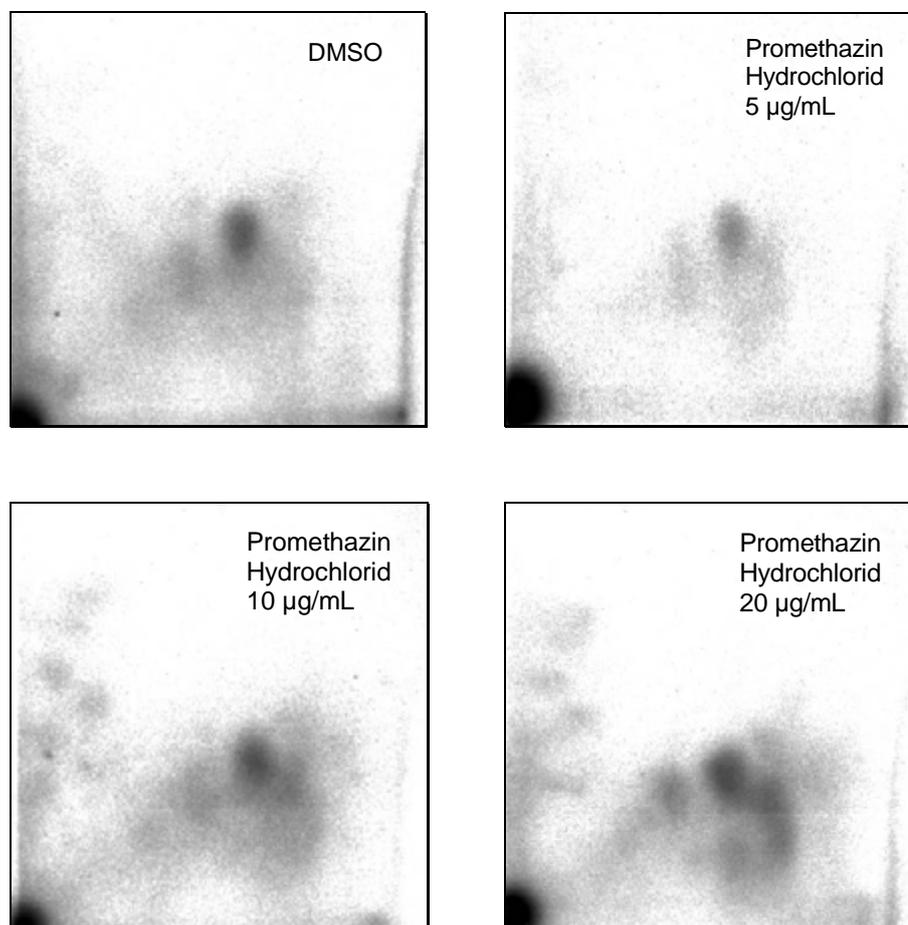


Abbildung 87: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Promethazin Hydrochlorid 5 µg/mL (Rattenleber, w.), Promethazin Hydrochlorid 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Promethazin Hydrochlorid 20 µg/mL (Rattenleber, w.)

Die Rattenleberschnitte wurden in 12-well-Platten 6 Stunden lang bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung erfolgte mit Hilfe der Nuklease P1-Methode. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug bei Raumtemperatur 16 Stunden. Der Auftragspunkt ist in der linken unteren Ecke zu erkennen.

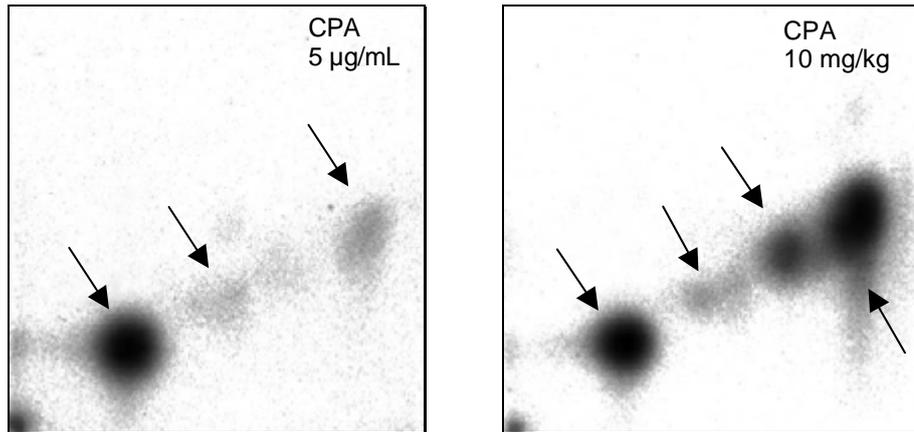
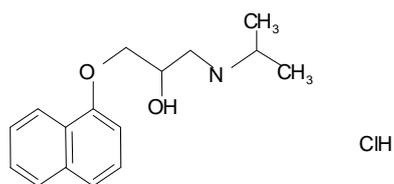


Abbildung 88: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Promethazin Hydrochlorid Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Zur Anreicherung der Addukte wurde bei beiden Positivkontrollen die Nuklease P1-Methode angewandt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Propranolol Hydrochlorid:

Handelsnamen: u.a. Beta-Tablinen , Dociton , Obsidan

Propranololhydrochlorid, ein Beta-Rezeptorenblocker, ist indiziert zur Behandlung von koronaren Herzerkrankungen (Angina pectoris), arterieller Hypertonie, supraventrikulären oder ventrikulären Arrhythmien und von Hyperthyreose. Weiterhin wird es auch zur Reinfarktprophylaxe, zur Migräneprophylaxe, zur Behandlung von essentiellen Tremor und von primären Angstsyndromen eingesetzt.

Propranololhydrochlorid ist ein lipophiler nichtkardioselektiver Beta-Rezeptorenblocker mit membranstabilisierender Wirkung ohne intrinsische sympathomimetische Aktivität. Es hemmt sowohl die β_1 - als auch die β_2 -Rezeptoren. Die Substanz senkt in Abhängigkeit von der Höhe des Sympathikotonus die Frequenz und die Kontraktionskraft des Herzens, die AV-Überleitungsgeschwindigkeit und die Plasma-Renin-Aktivität.

Propranololhydrochlorid kann durch die Hemmung von β_2 -Rezeptoren eine Erhöhung des Tonus der glatten Muskulatur bewirken.

Martelli (1997) beschreibt in der Literatur einen negativen UDS-Test. In der RTECS Datenbank sind keine weiteren Ergebnisse zur Genotoxizität und Mutagenität von Propranololhydrochlorid zu finden.

Aufgrund des sekundären Amins besteht nach der DEREK Beurteilung für Propranolol Hydrochlorid ein Warnhinweis auf Karzinogenität.

Propranololhydrochlorid wird nach der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) mit der Entstehung von Lungenkrebs, sowie trachealem und bronchialem Krebs assoziiert.

Mit Hilfe des ^{32}P -Postlabeling-Verfahrens wurden nach der Anreicherung mit Nuklease P1 in Rattenleberschnitten (w.) bei Propranolol Hydrochlorid-Konzentrationen von 5, 10 und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ keine Addukte detektiert (Abbildung 89).

Die zu dem Versuch gehörenden Chromatogramme der Positivkontrollen werden in Abbildung 90 dargestellt.

Die Propranolol Hydrochlorid-Konzentration von 100 µg/mL erwies sich in der Kaliumbestimmung als cytotoxisch.

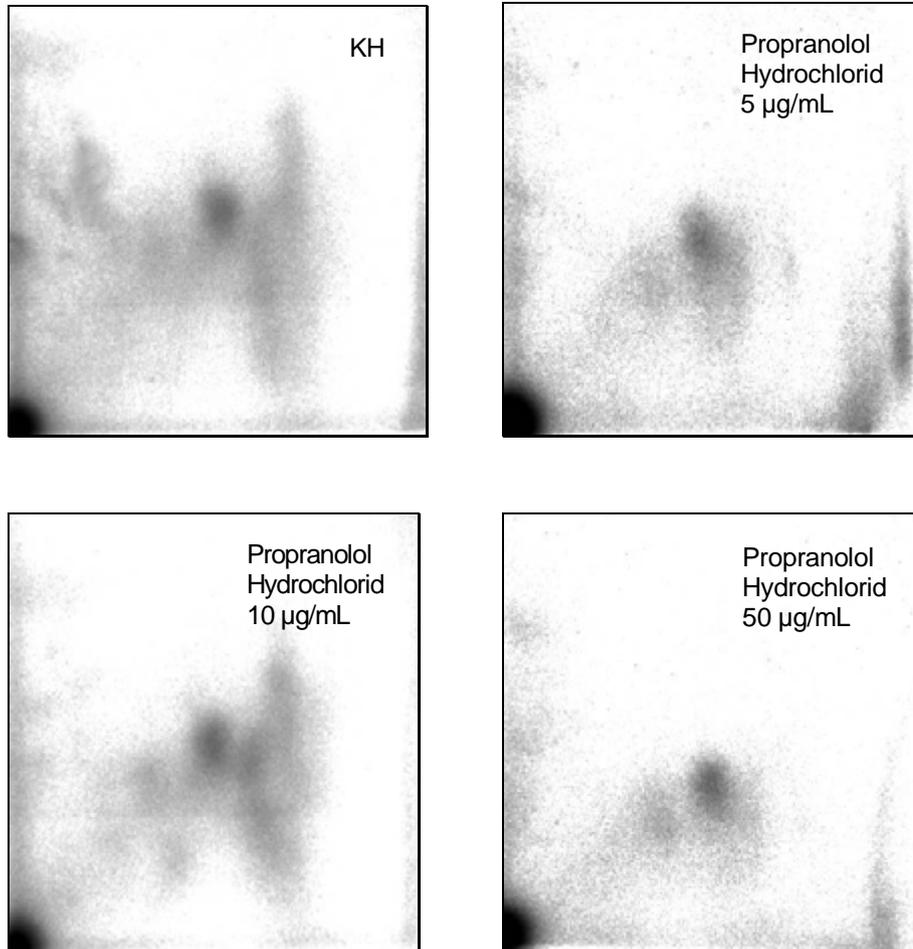


Abbildung 89: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH (Rattenleber, w.), von Propranolol Hydrochlorid 5 µg/mL (Rattenleber, w.), von Propranolol Hydrochlorid 10 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Propranolol Hydrochlorid 50 µg/mL (Rattenleber, w.) Die Leberschnitte wurden in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

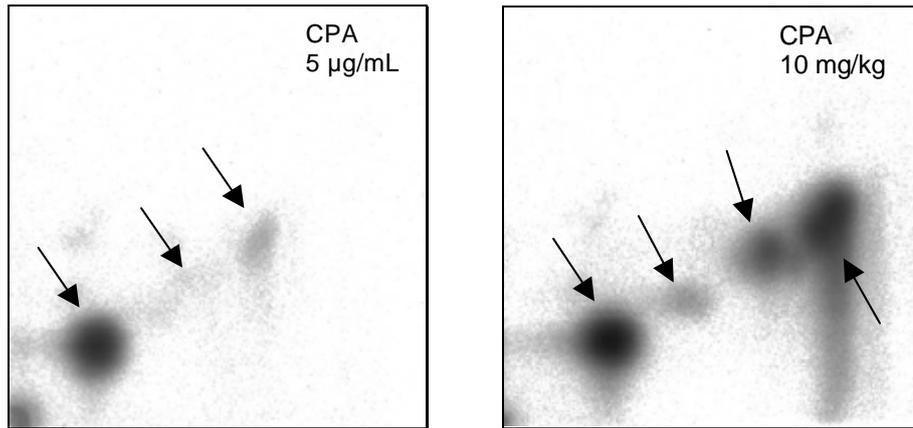
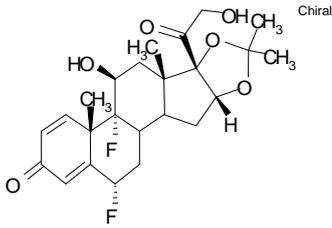


Abbildung 90: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)
Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Propranolol Hydrochlorid über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte erfolgte bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode. Die Imaging-Platten wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur exponiert. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Fluocinolonacetonid:

Handelsnamen: u.a. Flucinar , Jellin

Fluocinolonacetonid , ein synthetisches Nebennierenrindenhormon, wird als stark wirksames topisches Kortikoid zur Behandlung entzündlicher und allergischer Hauterkrankungen verwendet. Es besitzt eine ausgeprägte antiphlogistische, antiallergische und antipruriginöse Wirkung.

Daten zur Genotoxizität und Mutagenität von Fluocinolonacetonid sind weder in der Literatur noch in der RTECS Datenbank zu finden.

Fluocinolonacetonid wird in DEREK durch die 1,2-Dicarbonyl Verbindung als hautsensibilisierend beurteilt.

Bei den ausgewählten Konzentrationen von 10 und 100 µg/mL wurden im ³²P-Postlabeling-Verfahren in Rattenleberschnitten keine Addukte sichtbar (Abbildung 91).

Die Ergebnisse der verwendeten Positivkontrollen werden in der Abbildung 92 dokumentiert.

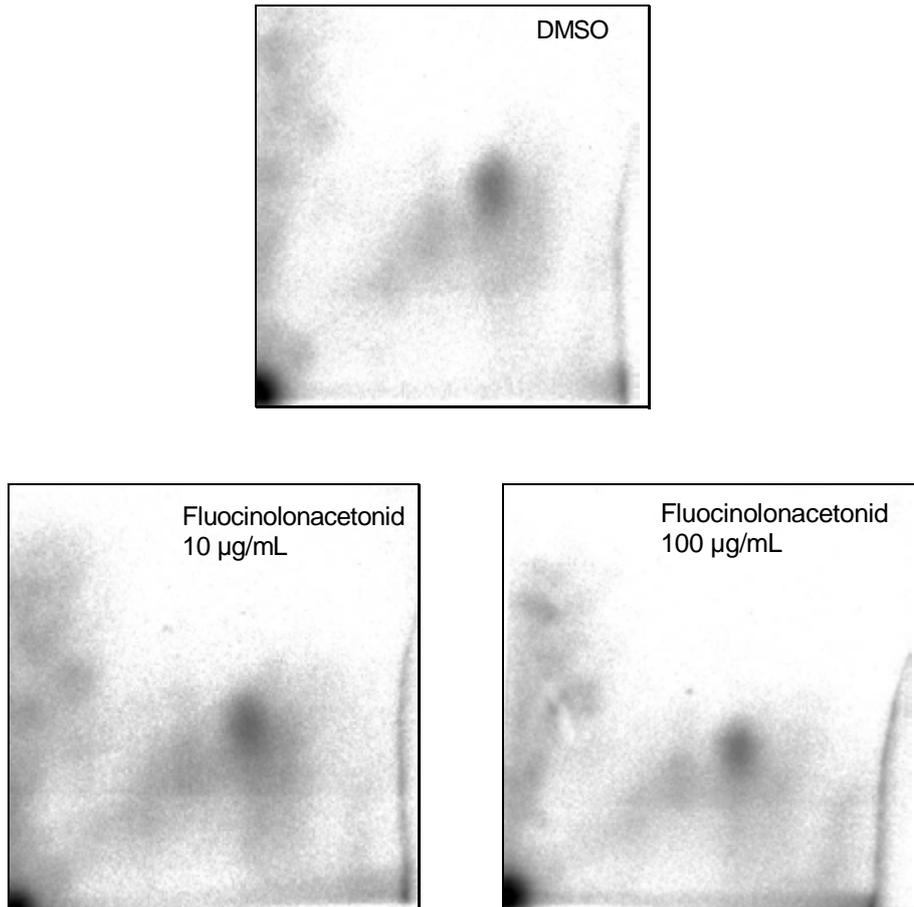


Abbildung 91: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (1%), von Fluocinolone acetonide 100 µg/mL und von Fluocinolone acetonide 10 µg/mL. Die Inkubation der Leberschnitte von weiblichen Ratten in 12-well-Platten wurde über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung durchgeführt. Die Addukt-Anreicherung erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt ist in der unteren linken Ecke zu erkennen.

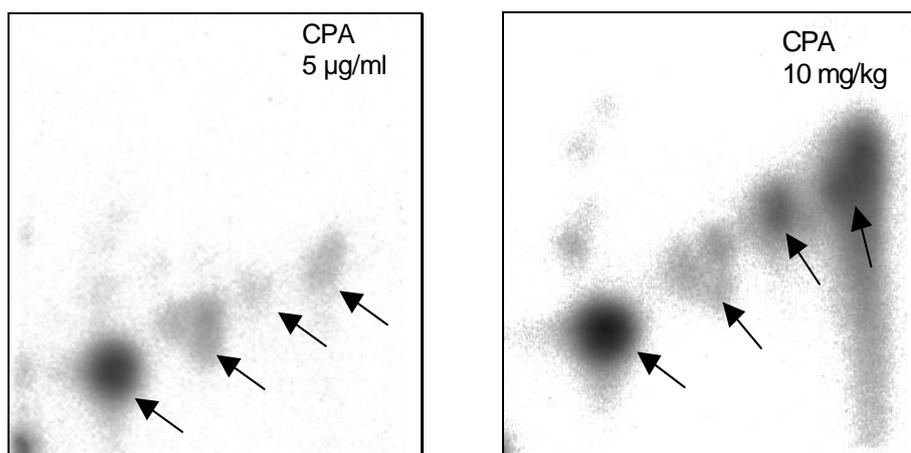
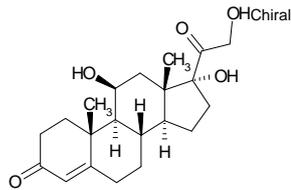


Abbildung 92: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg). Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Fluocinolone acetonide Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Zur Anreicherung der Addukte wurde bei beiden Positivkontrollen die Nuklease P1-Methode angewandt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Hydrocortison:

Handelsnamen: u.a. Antiprurit , Hydrogalen , Posterisan

Hydrocortison, ein Glukokortikoid, kommt bei der Substitutionstherapie bei Ausfall der Nebennierenrindenfunktion: Morbus Addison, Zustand nach Adrenalectomie, Sheehan-Syndrom, Zustand nach Hypophysektomie und beim adrenogenitalen Syndrom zur Anwendung. Außerdem wird es auch zur Behandlung im Rahmen einer pharmakodynamischen Therapie bei entzündlichen, allergischen und rheumatischen Erkrankungen eingesetzt. Hydrocortison beeinflusst dosisabhängig den Stoffwechsel fast aller Gewebe. Es wirkt antiphlogistisch (antiexsudativ und antiproliferativ) und verzögert immunsuppressiv. Es hemmt hierbei die Chemotaxis und Aktivität von Zellen des Immunsystems sowie die Freisetzung und Wirkung von Mediatoren der Entzündungs- und Immunreaktionen (z.B. lysosomaler Enzyme, Prostaglandine und Leukotriene) (Fachinfo, Februar 1992).

Aus der Literatur (Bali, 1990; Oshiro, 1986) und aus der RTECS Datenbank wurden folgende Ergebnisse zu genotoxischen und mutagenen Untersuchungen entnommen (Tabelle 37):

Tabelle 37: Hydrocortison

AMES:	CA:	Mikrokerntest:	SCE:	UDS:
negativ Bali, 1990	positiv Bali, 1990	positiv Bali, 1990	positiv Bali, 1990	positiv RTECS, 2000-1
				negativ Oshiro, 1986

Hydrocortison wurde nach der alten DEREK-Version als hautsensibilisierend und noch als möglich mutagen beurteilt. Dieser Verdacht auf Mutagenität wurde mit dem - ungesättigte Keton begründet (Ashby, 1988; Ashby, 1989; Tennant, 1990; Tennant, 1991; Ashby, 1993). Laut der neuen DEREK-Version 5.1.0 wird Hydrocortison nur noch als hautsensibilisierend angesehen. Die Hautsensibilisierung wird dadurch begründet, dass Hydrocortison als Präkursor für die Haptenbildung dient.

Mit Hilfe des ^{32}P -Postlabeling-Verfahrens wurden nach der Nuklease P1-Anreicherung in Rattenleberschnitten bei Hydrocortison-Konzentrationen von $50\ \mu\text{g/mL}$ Addukte mit einem Gesamt-RAL-Wert von $30\ \text{Addukte}/10^9\ \text{Nukleotide}$, bei $100\ \mu\text{g/mL}$ $21\ \text{Addukte}/10^9\ \text{Nukleotide}$ und bei $500\ \mu\text{g/mL}$ $52\ \text{Addukte}/10^9\ \text{Nukleotide}$ detektiert (Grafik 4). Die Konzentration von $1000\ \mu\text{g/mL}$ wurde aufgrund der fehlenden chromatographischen Auflösung der Addukte nicht zur Auswertung herangezogen.

Die Konzentrationen von 100 und $1000\ \mu\text{g/mL}$ wurden in ein und demselben Versuch inkubiert (Abbildung 93), wohingegen die Konzentrationen von 50 und $500\ \mu\text{g/mL}$ in einem separaten Versuch untersucht wurden (Abbildung 95). Aus diesem Grund, werden die jeweils zum Versuch gehörenden Negativkontrollen, die ein altersabhängiges I-Compound aufweisen, welches auch in den Chromatogrammen der zu testenden Substanz vorhanden ist, extra aufgeführt. Die Chromatogramme der Positivkontrollen (*in vitro* und *in vivo*) sind in der Abbildung 94 und der Abbildung 96 dargestellt.

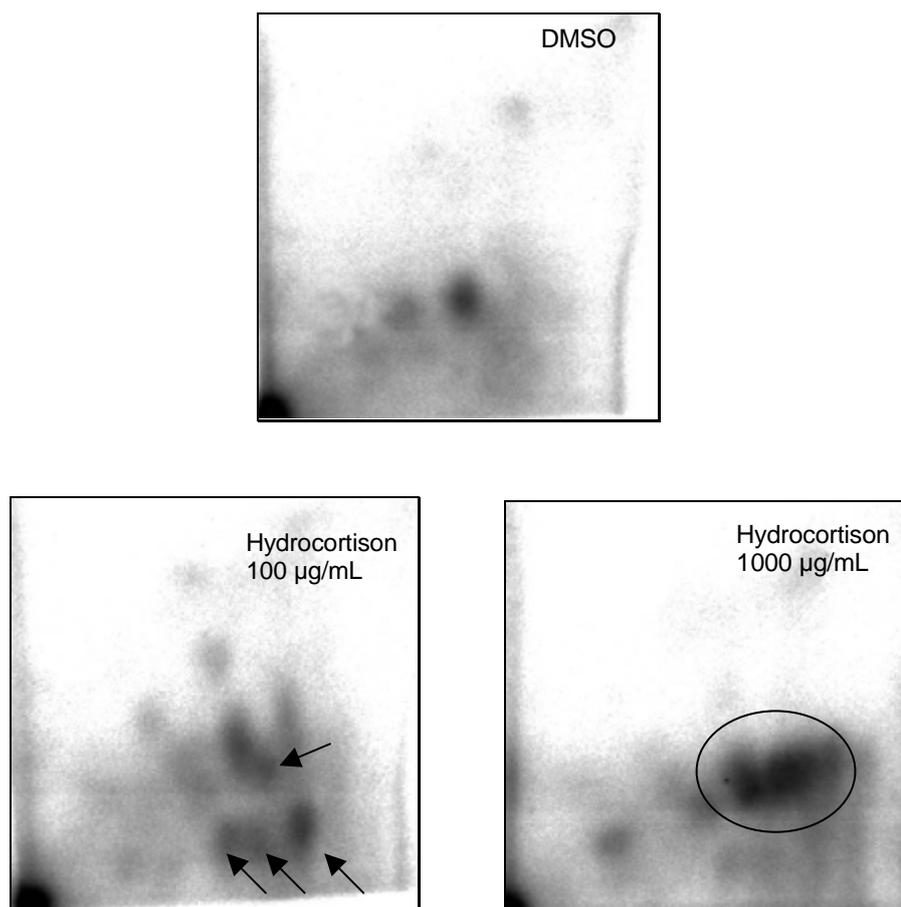


Abbildung 93: Zweidimensionale Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Hydrocortison $100\ \mu\text{g/mL}$ (Rattenleber, w.) und von Hydrocortison $1000\ \mu\text{g/mL}$ (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte inkubierten in 12-well-Platten über 6 Stunden lang bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Adduktanreicherung erfolgte mit Hilfe der Nuklease P1-Methode. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke ist der Auftragspunkt zu erkennen.

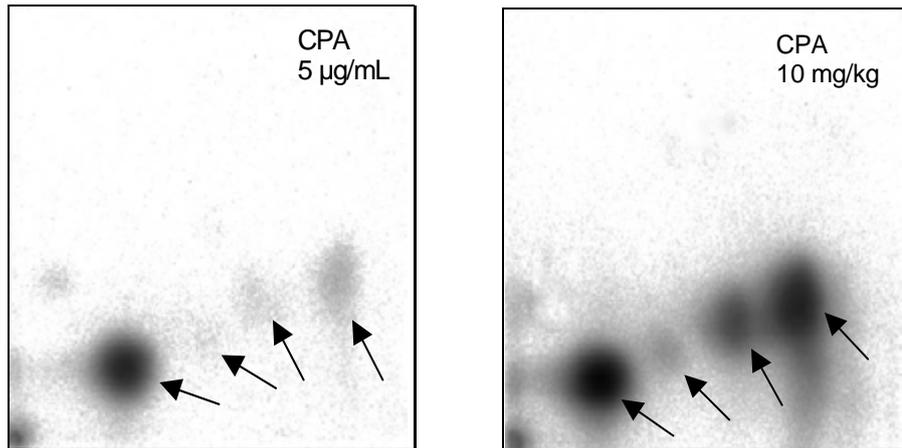


Abbildung 94: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Hydrocortison die Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Zur Anreicherung der Addukte wurde bei beiden Positivkontrollen die Nuklease P1-Methode verwendet. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

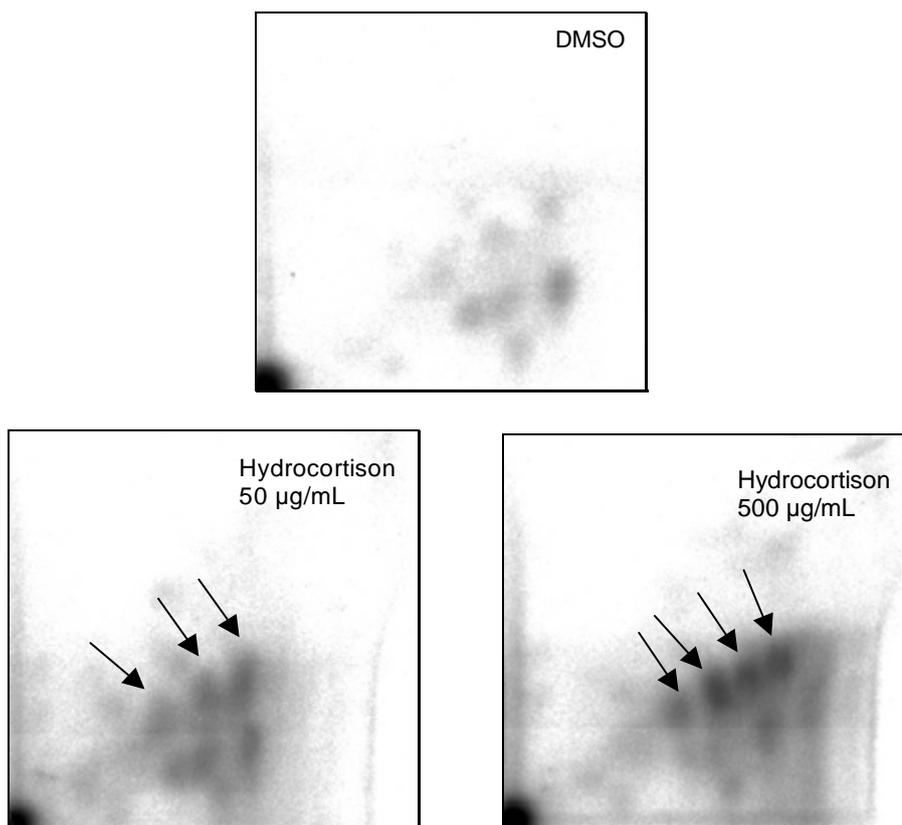


Abbildung 95: Zweidimensionale Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Hydrocortison 50 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Hydrocortison 500 µg/mL (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte wurden in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

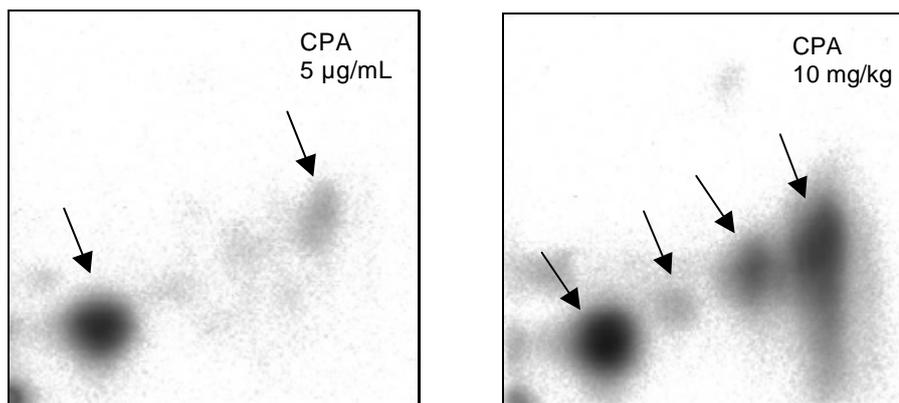
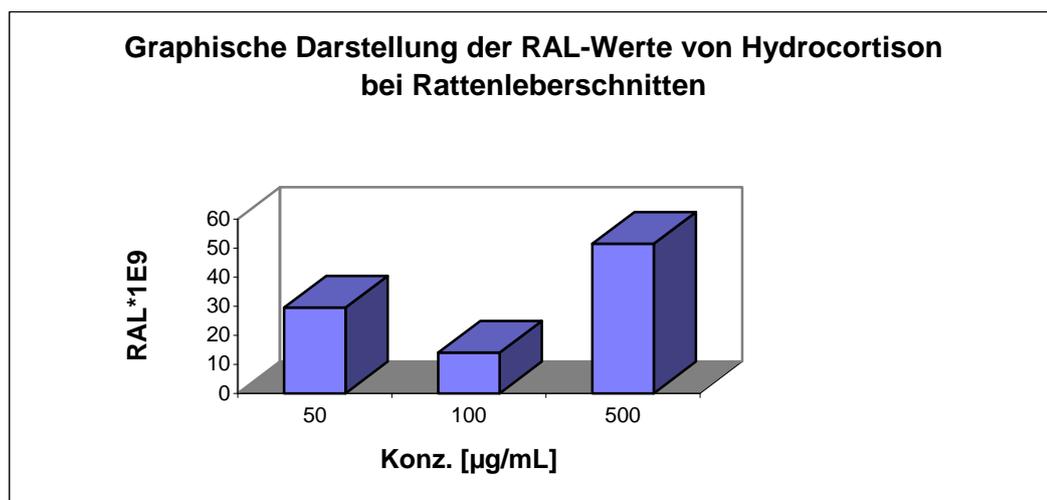


Abbildung 96: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

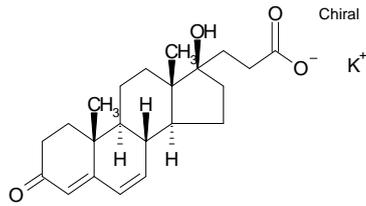
Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Hydrocortison die Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Die folgende Grafik verdeutlicht die RAL-Werte in Bezug zu den eingesetzten Hydrocortison Konzentrationen:



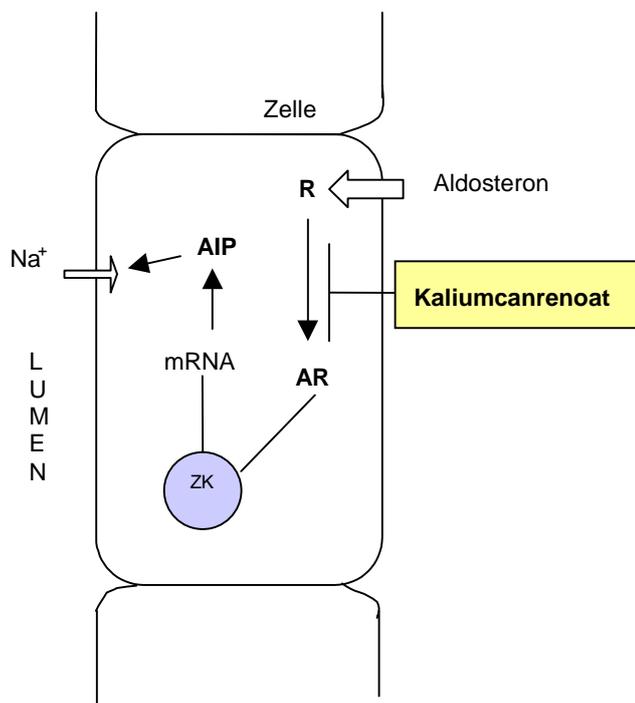
Grafik 4: Adduktlevel von Hydrocortison nach Nuklease P1 Anreicherung

Die DNA-Addukt-Analyse in Leberschnitten von weiblichen und männlichen Affen ließ mit dem ³²P-Postlabeling-Verfahren bei Konzentrationen von 50, 100 und 500 µg/mL keine Addukte erkennen.

Kaliumcanrenoat:

Handelsnamen: u.a. Aldactone , Osyrol

Kaliumcanrenoat gehört in die Gruppe der Aldosteron-Antagonisten und wird zur Behandlung von primärem Hyperaldosteronismus und von sekundärem Hyperaldosteronismus bei schwerer chronischer Leberinsuffizienz mit Ödemen und Aszites eingesetzt. Auch der sekundäre Hyperaldosteronismus bei chronischen, dekompensierten Herzerkrankungen mit Ödemen kann mit Kaliumcanrenoat therapiert werden.



Kaliumcanrenoat blockiert kompetitiv die Bindung von Aldosteron an dessen zytoplasmatischen Rezeptor **R** im spätdistalen Tubulus und im Sammelrohr. Der Aldosteron-Rezeptor-Komplex **AR** kann nicht in den Zellkern **ZK** eindringen und die Synthese des Aldosteron-induzierten Proteins **AIP**, welches für die Öffnung der Natriumkanäle auf der luminalen Seite zuständig ist, bleibt aus.

Kaliumcanrenoat steigert also die Natrium- und Chloridausscheidung und in geringem Maße auch die Calciumausscheidung. Ferner werden die Kalium-, die renale Magnesium- und die Ammoniumausscheidung sowie die Azidität des Harns reduziert. Kaliumcanrenoat kann über eine Senkung der glomerulären Filtrationsrate die Serumharnstoffkonzentration erhöhen. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit Steroidhormonen kommt es bei Anwendung von Kaliumcanrenoat zu antiandrogenen und östrogenähnlichen Wirkungen (Fachinfo, April 1997). Aus der Literatur von Oppermann, 1987 und von Martelli, 1999, 2002 wurden folgende Ergebnisse zu genotoxischen und mutagenen Untersuchungen entnommen (Tabelle 38):

Tabelle 38: Kaliumcanrenoat

AMES:	CA:	COMET:	Mikrokerntest:	Maus Lymphoma:	UDS:
negativ Oppermann, 1987	positiv Oppermann, 1987	positiv Martelli, 1999; 2002	positiv Martelli, 1999; 2002	positiv Oppermann, 1987	positiv Oppermann, 1987

Kaliumcanrenoat wird in DEREK als genotoxisch und als hautsensibilisierend beurteilt. Diese DEREK-Warnung bezieht sich auf das 3-Keto, 4-delta, 6-delta steroid oder Analoga.

Im ³²P-Postlabeling-Verfahren wurde nach der Nuklease P1-Anreicherung in Rattenleberschnitten bei einer Konzentrationen von 20 µg/mL nach Abzug der Negativkontrolle (KH) ein Addukt mit dem RAL-Wert von 21 Addukte/ 10⁹ Nukleotide detektiert. Die Konzentration von 0,2 µg/mL zeigt ein eindeutig negatives Ergebnis, wohingegen die Konzentration von 2 µg/mL ein sehr schwaches positives Ergebnis aufweist, welches aber nach Abzug der Negativkontrolle nicht aussagekräftig ist (Abbildung 97).

Die Ergebnisse der Positivkontrollen werden in Abbildung 98 dargestellt.

In der Negativkontrolle ist ein I-Compound zu erkennen, welches sich auch in den Chromatogrammen von Kaliumcanrenoat wiederfindet und dadurch als Hintergrund gelten kann.

Auffällig war bei der Kaliumbestimmung eine Cytotoxizität in den Rattenleberschnitten bei Konzentrationen von 200 µg/mL, 398 µg/mL und 3,98 mg/mL.

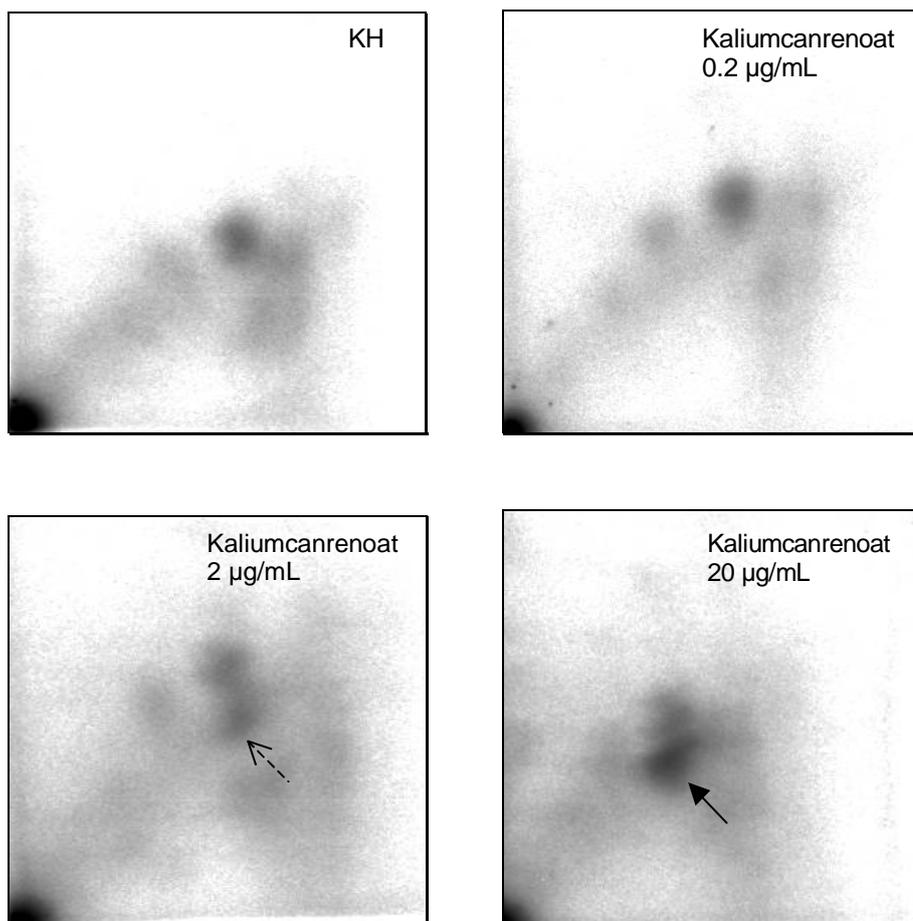


Abbildung 97: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH (Rattenleber, w.), von Kaliumcanrenoat 0,2 µg/mL (Rattenleber, w.), von Kaliumcanrenoat 2 µg/mL und von Kaliumcanrenoat 20 µg/mL (Rattenleber, w.)

Die Leberschnitte wurden in 12-well-Platten 6 Stunden lang bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

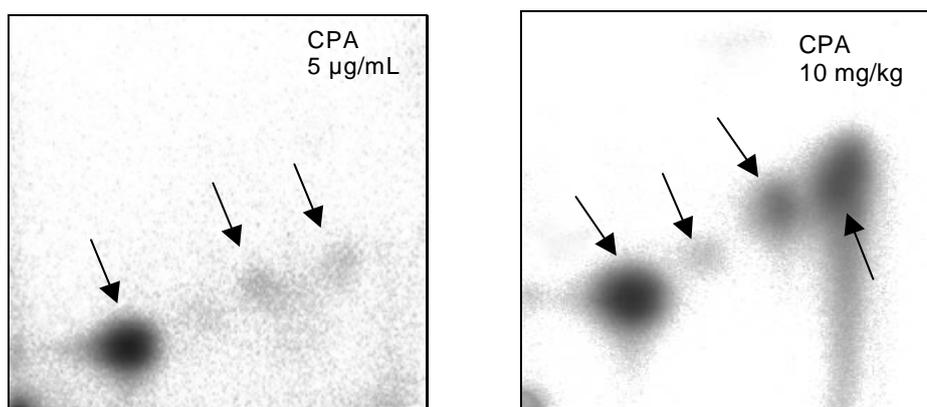


Abbildung 98: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Kaliumcanrenoat die Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben befindet sich in der unteren linken Ecke.

In Leberschnitten von einem männlichen Affen wurde mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren nach einer Nuklease P1 Anreicherung ein Addukt detektiert (Abbildung 99).

Die RAL-Werte betragen bei Konzentrationen von 20 $\mu\text{g/mL}$ 32,5 und bei 50 $\mu\text{g/mL}$ 41 Addukte/ 10^9 Nukleotide.

Als positive *in vitro* Kontrolle wurde in diesem Versuch Tamoxifen (10 $\mu\text{g/mL}$) neben der *in vivo* Kontrolle von CPA (10 mg/kg) eingesetzt (Abbildung 100).

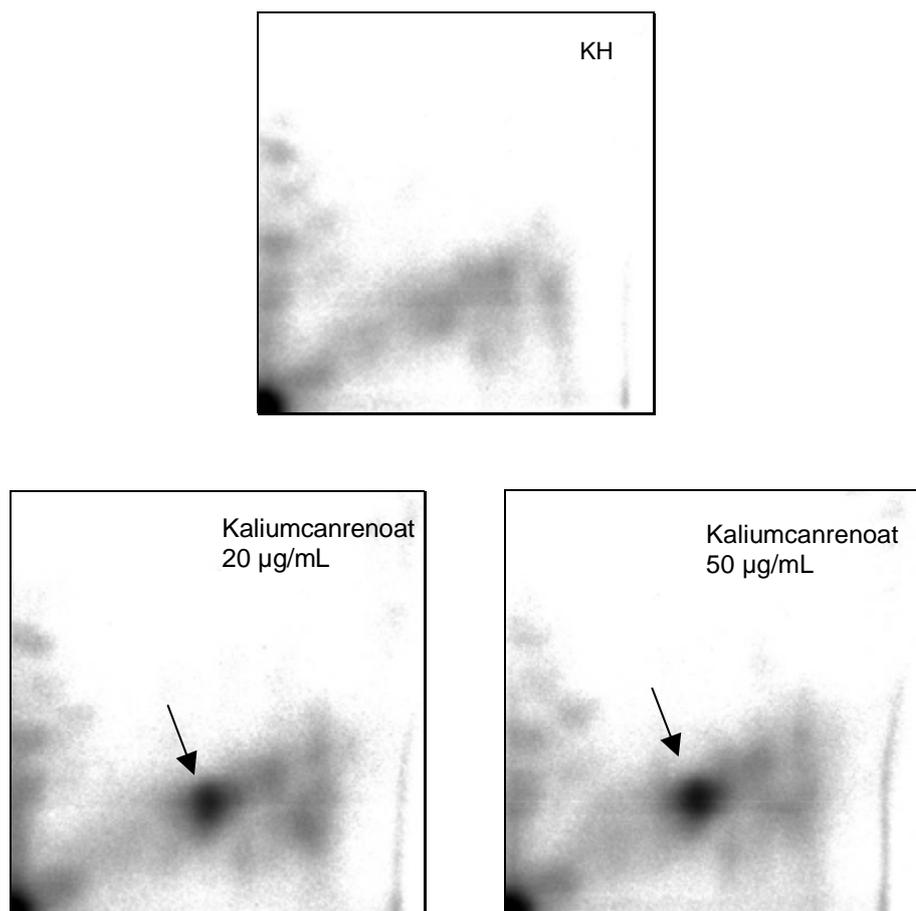


Abbildung 99: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH, von Kaliumcanrenoat 20 $\mu\text{g/mL}$ und von Kaliumcanrenoat 50 $\mu\text{g/mL}$. Die Leberschnitte des männlichen Affen wurden in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte erfolgte mit Nuklease P1. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke ist der Auftragspunkt erkennbar.

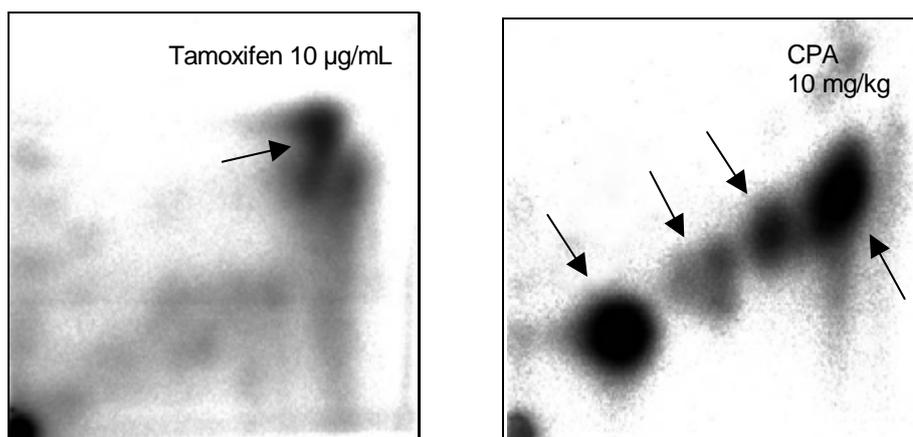
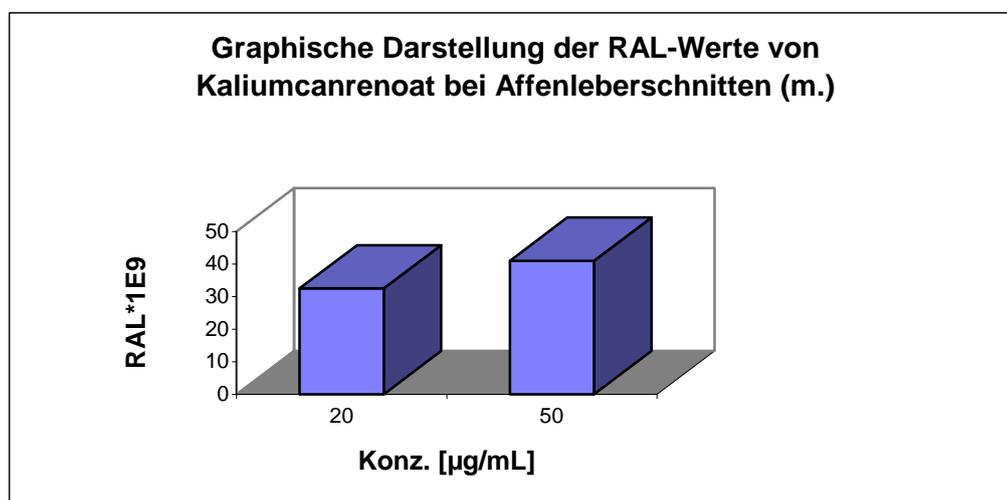


Abbildung 100: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Kaliumcanrenoat die Affenleberschnitte (m.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten betrug bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben befindet sich in der unteren linken Ecke.

Die Grafik 5 verdeutlicht das Adduktlevel in Affenleberschnitten (m.) nach 6-stündiger Inkubation mit Kaliumcanrenoat in den Konzentrationen von 20 und 50 µg/mL.



Grafik 5: Adduktlevel von Kaliumcanrenoat nach Nuklease P1 Anreicherung in Affenleberschnitten (m.)

Da es sich bei Kaliumcanrenoat um einen Aldosteron-Antagonist handelt, wurden weitere Versuche mit Nierenschnitten durchgeführt, um dem Zielorgan dieser Substanz Rechnung zu tragen. Kaliumcanrenoat zeigte hier in Nierenschnitten eines männlichen Affens mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren keine Addukte (Abbildung 101).

Tamoxifen, hier als positive *in vitro* Kontrolle eingesetzt, fiel in männlichen Affennierenschnitten ebenfalls negativ aus (Abbildung 102).

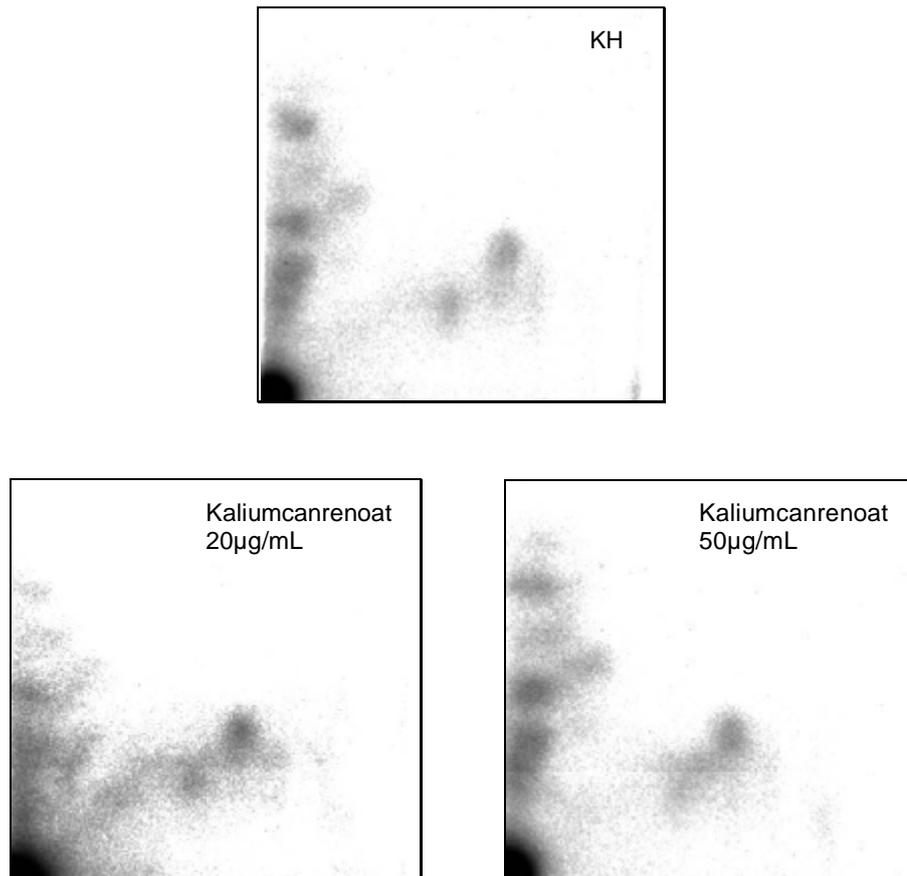


Abbildung 101: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH (Affenniere, m.), von Kaliumcanrenoat 20 µg/mL (Affenniere, m.) und von Kaliumcanrenoat 50 µg/mL (Affenniere, m.)

Die Nierenschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung erfolgte mit Hilfe der Nuklease P1-Methode. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

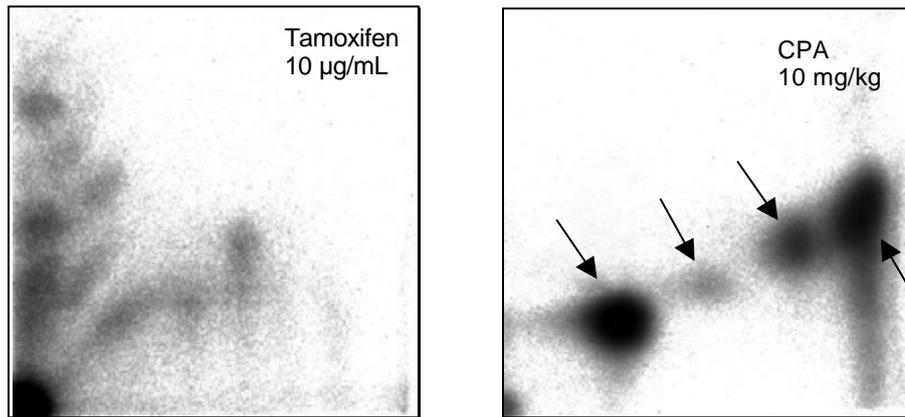


Abbildung 102: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Kaliumcanrenoat die Affenierenschnitte (m.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten betrug bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

In den Leberschnitten eines weiblichen Affen wurden bei Konzentrationen von 20 µg/mL und 50 µg/mL jedoch vier verschiedene Addukte mit einem Gesamt-RAL-Wert von 137,5 und 158,5 Addukte/10⁹ Nukleotide ermittelt (Abbildung 103). Auch hier wurde Tamoxifen in einer Konzentration von 10 µg/mL als positive *in vitro* Kontrolle eingesetzt (Abbildung 104).

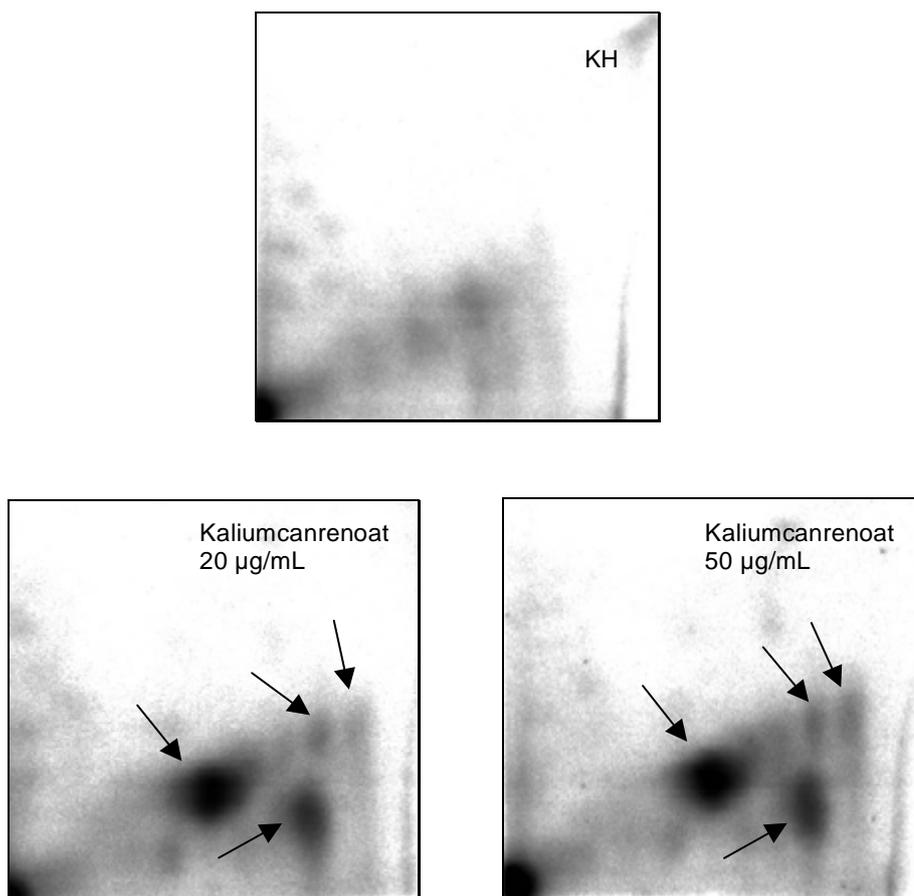


Abbildung 103: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH, von Kaliumcanrenoat 20 µg/mL und von Kaliumcanrenoat 50 µg/mL
Die Leberschnitte des weiblichen Affen inkubierten in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Addukt-Anreicherung erfolgte mit der Nuklease P1-Methode. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. In der unteren linken Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

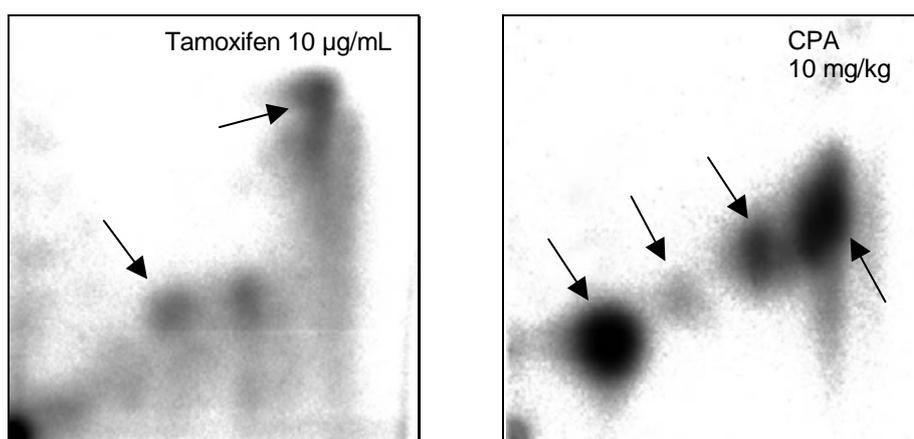
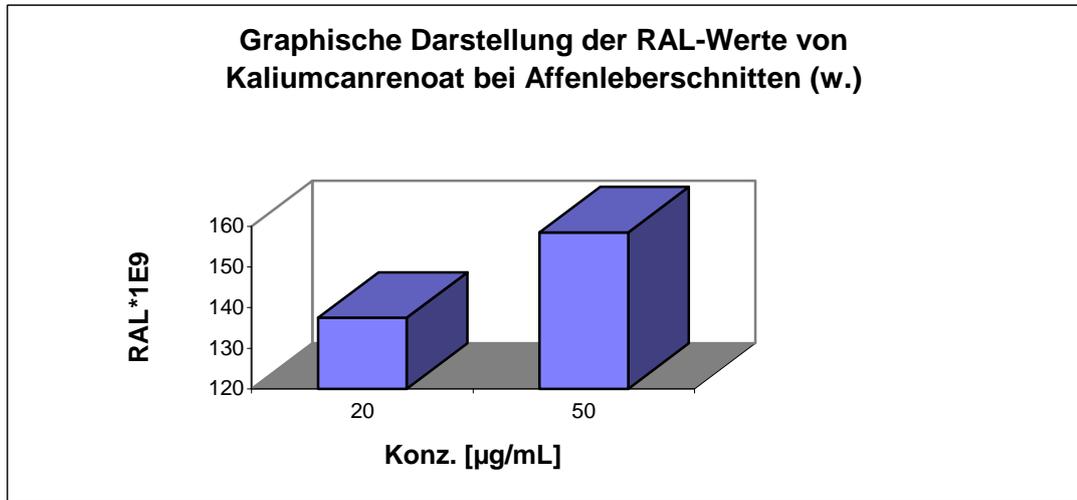


Abbildung 104: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)
Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Kaliumcanrenoat die Affenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten betrug bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben ist in der unteren linken Ecke sichtbar.

In der Grafik 6 sind die Adduktlevel von Kaliumcanrenoat in Affenleberschnitten (w.) nach Abzug der Negativkontrollen zu erkennen.



Grafik 6: Adduktlevel von Kaliumcanrenoat nach Nuklease P1 Anreicherung in Affenleberschnitten (w.)

Die weiblichen Affennierenschnitte zeigten nach der *in vitro* Behandlung mit Kaliumcanrenoat bei Konzentrationen von 20 µg/mL und 50 µg/mL jeweils ein Addukt mit einem RAL-Wert von 3 bzw. 4,5 Addukte/10⁹ Nukleotide (Abbildung 105).

Tamoxifen, als Positivkontrolle eingesetzt, zeigte in diesem Versuch ein schwach positives Ergebnis (Abbildung 106).

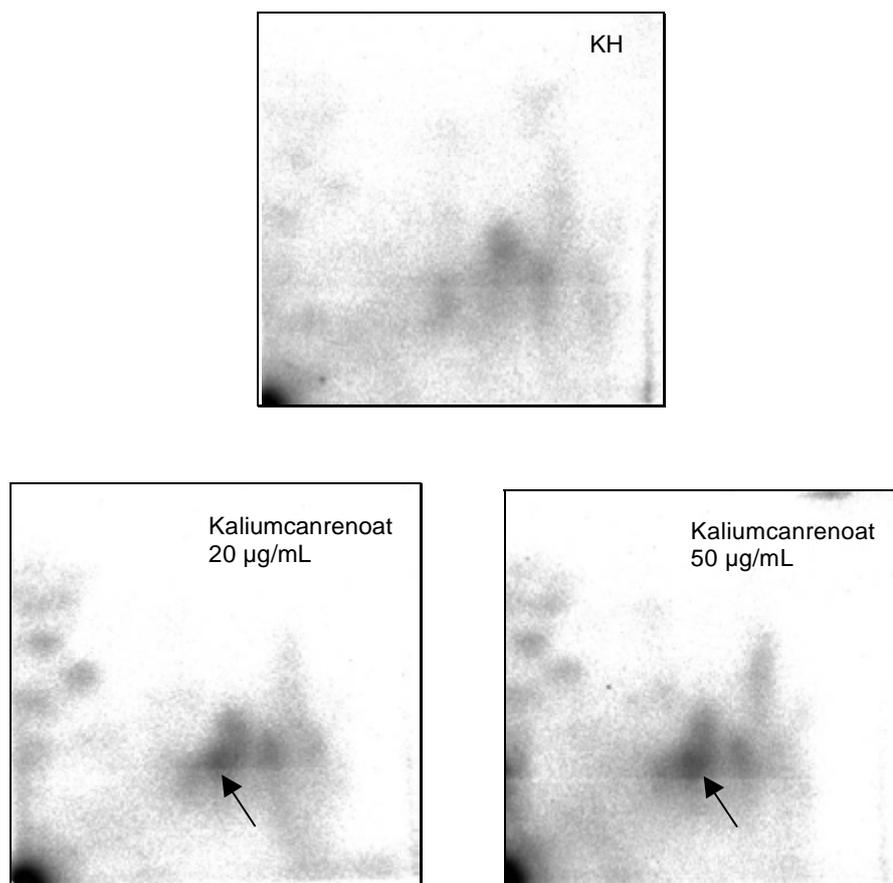


Abbildung 105: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von KH (Affenniere, w.), von Kaliumcanrenoat 20 µg/mL (Affenniere, w.) und von Kaliumcanrenoat 50 µg/mL (Affenniere, w.)

Die Nierenschnitte wurden über 6 Stunden in 12-well-Platten bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung erfolgte mit Hilfe der Nuklease P1-Methode. Bei Raumtemperatur betrug die Expositionszeit der Imaging-Platten 16 Stunden. In der linken unteren Ecke befindet sich der Auftragspunkt.

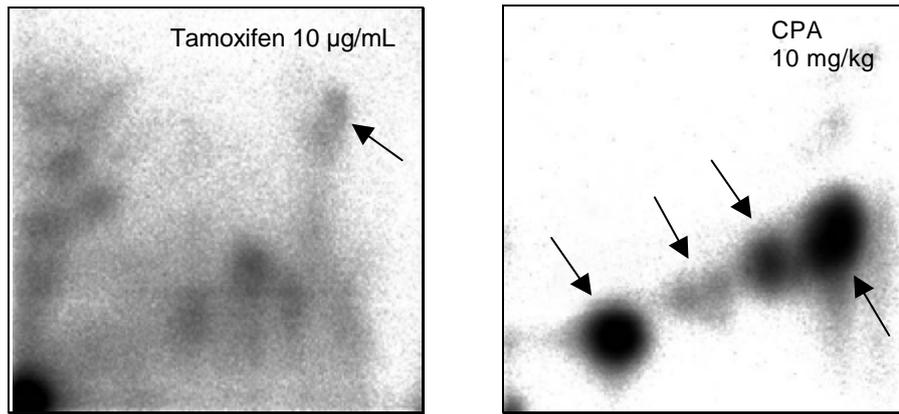
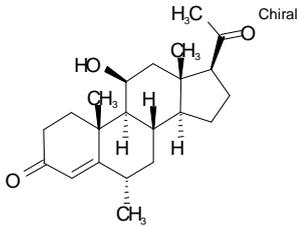


Abbildung 106: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: Tamoxifen 10 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Kaliumcanrenoat die Affennierenschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Addukte wurden bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode angereichert. Die unter Raumtemperatur durchgeführte Exposition der Imaging-Platten betrug bei Tamoxifen 16 Stunden und bei CPA 15 Minuten. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Medryson:

Handelsname: Spectramedryn

Medryson ist in der Gruppe der Glukokortikoide zur lokalen ophthalmologischen Anwendung zu finden. Der Einsatz von Medryson erstreckt sich auf leichtere Formen von oberflächlichen, allergischen und nichtinfektiösen Entzündungen des Auges, wie z.B. allergische Konjunktivitis und Entzündungen des Gewebes zwischen Konjunktiva und Sklera. Medryson ist ein dem Progesteron strukturell verwandtes synthetisches Glukokortikoid mit antiinflammatorischer Wirksamkeit (Fachinfo, Oktober 1991).

Die Literaturrecherche ergab für Medryson keine Daten zur Genotoxizität und zur Mutagenität.

Medryson wurde 1999 nach der DEREK-Beurteilung als hautsensibilisierend und als möglich mutagen angesehen. Dieser Verdacht auf Mutagenität und Hautsensibilisierung wurde mit dem - ungesättigte Keton begründet (Ashby, 1988; Ashby, 1989; Tennant, 1990; Tennant, 1991; Ashby, 1993). In der neuen DEREK-Version erscheint dieser Alert für Medryson nicht mehr.

Laut der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) wird Medryson mit der Entstehung von Uteruskrebs in Verbindung gebracht.

Die DNA-Adduktanalyse wies in Rattenleberschnitten bei Konzentrationen von 10, 40 und 80 µg/mL Medryson mit dem Nuklease P1-Anreicherungsverfahren im Vergleich zur Negativkontrolle (DMSO) ein negatives Ergebnis auf (Abbildung 107). Die Chromatogramme der positiven Kontrollen werden in Abbildung 108 dargestellt. In der Negativkontrolle (DMSO) ist ein sehr starkes Hintergrundrauschen zu erkennen.

Diese Schwärzungen sind durch das hohe Alter der Ratten zu erklären, die hier schon 8,5 Monate alt waren. Diese Pseudo-Addukte (I-COMPOUND oder indigenous compounds) sind dadurch zu erklären, dass mit zunehmendem Alter auch endogene Stoffwechselprodukte und Hormone, aber auch Nahrungsbestandteile und Umwelteinflüsse zu Addukten führen können, die aber mit der zu testenden Substanz nicht in Zusammenhang stehen (Gupta 1996; Randerath 1986; Randerrath 1994).

Das Fehlen dieser Pseudo-Addukte in der Positivkontrolle kann damit begründet werden, dass die Expositionszeit der Kontrollen nur 15 Minuten betrug und sich dadurch diese Hintergrundschwärzungen nicht detektieren lassen.

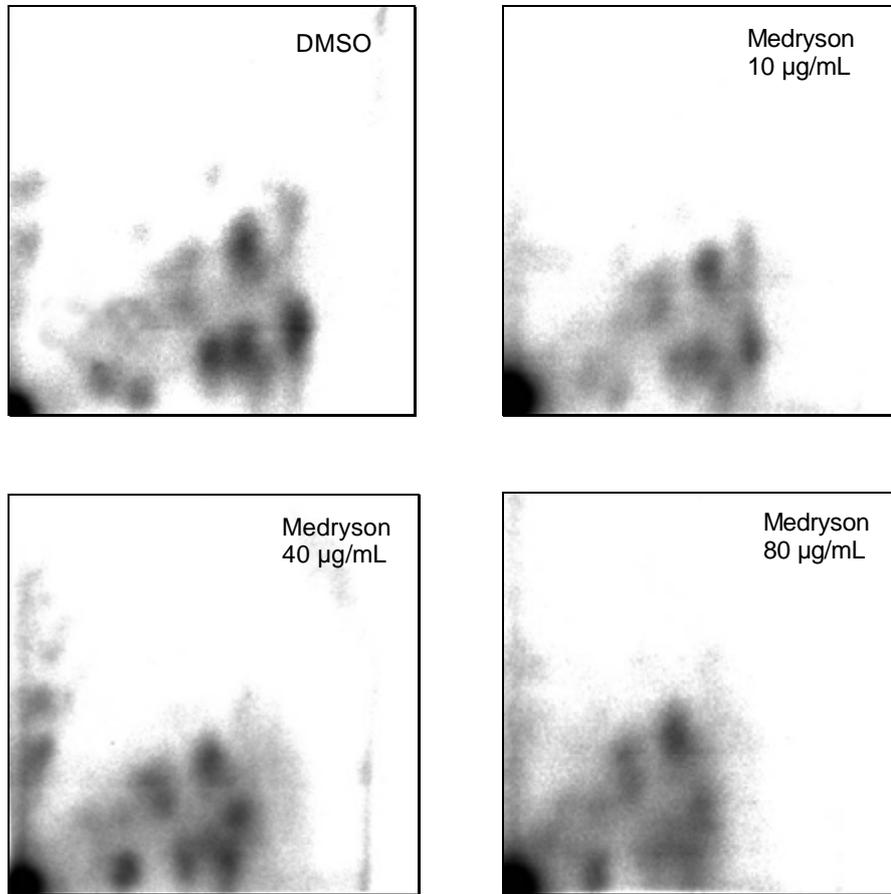


Abbildung 107: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO (Rattenleber, w.), von Medryson 10 µg/mL (Rattenleber, w.), von Medryson 40 µg/mL (Rattenleber, w.) und von Medryson 80 µg/mL (Rattenleber, w.) Die Rattenleberschnitte wurden in 12-well-Platten 6 Stunden lang bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung wurde mit Hilfe der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug bei Raumtemperatur 16 Stunden. Der Auftragspunkt ist in der linken unteren Ecke zu erkennen.

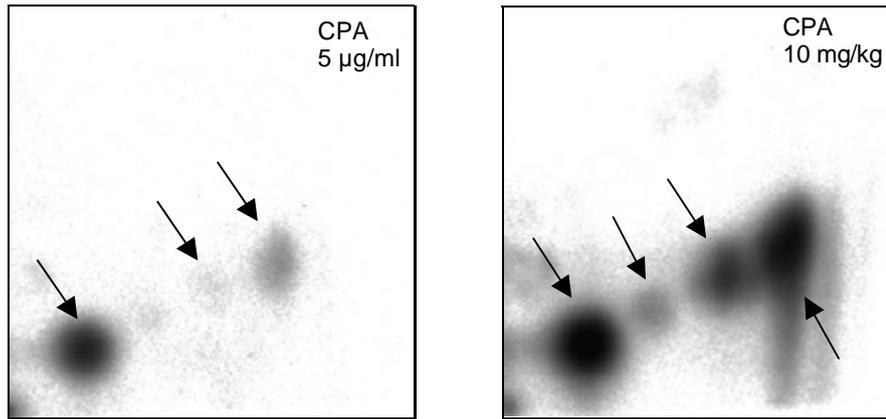
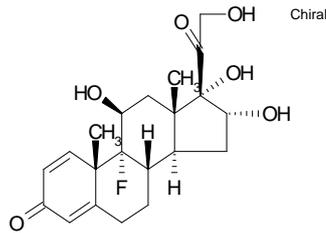


Abbildung 108: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/kg)

Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden analog zu Medryson die Rattenleberschnitte (w.) über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Adduktanreicherung wurde bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode durchgeführt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der Proben befindet sich in der unteren linken Ecke.

Triamcinolon:

Handelsnamen: u.a. Delphicort , Extracort , Volon

Triamcinolon ist ein Corticosteroid mit glucocorticoider Wirkung, das auch diuretische, antiallergische und antiphlogistische Eigenschaften besitzt. Es kommt zum Einsatz bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises einschließlich Kollagenosen, allergischen Reaktionen (Heuschnupfen, Asthma bronchiale, Urtikaria, anaphylaktische Reaktion), obstructiven Atemwegserkrankungen, entzündliche Darmerkrankungen (ulcerative Ileitis/Colitis), Lipoidnekrosen, entzündlichen/ödematösen Begleitreaktionen bei Hirnerkrankungen, septischem Schock, Lungenödem infolge Inhalation toxischer Substanzen, immun-hämolytischen Anämien, thrombopenischer Purpura, Transplantat-Abstoßungsreaktionen, akute und schwere Dermatosen (Pemphigus vulgaris, Erythrodermie, Lyell-Syndrom), Leukämien, Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphome, entzündlichen Erkrankungen des Auges und verschiedenen Hauterkrankungen.

In der Literatur sind weder Untersuchungsdaten zur Genotoxizität noch Mutagenität zu finden.

Triamcinolon wird aufgrund der 1,2 Dicarboxyl Verbindung nach DEREK als hautsensibilisierend beurteilt.

Laut der Veröffentlichung von van den Eeden (1995) wird Triamcinolon mit der Entstehung von Leberkrebs assoziiert.

Die DNA-Adduktbestimmung mit Hilfe des ^{32}P -Postlabeling-Verfahrens fiel in Rattenleberschnitten bei Konzentrationen von 4 und 40 $\mu\text{g/mL}$ negativ aus (Abbildung 109).

Die Chromatogramme der im Versuch eingesetzten Positivkontrollen werden in Abbildung 110 verdeutlicht.

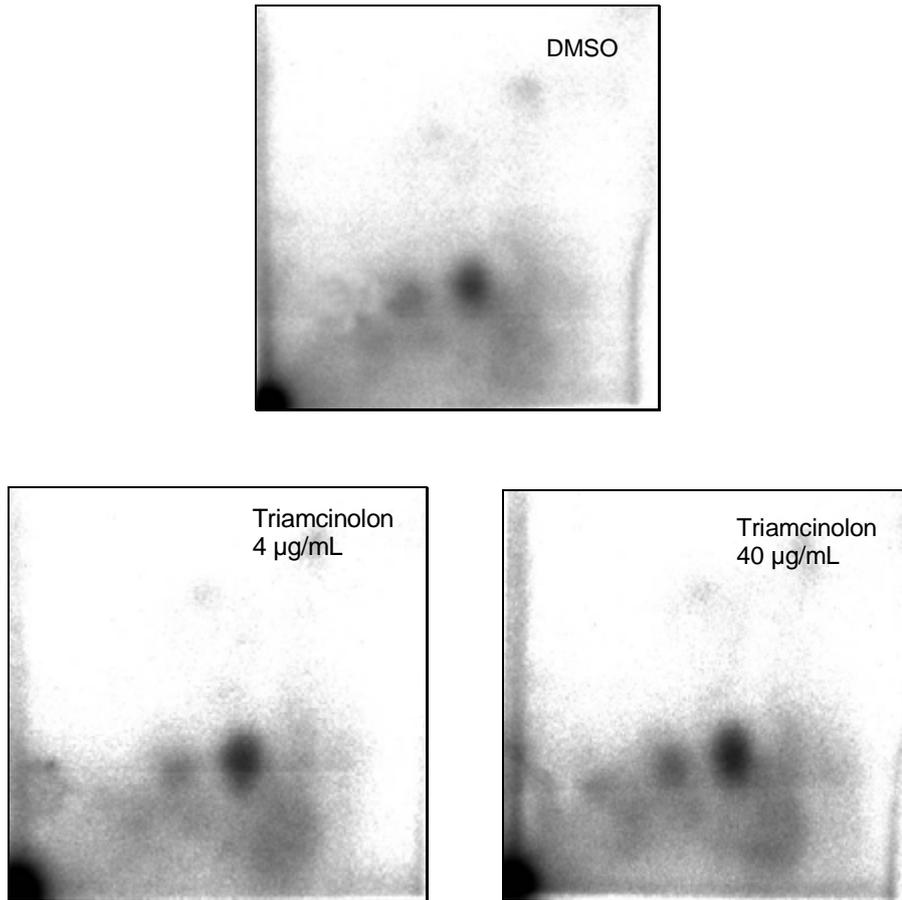


Abbildung 109: Ergebnisse der zweidimensionalen Chromatographie von DMSO, von Triamcinolon 4 µg/mL und von Triamcinolon 40 µg/mL
Die Leberschnitte von weiblichen Ratten inkubierten in 12-well-Platten über 6 Stunden bei 37°C unter Carbogen-Begasung. Die Anreicherung der Addukte wurde mit Nuklease P1 durchgeführt. Die Expositionszeit der Imaging-Platten betrug 16 Stunden bei Raumtemperatur. Der Auftragspunkt der jeweiligen Probe ist in der unteren linken Ecke zu erkennen.

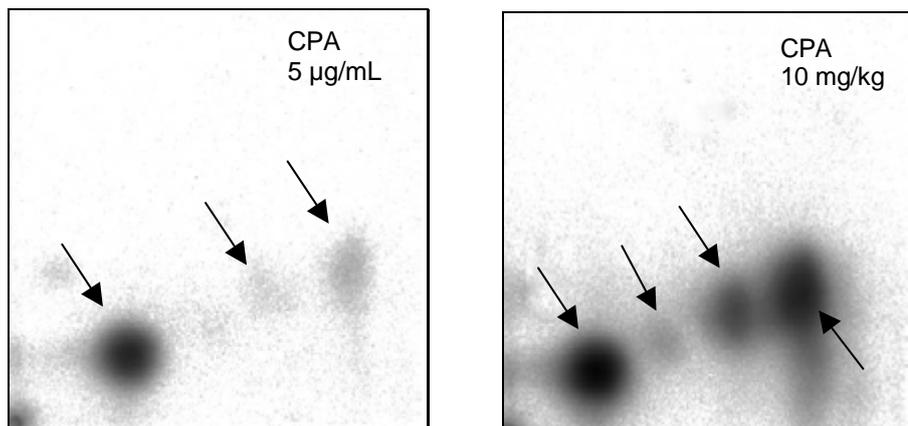
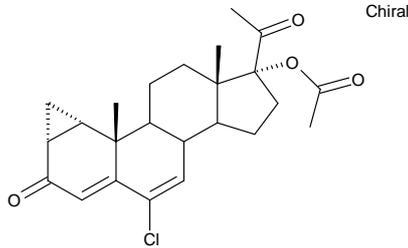


Abbildung 110: Ergebnisse der Positivkontrollen (*in vitro*: CPA 5 µg/mL und *in vivo*: CPA 10 mg/mL)
Bei der *in vitro*-Positivkontrolle wurden die Rattenleberschnitte (w.) analog zu Triamcinolon über 6 Stunden bei 37°C in 12-well-Platten unter Carbogen-Begasung inkubiert. Die Anreicherung der Addukte erfolgte bei beiden Positivkontrollen mit der Nuklease P1-Methode. Die Imaging-Platten wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur exponiert. Der Auftragspunkt der Proben liegt in der unteren linken Ecke.

Positivkontrolle**Cyproteronacetat (CPA):**

Handelsname: Androcur

CPA ist ein synthetisches Steroidhormon mit starker gestagener und antiandrogener Wirkung (Hümpel, 1979; Neumann, 1994). Aufgrund dieser Eigenschaften wird CPA bei Frauen zur Behandlung von Androgenisierungserscheinungen wie Hirsutismus, Akne und Seborrhoe (2-100 mg CPA/Tag) und bei Männern zur pharmakologischen Behandlung von Prostatakrebs und Triebdämpfung bei Sexualtätern (100-300 mg CPA/Tag) eingesetzt. Früher wurde es bei Kindern zur Behandlung von Pubertas praecox verwendet.

Der molekulare Wirkmechanismus von CPA beruht darauf, dass es mit einem Metaboliten des Testosterons, dem 5 α -Dihydrotestosteron, um einen Rezeptor (kompetitiver Antagonismus) konkurriert (Fang und Liao, 1969).

Außerdem hemmt CPA die Gonadotropinsekretion und damit die testikuläre Biosynthese von Androgenen.

Bei einer Konzentration der Positivkontrolle von 5 μ g CPA/mL (gelöst in 1% DMSO) konnten in den Rattenleberschnitten RAL-Werte von durchschnittlich 3283 Addukte/ 10^9 Nukleotiden (n=15) in einem für CPA charakteristischen Adduktmuster gefunden werden (Abbildung 111).

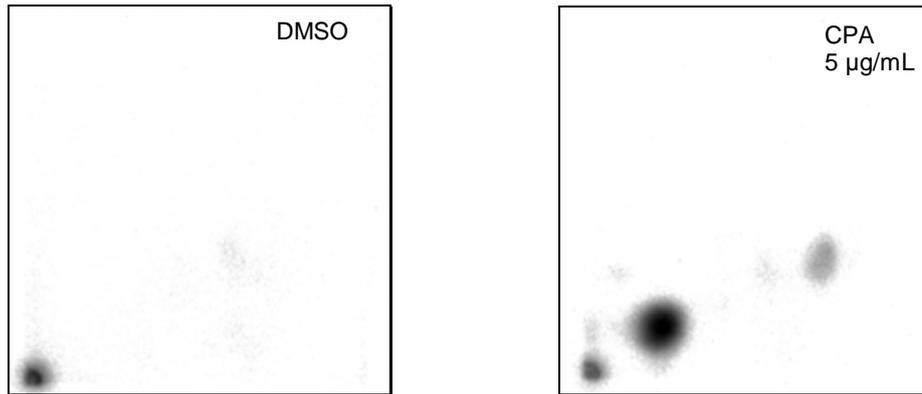


Abbildung 111: Radioluminogramme von DMSO und CPA (5 µg/mL)
Die Rattenleberschnitte wurden mit 1% DMSO (Negativkontrolle) oder mit CPA (Positivkontrolle) in einer Dosis von 5 µg/mL über 6 Stunden inkubiert. Der Auftragspunkt befindet sich in der linken unteren Ecke. Die Expositionszeit der Imaging Platten betrug 15 Minuten.

Bei der Verwendung der so genannten Referenz-DNA, welche aus einem *in vivo* Experiment an weiblichen Ratten (10 mg CPA/kg KGW) stammte, wurden RAL-Werte von durchschnittlich 18404 Addukte/10⁹ Nukleotiden (n=15) detektiert. Auch das Adduktmuster wurde als charakteristisch für CPA *in vivo* identifiziert (Abbildung 112).

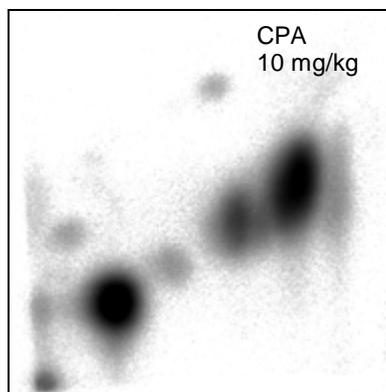


Abbildung 112: Radioluminogramm von CPA (10 mg/kg KGW)
Die Ratten wurden mit CPA in einer Dosis von 10 mg/kg KGW behandelt. Der Auftragspunkt befindet sich in der unteren, linken Ecke. Die Expositionszeit der Imaging Platten betrug 15 Minuten.

5 Diskussion

Um die Eignung der ^{32}P -Postlabeling Analyse für den Nachweis von Addukten verschiedener Substanzgruppen zu untersuchen und um die Kenntnisse über das DNA-Adduktbildungspotential verschiedener Arzneimittel zu vergrößern, wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit 32 Substanzen ausgewählt (siehe 2.1) und auf ihre DNA-Reaktivität in Rattenleberschnitten und zum Teil auch in Affenleber- und Affennierenschnitten untersucht.

Die ausgewählten Substanzen entstammen verschiedener Wirkstoffgruppen und reflektieren das breite Spektrum an Arzneimitteln, das sich auf dem deutschen Markt befindet. Die aufgeführten Substanzen sind laut Kategorisierung der IARC als kanzerogen (Klasse 1), wahrscheinlich kanzerogen (Klasse 2A), möglicherweise kanzerogen (Klasse 2B) und als nicht kanzerogen für den Menschen (Klasse 3) klassifiziert. Aufgrund der Klassifizierung durch die IARC wurde angenommen, dass die Substanzen der Klasse 1, 2A und 2B ein erhöhtes Potential besitzen DNA-Addukte zu bilden, welche detektiert werden sollten. Im Gegensatz dazu wurde bei den Substanzen, die nach der IARC Kategorisierung in die Klasse 3 eingeteilt wurden, keine Adduktbildung erwartet. Dagegen bestand bei den Substanzen, die aufgrund von epidemiologischen Literaturangaben und aufgrund von Hinweisen aus dem DEREK-Programm ausgewählt wurden, ein Verdacht auf DNA-Adduktbildung. Um eine Abschätzung der Korrelation von Adduktbildung und Kanzerogenität sowie Mutagenität durchführen zu können, werden in den nachfolgenden Tabellen die eigenen Ergebnisse aus dem ^{32}P -Postlabeling Verfahren und die Literaturdaten zu den Ergebnissen der bisher durchgeführten und veröffentlichten Genotoxizitäts- und Mutagenitätstests zusammengestellt.

Bei den Testverfahren handelt es sich z.B. um den

- a) Ames Test, Testsystem zum Nachweis des mutagenen Potentials von Substanzen an Mikroorganismen, Zell- oder Gewebekulturen
- b) CA: Chromosomenaberrationstest, Nachweis der Abweichungen von der normalen Chromosomenzahl oder der strukturellen Abweichungen einzelner Chromosomen (Chromosomenbrüche), Nachweis des klastogenen Potentials von Substanzen meist an permanenten Fibroblastenzellen vom chinesischen Hamster, aber z.T. auch an menschlichen peripheren Lymphozyten
- c) DL: Dominant-Letaltest, Bestätigungstest für mutagene Substanzen, Untersuchung der Induktion von dominanten Letalmutationen in Nagetieren (Keimbahneffekte)
- d) ML: Maus-Lymphom-Test: Erfassung von Gen- und Chromosomenmutationen an L5178Y-Zellen
- e) MK: Mikrokerntest, Abklärung des gentoxischen Potentials von Agenzien, indirekte Messung der Induktion von z.T. strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen (*in vivo*, *in vitro*), Nachweis des aneugenen und klastogenen Potentials einer Substanz
- f) SCE: Sister Chromatid Exchange, Schwesterchromatidaustausch, empfindlicher Indikatorrest im Rahmen von Genotoxizitätsprüfungen, Nachweis von reziproken Austauschen zwischen den DNA-Molekülen eines replizierenden Chromosoms
- g) UDS: Unscheduled DNA Synthesis, DNA-Reparaturtest in primären Hepatozyten zur Erkennung genotoxischer Einflüsse chemischer Substanzen

Tabelle 39: Zusammenstellung der Untersuchungs- und Literaturergebnisse für Substanzen der IARC Gruppe 1, 2A und 2B

Substanz	Adlukte (in Leber):	IARC:	Krebsverdacht:	Ames:	CA:	DL:	ML:	IMK:	SOE:	UDS:
Azathioprin	neg.	1	Lymphome (Non-Hodgkin) Leukämie	pos.	pos.	pos.	kD.	pos.	pos./neg.	pos.
Busulfan	neg.	1	Leukämie, Niere, Uterus	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
Chlorambucil	neg.	1	Leukämie	pos.	pos.	pos.	kD.	pos.	pos.	pos.
Cyclophosphamid	neg.	1	Blase, Leukämie,	pos.	pos.	pos.	kD.	pos.	pos.	pos.
Melphalan	neg.	1	Leukämie	pos.	pos.	pos.	kD.	pos.	pos.	pos.
Methoxsalen ohne UV	pos. (Ratte)	1		pos.	pos./?	kD.	kD.	?	pos./?	pos.
Thiotepa	neg.	1	Leukämie	pos.	pos.	pos.	kD.	pos.	pos.	pos.
Carmustin	neg.	2A	Leukämie	pos.	pos.	kD.	kD.	pos.	pos.	kD.
Chloramphenicol	neg.	2A	Leukämie	neg.	pos.	?	pos.	kD.	pos.	pos.
Doxorubicin Hydrochlorid	pos. (Ratte + Affe, w.)	2A	Leukämie	pos.	pos.	pos.	kD.	pos.	pos.	pos.
Metronidazol	neg.	2B	Cervix	pos.	pos./neg.	kD.	kD.	pos./neg.	pos./?	pos./neg.
Propylthiouracil	neg.	2B	Lunge	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.

kD.: keine publizierten Daten, ?: fraglicher Testausfall

In der oben aufgeführten Tabelle 39 werden die Untersuchungsergebnisse und die Literaturdaten der Substanzen, die nach der IARC-Bewertung in die Kategorie 1, 2A und 2B eingeteilt wurden, zusammengefasst.

Die aufgeführten Substanzen der Klasse 1 weisen zum größten Teil eindeutig positive Ergebnisse in den Tests der Standardtestbatterie auf. Auffällig bei der ^{32}P -Postlabeling Analyse ist, dass die untersuchten Substanzen der IARC 1 Kategorie, bis auf Methoxsalen, welches hier ohne UV-Lichtbestrahlung untersucht wurde, alle ein negatives Ergebnis zeigten, obwohl die Wirkungsweise der Substanzen eine DNA-reaktive ist.

Die untersuchten Substanzen gehören zum größten Teil in die Gruppe der Alkylantien, welche Zytostatika beinhaltet, die mit nucleophilen Verbindungen, wie Phosphat-, Amino-, Sulfhydryl-, Hydroxyl-, Carbonyl- oder Imidazolgruppen kovalente Bindungen (Alkylierung) eingehen können.

Azathioprin gehört nicht zu den Alkylantien, sondern zu den Purinantagonisten aus der Gruppe der Zytostatika. Wichtig für die Wirkungsweise dieses inaktiven Prodrugs ist die Metabolisierung zu 6-Mercaptopurin und weiter zur 6-Thioharnsäure. Aufgrund dieser benötigten metabolischen Umwandlung und der Tatsache, dass ein Wirkungserfolg erst in Wochen bis Monaten einsetzt, kann gefolgert werden, dass die Aktivität der Xanthinoxidase zur Metabolisierung des 6-Mercaptopurin in den Leberschnitten nicht ausgereicht hat, um Addukte zu bilden, oder dass diese Metabolisierung dazuführte, dass die entstandenen Addukte aufgrund ihrer geringen Größe mit dem verwendeten ^{32}P -Postlabeling-Verfahren nicht detektiert werden konnten (Abbildung 19).

Busulfan, ein symmetrischer Methansulfonsäureester, gehört zur Gruppe der Alkylantien und wird in die Untergruppe der Alkylsulfonate eingeteilt. Seine antineoplastische Wirkung richtet sich ziemlich selektiv auf das Knochenmark. Die aktive Form des Busulfans ist eine zyklische Sulfoniumverbindung. Aufgrund des Targetorgans, dem Knochenmark und der notwendigen Metabolisierung lässt sich eine negative DNA-Addukt-Analyse folgern (Abbildung 21).

Chlorambucil, ein aromatisches Stickstofflostderivat aus der Gruppe der Alkylantien, zeigte im eingesetzten ^{32}P -Postlabeling-Verfahren ein negatives Ergebnis, obwohl in der Literatur DNA Addukte beschrieben wurden (Abbildung 23). Dies lässt sich durch die Größe der alkylierenden Zentren der Substanz erklären, die nur sehr kleine Addukte verursachen, die nur in einer HPLC Methode mit ^{14}C -markierten Chlorambucil detektiert werden konnten (Bank, 1992). Aus dieser Tatsache lässt sich ableiten, dass die eingesetzte DNA-Addukt-Analyse für Substanzen, die kleine reaktive Metaboliten bilden, um ihre Reaktion ausüben zu können, nicht geeignet ist.

Cyclophosphamid, ebenfalls ein Stickstofflost-Derivat aus der Gruppe der Alkylantien, durchläuft vor Wirkungseintritt eine Metabolisierung in der Leber über eine Hydroxylierung zu 4-Hydroxy-Cyclophosphamid (toxischer Metabolit), anschließend erfolgt eine Ringspaltung zu Aldophosphamid, welches weiter zu Acrolein (toxischer Metabolit) und Phosphosäureamid-Lost (zytostatischer Metabolit) metabolisiert wird. Diese Verstoffwechslung ist hauptsächlich von der Aktivität der mischfunktionellen Monooxygenasen aus der Leber abhängig. Die DNA-Addukt-Analyse in weiblichen Rattenleberschnitten (Abbildung 27) und in weiblichen Affenleberschnitten fiel negativ aus (Abbildung 29). In der Literatur wurde allerdings in einem *in vitro* Versuch ein Addukt identifiziert (Maccubbin, 1991). Jedoch kam hier Cyclophosphamid zum Einsatz, welches zuvor metabolisch aktiviert wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass die Aktivität der mikrosomalen Leberenzyme im eingesetzten Verfahren nicht ausreichend war. Andererseits aber hat Kallama (1984) herausgefunden, dass die mit einer HPLC-Methode identifizierten Addukte nur eine sehr geringe Halbwertszeit von 1-3 Stunden bei 37°C besitzen, so dass die hier eingesetzte Inkubationszeit von 6 Stunden eine Detektion der Addukte verhindert haben könnte.

Melphalan, ein Stickstofflost-Derivat aus der Gruppe der alkylierenden Zytostatika, ist in der Lage über die Bildung von Carboniumzwischenstufen Guanosinbasen der DNA zu alkylieren und zwei DNA-Stränge miteinander zu verknüpfen. Die DNA-Addukt-Analyse fiel in Leberschnitten weiblicher Ratten negativ aus (Abbildung 31).

Methoxsalen (ohne UVA Bestrahlung), ein interkalierendes Dermatikum, zeigte im eingesetzten ^{32}P -Postlabeling-Verfahren ein positives Ergebnis. Detektiert wurde ein Addukt, das bei der untersuchten Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das höchste Adduktlevel aufwies (Abbildung 33, 34, 35).

Thiotepa, ein Ethylenimin-Derivat aus der Gruppe der Alkylantien, enthält als funktionelle Gruppen mehrere an ein P-Atom geknüpfte Ethyleniminringe, die dem bei der Alkylierung der Stickstofflost-Derivate gebildeten Ethylenimmonium-Ion entsprechen. Die Untersuchung von Thiotepa ergab in der DNA-Addukt-Analyse ein negatives Ergebnis (Abbildung 37).

Die Substanzen, die durch die IARC in die Gruppe 2A eingeteilt wurden, zeigen bis auf Chloramphenicol in den Standarduntersuchungen auf Genotoxizität und Kanzerogenität zum größten Teil eindeutig positive Ergebnisse.

Carmustin, ein 2-Chlorethyl-Nitrosoharnstoffderivat aus der Gruppe der Alkylantien, zerfällt spontan zu einem 2-Chlorethylcarbonium-Ion, welches alkylierend wirkt und zu einem Isocyanatrest mit carbamylierenden (reagiert mit Aminen) Eigenschaften. Die DNA-Addukt-Analyse mit dem eingesetzten ^{32}P -Postlabeling-Verfahren fiel für Carmustin in Leberschnitten weiblicher Ratten negativ aus (Abbildung 39).

Chloramphenicol, ein Breitspektrumantibiotikum, hemmt die Peptidyl-Transferase in den 50S-Untereinheiten der Ribosomen und beeinträchtigt dadurch die Proteinsynthese der empfindlichen Bakterien. Beim Menschen kann durch Chloramphenicol die mitochondriale Proteinsynthese inhibiert werden, woraus eine dosisabhängige, reversible Störung der Hämatopoese resultiert. Dosisunabhängig kann der Einsatz von Chloramphenicol auch zu einer Knochenmarksaplasie mit Anämie, Leukopenie und Thrombopenie führen. Die inaktiven Ester müssen durch Esterasen gespalten werden, bzw. in der Leber hydrolysiert werden, damit Chloramphenicol in die aktive Form überführt wird. Mit Hilfe des eingesetzten ^{32}P -Postlabeling-Verfahrens konnten keine Addukte in Rattenleberschnitten detektiert werden (Abbildung 41).

Doxorubicin, ein Anthracyclin-Derivat aus der Gruppe der Zytostatika, kann mit Hilfe des Tetracyclinringsystems zwischen Basenpaaren der DNA-Doppelhelix interkalieren. Aufgrund der Chinon-Hydrochinon-Struktur wirkt Doxorubicin als Elektronenakzeptor und begünstigt dadurch die Bildung von Peroxidradikalen, die ausgeprägte zytotoxische, membranschädigende Eigenschaften besitzen. In der DNA-Addukt-Analyse wurden sowohl in mit Doxorubicin behandelten Leberschnitten weiblicher Ratten (Abbildung 43, 45), als auch in Leberschnitten weiblicher Affen (Abbildung 47) Addukte gefunden. Auffällig waren die zytotoxischen Reaktionen in den Leberschnitten weiblicher Ratten, die anhand der mitgeführten Kaliumbestimmung bei Konzentrationen von 50 und 100 µg/mL ermittelt wurden. Das Adduktpattern von 4 verschiedenen Addukten wurde sowohl in den Rattenleberschnitten, als auch in den Affenleberschnitten detektiert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Wirkungsweise von Doxorubicin in der Ratte auf den Affen übertragbar ist. Auffällig sind jedoch die unterschiedlichen RAL-Werte. In den Ratten wurden RAL-Werte von 21, 73 und 50 Addukten/10⁹ Nukleotiden bei Konzentrationen von 5, 10 und 20 µg/mL gefunden, wohingegen beim Affen 167,5 und 546 Addukte/10⁹ Nukleotiden bei Konzentrationen von 10 und 20 µg/mL ermittelt wurden. Der Affe scheint damit empfindlicher auf die Behandlung mit Doxorubicin zu reagieren.

Metronidazol, ein Nitroimidazol-Derivat, wird in die Gruppe der synthetischen Chemotherapeutika eingeordnet. Der antimikrobielle, bakteriostatische bis bakterizide Wirkmechanismus beruht auf einer Reduktion der Nitrogruppe, durch mikrobielle Nitroreduktasen, die bevorzugt unter anaeroben oder hypoxischen Bedingungen abläuft. Hierbei entstehen hochreaktive radikalische Zwischenprodukte, die kovalent an Makromoleküle, vor allem an Proteine und DNA binden können. Nachfolgend kommt es zur Hemmung der Protein- und Nukleinsäurebiosynthese sowie zu mutagenen und genotoxischen Effekten mit Chromosomendefekten und DNA-Strangbrüchen. Bei der Zusammenstellung der Literaturdaten fielen uneinheitliche Ergebnisse in Bezug auf die Tests der Standardtestbatterie auf. Dies lässt sich durch unterschiedlich eingesetzte Protokolle und Konzentrationen begründen. Die Untersuchung von Metronidazol ergab in der DNA-Addukt-Analyse an Rattenleberschnitten ein negatives Ergebnis (Abbildung 49). Aufgrund der aeroben Bedingungen, die im eingesetzten ³²P-Postlabeling-Verfahren herrschten, kann die Reduktion der Nitrogruppe nur unzureichend erfolgt sein, so dass die Wirkungsweise von Metronidazol nicht in vollem Umfang zum Einsatz kommen konnte.

Propylthiouracil, ein Thyreostatikum, kommt zur Behandlung von Schilddrüsenüberfunktionen zum Einsatz. Durch Hemmung des intrathyreoidalen Peroxidase-System wirkt Propylthiouracil thyreostatisch. In der Literatur sind keine Daten zur Genotoxizität und Mutagenität von Propylthiouracil beschrieben. Die DNA-Addukt-Analyse fiel in Rattenleberschnitten negativ aus (Abbildung 51).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Darstellung von Addukten mit dem eingesetzten ³²P-Postlabeling-Verfahren bei der Untersuchung von alkylierenden Substanzen nicht erfolgreich gelungen ist. Dies kann durch die Größe und die Halbwertszeit der Addukte, der Metabolisierungsrate der Substanzen einschließlich der Enzymaktivität der Monooxygenasen und der unterschiedlichen Zielorgane verursacht worden sein.

Tabelle 40 zeigt die Zusammenstellung der Substanzen, die laut der IARC-Bewertung in die Gruppe 3 eingeordnet wurden, samt Untersuchungsergebnissen zur Adduktanalytik und Literaturdaten zur Genotoxizität, Mutagenität und Kanzerogenität.

Tabelle 40: Zusammenstellung der Untersuchungs- und Literaturergebnisse für Substanzen der Gruppe 2

Substanz:	Addukte (in Leber):	IARC:	Krebsverdacht:	Ames:	CA:	DL:	ML:	MK:	SCE:	UDS:
Ampicillin	neg. (Ratte, w.)	3	Lunge	neg.	pos./ neg.	kD.	neg.	neg.	neg.	kD.
Chloralhydrat	neg. (Ratte, w.)	3	Lunge	pos.	pos./ ?	kD.	kD.	pos.	pos./ ?	kD.
Furazolidon	neg. (Ratte, w.)	3	Cervix	pos.	pos.	kD.	kD.	kD.	pos.	pos.
Isoniazid	neg. (Ratte, w.)	3	Gallenblase	pos.	?	kD.	neg.	kD.	?	neg.
Nitrofurantoin	neg. (Ratte, w.)	3	Lippe	pos.	pos.	kD.	pos.	kD.	pos.	neg.
Paracetamol	neg. (Ratte, w.)	3	Prostata	neg.	pos.	kD.	pos.	pos.	pos.	?
Theophyllin	neg. (Ratte, w.)	3		pos./ neg.	pos./ neg.	kD.	kD.	pos./ neg.	pos.	pos.

kD.: keine publizierten Daten, ?: fraglicher Testausfall

Ampicillin, ein Aminopenicillin, gehört zur Gruppe der β -Lactam-Antibiotika und wirkt über die Blockade der Mureinsynthese an der Bakterienzellwand. Die Penicilline wirken selektiv auf Bakterienzellen, in dem sie die für die Quervernetzung des Mureins notwendige Transpeptidase irreversibel hemmen. Im eingesetzten ^{32}P -Postlabeling-Verfahren zeigte Ampicillin in weiblichen Rattenleberschnitten keine Addukte (Abbildung 53).

Chloralhydrat, ein Hypnotikum, stammt aus der Gruppe der Aldehyde. Seine Wirkung wird erst nach der Reduktion zu Trichlorethanol durch die Alkoholdehydrogenase in der Leber aktiviert. Die DNA-Addukt-Analyse fiel in Rattenleberschnitten negativ aus (Abbildung 55).

Furazolidon, ein Breitbandantibiotikum aus der Gruppe der Nitrofurane, wird als Hohlraumtherapeutikum bei infektiösen Enteritiden eingesetzt. Die Untersuchung von Furazolidon ergab in der DNA-Addukt-Analyse an Rattenleberschnitten ein negatives Ergebnis (Abbildung 57).

Isoniazid, ein Antituberkulotika, gehört zu den Basispräparaten gegen die Tuberkulose. Isoniazid wird nahezu vollständig metabolisiert, wobei Acetyltransferasen und die Monooxygenasen die Hauptaufgabe der Metabolisierung übernehmen. Durch Azetylierung zu Acetylisoniazid verliert Isoniazid seine tuberkulozide Wirkung und Neurotoxizität. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist genetisch bestimmt. In der Literatur sind DNA-Addukte aus *in vivo* Versuchen an Mäusen beschrieben worden (Maru, 1987). Allerdings fiel die DNA-Addukt-Analyse mit dem eingesetzten ^{32}P -Postlabeling-Verfahren in Rattenleberschnitten negativ aus (Abbildung 59).

Nitrofurantoin, ein Chemotherapeutikum zur Behandlung von Harnwegsinfektionen, wird erst durch die intramikrobielle, reduktive Umwandlung zum aktiven Agens. Seine Wirksamkeit ist an das Vorliegen eines pH-Wertes von < 5 gebunden. In der DNA-Addukt-Analyse wurden in mit Nitrofurantoin behandelten Leberschnitten weiblicher Ratten keine Addukte detektiert (Abbildung 61). Aufgrund der pH Bedingungen im eingesetzten ^{32}P -Postlabeling-Verfahren ist es möglich, dass die Wirkung von Nitrofurantoin nur unvollständig entwickelt wurde.

Paracetamol, ein Anilinderivat, gehört in die Gruppe der nichtsauren, antipyretischen Analgetika. Paracetamol wird durch Cytochrom P450 Enzyme zu reaktiven Metaboliten, z.B. zu N-Acetyl-p-Benzochinonimin umgewandelt, welches dann in der Lage ist mit Makromolekülen zu reagieren. Dies tritt meist nur nach Glutathionmangel auf, da ansonsten das Benzochinonimin mit Glutathion zum Ausscheidungsprodukt Paracetamol-Mercapturat umgewandelt wird. Dies wird durch die Arbeit von Prenez (1998) bestätigt, der DNA-Addukte nur nach Glutathiondepletion gefunden hat. Aus diesem Grund wurden vermutlich durch die ausreichende Glutathionkonzentration im eingesetzten ³²P-Postlabeling-Verfahren keine Addukte in Rattenleberschnitten gefunden (Abbildung 63).

Theophyllin, ein Bronchospasmolytikum, entstammt der Gruppe der Methylxanthine und entwickelt seine Wirksamkeit indirekt durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP's. Auffällig sind die uneinheitlichen Literaturangaben bezüglich der Testergebnisse auf Kanzerogenität und Mutagenität, welches durch unterschiedliche, eingesetzte Konzentrationen und Protokolle begründet werden kann. Die DNA-Addukt-Analyse fiel in Leberschnitten weiblicher Ratten negativ aus (Abbildung 65).

Tabelle 41 stellt die Untersuchungsergebnisse der DEREK-positiven Substanzen zur Adduktanalytik, sowie die Begründungen der DEREK-Warnungen (sogenannte Alerts) und die Literaturdaten zur Genotoxizität, Mutagenität und Kanzerogenität zusammen.

Tabelle 41: Zusammenstellung der Untersuchungs- und Literaturergebnisse für Substanzen der Gruppe 3

Substanz:	Addukte (in Leber):	DEREK:	Krebsverdacht:	Ames:	CA:	DL:	ML:	MK:	SCE:	UDS:
Acetazolamid	pos. (Ratte, w.) neg. (Affe, w., m.)	Karzinogenität: aromatisches Amid Mutagenität: aromatisches Amid Schilddrüsentoxizität, Hyperplasie des Blasenurothels: Arylsulphonamid	Endometrium Lymphat. Leukämie	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.
Chlorpromazin Hydrochlorid	neg. (Ratte, w.)	Karzinogenität: aromatisches Amin Photoallergie: halogenierte aromatische Verbindung	pos.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.
Cindamycin Hydrochlorid	neg. (Ratte, w.)	Karzinogenität: alkylierendes Agens Mutagenität: alkylierendes Agens Hautsensibilisierung: Haloalkan	Brust Magen	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.
Gentamicinsulfat	neg. (Ratte, w.)	Karzinogenität: sekundäres Amin	myeloi. Leukämie	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.
Phenylephrin Hydrochlorid	neg. (Ratte, w.)	Karzinogenität: sekundäres Amin Hautsensibilisierung: Phenol	neg.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.
Procainamid Hydrochlorid	neg. (Ratte, w.)	Karzinogenität: aromatisches Amin Hautsensibilisierung: aromatisches primäres oder sekundäres Amin	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	neg.	kD.	neg.
Promethazin Hydrochlorid	neg. (Ratte, w.)	Karzinogenität: aromatisches Amin	Leber	neg.	neg.	kD.	kD.	kD.	?	neg.
Propranolol Hydrochlorid	neg. (Ratte, w.)	Karzinogenität: sekundäres Amin	Lunge, Trachea, Bronchien	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	neg.
Fluocinolonacetat	neg. (Ratte, w.)	Hautsensibilisierung: 1,2-Dicarbonyl Verbindung		kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.
Hydrocortison	pos. (Ratte, w.) neg. (Affe, w., m.)	Mutagenität: alpha, beta ungesättigtes Keton (Alte DEREK-Version) Hautsensibilisierung: 1,2-Dicarbonyl Verbindung	neg.	pos.	kD.	kD.	kD.	pos.	pos.	pos./neg.
Kaliumcancrenoat	pos. (Ratte, w.; Affe, w., m.)	Genotoxizität: 3-keto, 4-delta, 6-delta Steroid Hautsensibilisierung: alpha, beta ungesättigtes Keton	neg.	pos.	kD.	pos.	pos.	pos.	kD.	pos.
Medryson	neg. (Ratte, w.)	Mutagenität: alpha, beta ungesättigtes Keton (Alte DEREK-Version)	Uterus	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.
Triamcinolon	neg. (Ratte, w.)	Hautsensibilisierung: 1,2-Dicarbonyl Verbindung	Leber	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.	kD.

Acetazolamid, ein Diuretikum aus der Gruppe der Carboanhydrasehemmstoffe, schränkt die tubuläre Rückresorption von Bicarbonationen stark ein und erhöht die Ausscheidung von Natrium- und Kaliumionen. Zu Acetazolamid sind keine Daten bezüglich der Standardtestbatterie-Ergebnisse publiziert. Die DNA-Addukt-Analyse mit dem eingesetzten ^{32}P -Postlabeling-Verfahren zeigte in Rattenleberschnitten bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ ein positives Ergebnis (Abbildung 67). Die Untersuchung in Leberschnitten von Affen fiel dagegen negativ aus (Abbildung 69, 71). Aufgrund des Zielorgans von Acetazolamid wurden zusätzlich noch Nierenschnitte von Affen mit dem ^{32}P -Postlabeling-Verfahren untersucht. Auch hier wurden keine Addukte detektiert (Abbildung 73, 75). Als Positivkontrolle wurde bei der Untersuchung von Affenleberschnitten Tamoxifen eingesetzt. Hier fiel ein geschlechtlicher Unterschied in bezug auf die RAL-Werte auf, denn die Leberschnitte männlicher Affen zeigten ein stärker positives Ergebnis (Abbildung 70) als die Leberschnitte weiblicher Affen (Abbildung 72). Dagegen fiel die Untersuchung von Tamoxifen in weiblichen Affenleberschnitten schwach positiv aus (Abbildung 76), wohingegen bei den Nierenschnitten männlicher Affen keine Tamoxifen-Addukte detektiert werden konnten (Abbildung 74). Dies deutet auf eine geschlechtsspezifische, unterschiedliche Empfindlichkeit hin. Zusätzlich wird dies durch die Tatsache unterstützt, dass die Nieren männlicher Affen empfindlicher auf Acetazolamid reagieren. Bei gleichen Konzentrationen, die sowohl mit den Nierenschnitten weiblicher Affen als auch männlicher Affen inkubiert wurden, konnte mit Hilfe der Kaliumbestimmung eine Cytotoxizität in den männlichen Affenleberschnitten festgestellt werden.

Chlorpromazin Hydrochlorid, das antipsychotische Neuroleptikum wirkt zentral dämpfend, antiemetisch, lokalanästhetisch, ganglienblockierend, anticholinergisch, adrenolytisch und antihistaminisch. In der Literatur ist ein positiver Ames-Test beschrieben. Die DNA-Addukt-Analyse mit dem eingesetzten ^{32}P -Postlabeling-Verfahren in Rattenleberschnitten ließ keine Addukte detektieren (Abbildung 77).

Clindamycin Hydrochlorid ist ein Antibiotikum, welches durch die Hemmung der ribosomalen Proteinsynthese seine überwiegend bakteriostatische Wirkung entwickelt. In der Literatur sind weder Daten zur Genotoxizität noch zur Mutagenität vorhanden. Die DNA-Addukt-Analyse fiel in Leberschnitten weiblicher Ratten negativ aus (Abbildung 79).

Gentamicinsulfat, ein Aminoglykosid-Antibiotikum, kommt bei schweren Infektionen zum Einsatz. Zu Gentamicinsulfat sind keine Daten bezüglich der Standardtestbatterie-Ergebnisse publiziert. Die Untersuchung von Gentamicinsulfat ergab in der DNA-Addukt-Analyse an Rattenleberschnitten ein negatives Ergebnis (Abbildung 81).

Phenylephrine Hydrochlorid, ein Sympatomimetikum, wird lokal als Vasokonstringens angewandt. In der Literatur wird ein negativer Ames-Test beschrieben. Es wurden keine Addukte in dem eingesetzten DNA-Addukt-Verfahren erkannt (Abbildung 83).

Bei **Procainamid Hydrochlorid**, ein Antiarrhythmikum, beschränken sich die Literaturdaten zur Standardtest-Batterie auf einen negativen UDS Test und einen negativen Mikrokerntest. Die Adduktanalyse ergab in weiblichen Rattenleberschnitten ein negatives Ergebnis (Abbildung 85).

Promethazin Hydrochlorid, ein Phenothiazin-Derivat, ist ein starkes Antihistaminikum und kommt bei allergischen Erkrankungen zum Einsatz. Die Literaturdaten zum SCE sind uneinheitlich. Die DNA-Addukt-Analyse fiel in weiblichen Rattenleberschnitten negativ aus (Abbildung 87).

Propranolol Hydrochlorid, ein Beta-Rezeptorenblocker ist u.a. indiziert zur Behandlung von koronaren Herzerkrankungen. Ein negativer UDS Test findet sich in der Literatur. Im eingesetzten ³²P-Postlabeling-Verfahren zeigte Propranolol Hydrochlorid in weiblichen Rattenleberschnitten keine Addukte (Abbildung 89).

Für **Flucinolonacetonid**, ein synthetisches Nebennierenrindenhormon, wurden weder Daten zur Genotoxizität noch zur Mutagenität publiziert. Es wurden in der DNA-Addukt-Analyse keine Addukte detektiert (Abbildung 91).

Hydrocortison, ein Glukokortikoid, mit antiphlogistischer und verzögert immunsuppressiver Wirkung. Bis auf widersprüchliche Ergebnisse im UDS Test sind die Literaturdaten zur Standardtestbatterie von Bali, 1990 beschrieben.

In der DNA-Addukt-Analyse wurden bei den mit Hydrocortison behandelten Leberschnitten weiblicher Ratten (Abbildung 93, 95) Addukte gefunden. Die RAL-Werte bewegten sich zwischen 30, 21 und 52 Addukten/10⁹ Nukleotiden bei untersuchten Konzentrationen von 50, 100 und 500 µg/mL Hydrocortison (Grafik 4). Auffällig war die unzureichende chromatographische Auflösung der Addukte bei einer eingesetzten Konzentration von 1000 µg/mL Hydrocortison. Aus diesem Grund wurde dieses Chromatogramm nicht zur Auswertung herangezogen.

Kaliumcanrenoat gehört in die Gruppe der Aldosteron-Antagonisten und blockiert kompetitiv die Bindung von Aldosteron, was zu einer Steigerung der Natrium- und Chloridausscheidung führt. Die Literaturdaten zur Genotoxizität und Mutagenität ergaben bis auf einen negativen AMES Test positive Ergebnisse im CA, COMET, Mikrokerntest, Maus Lymphoma und im UDS Test. In Rattenleberschnitten konnte bei einer Konzentration von 20 µg/mL ein Addukt mit dem RAL-Wert von 21 Addukten/10⁹ Nukleotiden detektiert werden (Abbildung 97). Kaliumcanrenoat stellte sich bei Konzentrationen ab 200 µg/mL als cytotoxisch dar. Die Untersuchung von Kaliumcanrenoat in Leberschnitten männlicher Affen konnte das positive Ergebnis aus den Rattenleberschnitten untermauern (Abbildung 99). Hier wurden bei eingesetzten Kaliumcanrenoat-Konzentrationen von 20 und 50 µg/mL RAL-Werte von 32,5 bzw. 41 Addukten/10⁹ Nukleotiden ermittelt (Grafik 5). Das Adduktmuster in Leberschnitten weiblicher Affen zeigte im Gegensatz zu dem Ergebnis in den männlichen Affenleberschnitten bei den gleichen Konzentrationen vier verschiedene Addukte (Abbildung 103) mit Gesamt-RAL-Werten von 137,5 und 158,5 Addukten/10⁹ Nukleotiden (Grafik 6).

Aufgrund des Zielorgans von Kaliumcanrenoat wurden zusätzlich noch Nierenschnitte von Affen mit dem ³²P-Postlabeling-Verfahren analysiert. Die Untersuchung der Nierenschnitte männlicher Affen zeigte mit dem eingesetzten Verfahren keine Addukte (Abbildung 101), wohingegen bei den weiblichen Affennierenschnitten bei eingesetzten Kaliumcanrenoat-Konzentrationen von 20 und 50 µg/mL jeweils ein Addukt mit RAL-Werten von 3 bzw.

4,5 Addukten/10⁹ Nukleotiden detektiert wurde (Abbildung 105).

Diese Ergebnisse deuten auf eine Geschlechtsspezifität hinsichtlich der Empfindlichkeit auf Kaliumcanrenoat hin.

Medryson, ein Glukokortikoid, besitzt eine antiinflammatorische Wirkung. Zu Medryson sind weder Daten zur Mutagenität noch zur Genotoxizität publiziert. Die Adduktanalyse ergab in weiblichen Rattenleberschnitten ein negatives Ergebnis (Abbildung 107).

Triamcinolon, ein Corticosteroid, findet Anwendung in der Behandlung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Der Literatur sind keine Daten zur Standardtestbatterie zu entnehmen. Im eingesetzten ³²P-Postlabeling-Verfahren zeigte Triamcinolon in weiblichen Rattenleberschnitten keine Addukte (Abbildung 109)

Bei der Literaturrecherche fiel auf, dass für einige Arzneimittel, die sich schon seit mehr als 30 Jahren auf dem Markt befinden, nur unzureichende Untersuchungen bezüglich ihres mutagenen und genotoxischen Potentials publiziert sind. Dies trifft vor allem auf Acetazolamid, Chlorpromazin Hydrochlorid, Clindamycin Hydrochlorid, Fluocinolonacetonid, Gentamicinsulfat, Medryson, Phenylephrin Hydrochlorid, Propranolol Hydrochlorid, Propylthiouracil und Triamcinolon zu. Andere Arzneimittel wie zum Beispiel: Chloralhydrat, Chloramphenicol, Isoniazid, Methoxsalen ohne UVA und Metronidazol liefern aus der Literaturrecherche widersprüchliche Ergebnisse in den Standardtestuntersuchungen.

Laut Arzneimittelgesetz (AMG) vom 24. August 1976 werden neue Arzneimittel im Zulassungsverfahren auf Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit geprüft (§ 22-24). Die zu diesem Zeitpunkt bereits registrierten Arzneimittel werden im Rahmen der sogenannten „Nachzulassung“ auf Übereinstimmungen mit den Anforderungen des AMG (1976) überprüft (Übergangsbestimmungen). Außerdem können die unzureichenden Untersuchungen mit dem § 22 Art. 3 begründet werden, der anderes wissenschaftliches Erkenntnismaterial als das in § 22 Art. 2 Geforderte zulässt, sofern z.B. die Wirkungen und Nebenwirkungen des Arzneimittels bereits bekannt sind. Aus diesem Grund lässt sich erklären, dass die Literaturdaten zum genotoxischen und mutagenen Potential zum Teil nur unzureichend sind. Dagegen sind die widersprüchlichen Ergebnisse in den Standardtestuntersuchungen zumindest teilweise darauf zurückzuführen, dass unterschiedliche Konzentrationen, verschiedene Spezies/Stämme, Applikationsformen und Protokolle verwendet wurden.

Nach der Einführung der ICH-Guidelines (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use) S2A (Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals) und S2B (Guidance on Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals) wurde diesem Aspekt, der Uneinheitlichkeit der Ergebnisse mit der Auflage von spezifischen Untersuchungsprotokollen entgegengewirkt.

Zur Standardtestbatterie gehören neben einem Genmutationstest in Bakterien ein *in vitro* Test zur zytogenetischen Bewertung von Chromosomenschäden mit Säugetierzellen oder ein *in vitro* Maus-Lymphom tk Test und ein *in vivo* Test zur Untersuchung von Chromosomenschäden in hämatopoetischen Zellen von Nagern (Mikrokerntest).

Diese vorgeschlagenen Tests sollen allerdings nicht andeuten, dass andere Genotoxizitätstests (z.B. Tests zur Messung von DNA-Addukten, von DNA-Strang-Brüchen, von DNA-Reparatur oder –Rekombination) generell als ungeeignet und unzulänglich angesehen werden. Diese genannten Tests können als Ergänzung zur Standardtestbatterie herangezogen werden, um weitere Informationen über das genotoxische Potential einer Substanz gewinnen zu können.

5.1 DNA-Addukte - ein erster Schritt der Krebsentstehung

Bereits 1914 formulierte Boveri seine Theorie der somatischen Mutationen als Ursache für die Krebsentstehung. Danach entstehen Krebszellen infolge fälschlich zusammengefügter Chromosomenabschnitte, welche anschließend zu einer abnormen Proliferation der Krebszellen führen. Spätestens seit Boveri (1914) und Bauer (1928) wird Krebs auch als genetische Erkrankung angesehen. Krebs gehört aber auch zu unserem stammesgeschichtlichen Erbe des vielzelligen Lebens, das bei allen taxonomischen Gruppen der Eumetazoa (Gewebetieren) vorkommt. Krebs ist also prinzipiell keine Kreation der menschlichen Zivilisation (Weiss, 1972). Seine biologische Basis steht in enger Beziehung zu dem Grundphänomen der Unterordnung der Zellen unter das Differenzierungs- und Funktionsgefüge des gewebsspezifischen Organismus.

Krebs kann ohne äußeren Einfluss spontan entstehen; kann aber auch durch chemische, physikalische und biologische Umwelteinflüsse induziert werden. Ein erster Schritt sind neoplastische Zellen, die stereotyp eine unvollkommene Differenzierung zeigen und sich ungehemmt teilen. Nach heutigem Wissen wird die maligne Transformation vor allem durch Defekte in den Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen ausgelöst (Weinberg, 1996). In der normalen Zelle ist ihr Zusammenspiel ausgewogen. In Abhängigkeit vom Ort und von der Zeit kodieren sie Proteine, die Zellwachstum und -teilung unterstützen bzw. unterdrücken. Die Onko- und Suppressorgene sind die stammesgeschichtliche und genetische Basis des Krebsrisikos, auf die sowohl die äusseren als auch die inneren Faktoren einwirken.

Dies macht gleichzeitig den dualistischen Charakter der Krebsrisikofaktoren deutlich: auf der einen Seite die endogene, onkogen- und regulatorabhängige Empfindlichkeit des Individuums zur Krebsbildung und auf der anderen Seite die exogenen, mutations- und promotionsbedingenden Kanzerogene der Umwelt (Anders, 1989; Anders, 1991).

So wird Krebs zum Ergebnis eines mehrstufigen Prozesses von genetischen Fehlern und Veränderungen, deren Akkumulation in der Zelle zu ihrer Entartung führen kann (Cohen und Ellwin, 1991).

Die Anzahl der Ereignisse, die zur Bildung eines malignen Tumors erforderlich ist, ist noch ungeklärt. Jedoch wird die Untergliederung der Krebsentstehung in die Schritte Initiation, Promotion und Progression heute allgemein akzeptiert. Dieses Mehrstufenmodell wurde Anfang der 40er Jahre entwickelt (Berenblum, 1941; Friedwald, 1944).

In der Initiation, dem ersten Schritt der Kanzerogenese, entstehen potentielle Tumorzellen, die sich phänotypisch nicht von den umliegenden normalen Zellen unterscheiden. Die Initiation beruht auf der irreversiblen Veränderung des genetischen Materials, welche durch die chemische Reaktion eines Gefahrstoffes oder seines Metaboliten mit der zellulären DNA ausgelöst wird. Es entstehen hierbei DNA-Bindungsprodukte (sogenannte „Addukte“), die entweder stoffspezifisch oder unspezifisch erfasst werden können.

Die Wirksamkeit der Initiation scheint zeitlich von der DNA-Replikation und Zellteilung abzuhängen. Die DNA-Synthese wird damit zu einem entscheidenden Faktor für die Fixierung des DNA-Schadens und so für die Irreversibilität der Initiation. Im zweiten Schritt, der Promotion, werden die initiierten Zellen in morphologisch erkennbare, präneoplastische Zellen überführt, aus denen sich nachfolgend in weiteren Schritten (Konversion, Progression) benigne und maligne Tumore entwickeln können. Im Unterschied zur Initiation und Progression ist die Promotion reversibel. Der genaue Mechanismus der Umkehrbarkeit ist noch unklar, vermutlich besteht jedoch ein Zusammenhang zum individuellen Zelltod (Bursch, 1984). Heute wird angenommen, dass Veränderungen der Genexpression das molekulare Prinzip promovierender Einflüsse sind. Für die nachfolgende, experimentell abgrenzbare Stufe der Progression sind irreversible aneuploide bösartige Neoplasien charakteristisch (Pitot, 1989).

In der Tabelle 42 sind die heute bekannten, wesentlichen biologischen Charakteristika von Initiation, Promotion und Progression einander gegenübergestellt.

Tabelle 42: Biologische Merkmale der drei Kanzerogenesestufen Initiation, Promotion und Progression (nach Pitot 1996)

Initiation	Promotion	Progression
Irreversibel mit konstantem „Stammzell“-Potential	Reversibler Anstieg von Zellteilung und –wachstum von initiierten Zellpopulationen	Irreversibel Messbare und/oder morphologisch unterscheidbare Veränderungen in zellulärer Genomstruktur
Sensitiv gegenüber xenobiotischen und anderen chemischen Faktoren	Reversible Veränderungen der Genexpression	In früher Phase nimmt die Sensitivität gegenüber Umweltfaktoren zu
Spontanes Auftreten initiiertes Zellen nachweisbar	Bestand promovierter Zellpopulationen hängt von ständiger Anwesenheit des promovierenden Agens ab	Charakteristisches Auftreten von benignen und/oder malignen Neoplasien
Zur „Fixierung“ Zellteilung erforderlich	Sensitiv gegenüber Nahrungseinflüssen und hormonellen Faktoren	„Progressor“-Agens bewirkt Fortschreiten promovierter Zellen; auf dieser Stufe ohne Initiatorwirkung
Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigt keine messbare Schwellendosis	Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigt messbare Schwellendosis; max. Wirkung hängt von der Dosis des initiierten Agens ab	Spontane Progression nachweisbar
Relative Wirksamkeit der Initiatoren hängt vom Ausmass an vorrangigen Läsionen ab, die sich in nachfolgender Promotion ausprägen	Relative Wirksamkeit der Promotoren hängt von ihrer Fähigkeit ab, durch eine konstante Exposition die Ausweitung der initiierten Zellpopulation zu bedingen	

Ob ein Schaden an der DNA gesetzt wird und dieser Schaden dann letztlich zu einer malignen Transformation und zum Tumor führt, hängt wesentlich von den zahlreichen Abwehr- und Reparaturmöglichkeiten auf der Zell- und Gewebeebene ab. Hierzu zählen u.a. die Aufnahme- und Stoffwechselbarrieren gegenüber kanzerogenen Stoffen, die Immunabwehr und eine Reihe von DNA-Reparaturmechanismen (siehe Abbildung 113).

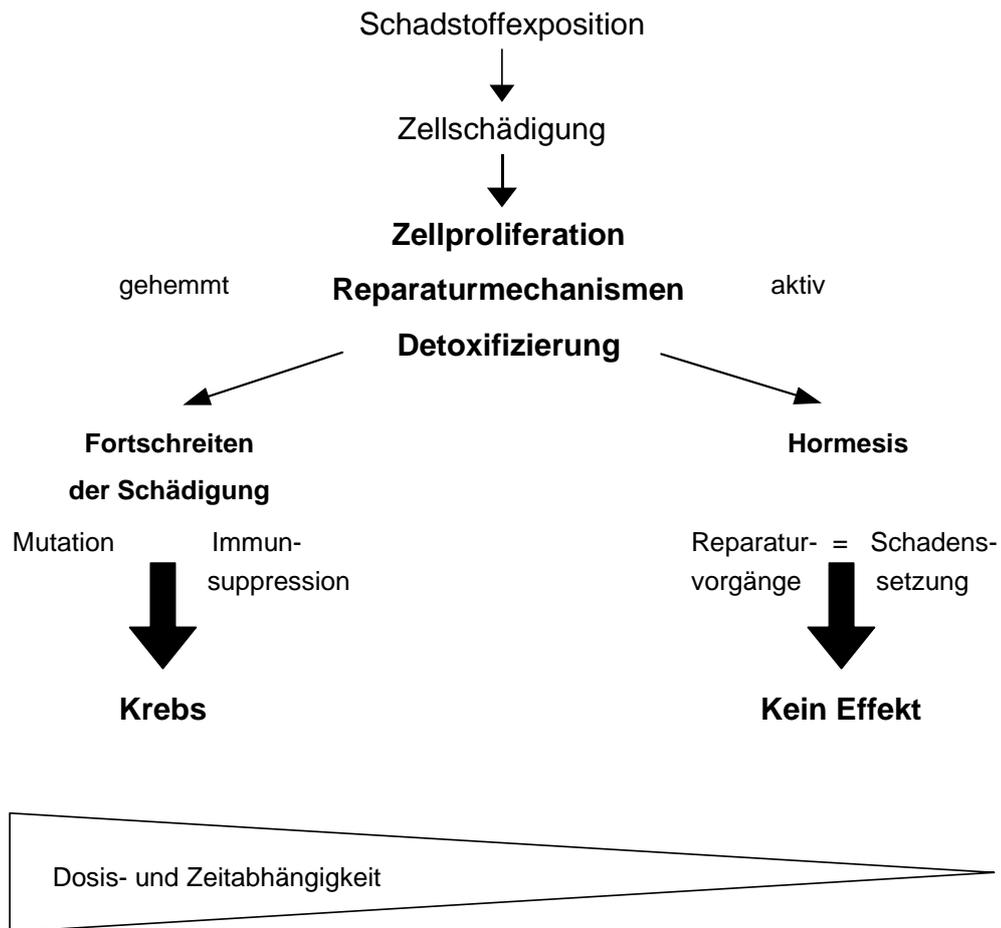


Abbildung 113: Rolle der Reparatur- und Immunmechanismen im Prozess der Kanzerogenese

Nach unterschiedlichen Schätzungen liegt die Zahl der DNA-Modifikationen pro Zelle und Tag zwischen 20000 und 100000 Veränderungen, die nahezu vollständig eliminiert und ausgeglichen werden (Sauls und Ames, 1986), was die Effektivität des Reparaturmechanismus unterstreicht. Wirken jedoch zusätzlich kanzerogene Umweltnoxen auf den Organismus ein, so nimmt das Ausmass der DNA- und Zellschädigung sowie die chemische Vielfalt zu. Gleichermäßen wird auch der Umfang und die Komplexizität der Reparatur- und Abwehrmechanismen ansteigen. Im normalen Lebenszyklus der Zelle besteht zwischen der Schadenssetzung und –reparatur ein Gleichgewicht.

Die spontanen und die induzierten Mutationen, wie sie im Niedrigdosis-Bereich auftreten können, werden in den meisten Fällen effizient repariert. Ein Konzentrationsanstieg der Umwelttoxine, eine Exposition über einen langen Zeitraum und die Schädigung sowie die Alterung der zellulären und geweblichen Abwehr können dieses Gleichgewicht stören und „überrennen“ so die Mechanismen der Belastungsverarbeitung. Aus diesem Grund nimmt neuerdings die Dosis-Wirkungsbeziehung für die DNA-Adduktbildung eine Rolle in der Bewertung von genotoxischen und mutagenen Substanzen ein.

Diese Dosis-Wirkungsbeziehung für die DNA Adduktbildung durch aktivitätsabhängige genotoxische Karzinogene wurde in zahlreichen Reviews diskutiert (Ehrenberg, 1991; Kitchin, 1994; Lutz, 1988; Lutz, 1990; Poirier; 1992; Swenberg; 1987).

Die experimentellen Aussagen der Reviews können folgendermaßen zusammengefasst werden:

Im niedrigen Dosisbereich ist eine Linearität zu finden, die im mittleren und hohen Dosisbereich häufig von Nichtlinearitäten abgelöst wird (Abbildung 114).

Im niedrigen Dosisbereich wird angenommen, dass die Raten aller zugehörigen Prozesse proportional zur Dosis ablaufen. Dies gilt offensichtlich für die Diffusionsprozesse und chemischen Reaktionen, aber auch die metabolische Aktivierung der Substanz und die Entgiftungsprozesse fallen darunter, sofern die Substanzkonzentration weit unter der Michaelis Menten Konstanten der jeweiligen enzymatischen Reaktionen liegt.

Im hohen Dosisbereich werden dagegen oft Unlinearitäten beobachtet, was zum einen damit zusammen hängt, dass der Entgiftungsmechanismus oder die Aktivität des DNA Reparaturprozesses ausgeschöpft wurde, und zum anderen, dass die metabolische Aktivität einen Sättigungsgrad erreicht hat.

Die Steigung der Kurve im niedrigen Dosisbereich kann als DNA-bindende Potenz der Karzinogene angesehen werden. Bei schwachen genotoxischen Karzinogenen kann die Steigung sehr flach verlaufen und sich statistisch nicht von Null unterscheiden. Dies sollte jedoch nicht als ein negatives Ergebnis gewertet werden, sondern es sollte bedacht werden, dass hier die DNA-bindende Potenz unter einem gewissen Detektionslimit liegt.

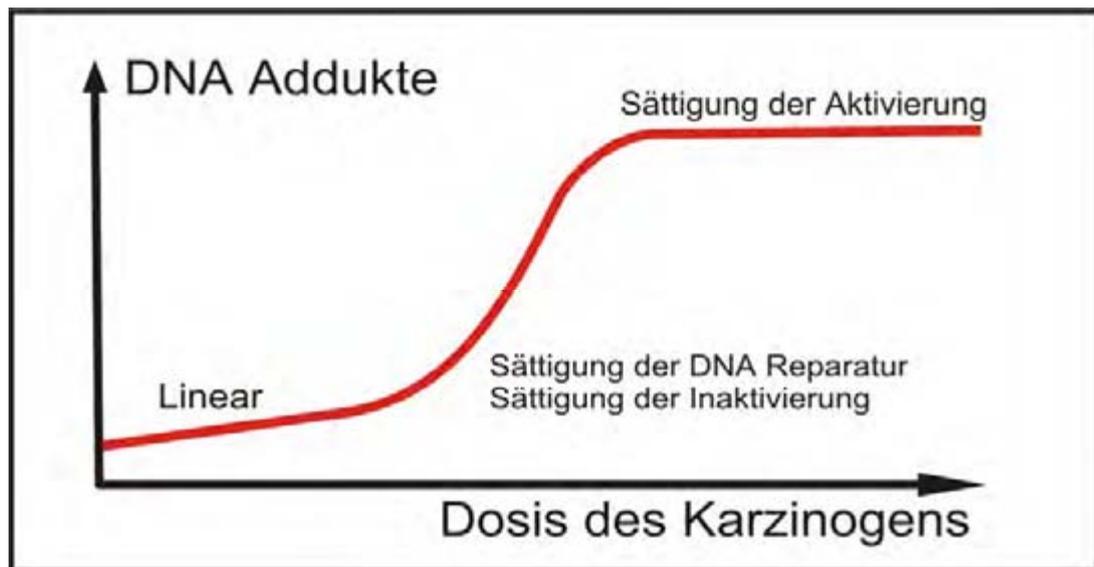


Abbildung 114: Schema der Beziehung zwischen Expositionsdosis und DNA-Addukt-Level

5.2 Methodendiskussion

Die Quantifizierung und Identifikation von geringen DNA-Addukt-Level verlangt Methoden mit einer hohen Sensitivität und Spezifität.

Die brauchbaren Methoden beinhalten neben dem ^{32}P -Postlabeling, die Fluoreszenz-Methoden, die GC/MS und die Immunoassays. In Abhängigkeit von dem Typ des untersuchten Addukts weist jede dieser Methoden Vor- und Nachteile auf.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die ^{32}P -Postlabeling Technik die vielseitigste und meist eingesetzte Methode zur Untersuchung auf DNA-Addukte, obwohl sie keine strukturellen Identifikationen liefert. Dieses Defizit kann durch das Mitführen von positiven Kontrollen reduziert werden. Hierbei werden zum Beispiel in der Literatur Addukt-Standards, wie 7-Methylguanin, 7-(Hydroxyethyl)guanin (Zhao, 1999), Tamoxifen (Hemminki, 1996; 1997), Acrolein und Crotonaldehyd-DNA-Addukte (Nath, 1996) eingesetzt. In dieser Arbeit wurde neben Tamoxifen zumeist CPA als positive Kontrolle und als Referenz-DNA mitgeführt, um die Methodik zu überprüfen und um einen internen Standard zu etablieren.

Die DNA-Addukt-Analyse in Gewebeschnitten ermöglicht eine Untersuchung von verschiedenen Substanzkonzentrationen aus ein und derselben Leber in einem *in vitro* Versuch. Aufgrund des Einsatzes von verschiedenen Geweben wird die Effizienz und Aussagekraft dieser Methode erhöht.

Allerdings erfordert dieses Verfahren einen großen zeitlichen Aufwand und stellt an die Einrichtung des Labors hohe Ansprüche.

Weiterhin birgt das ^{32}P -Postlabeling-Verfahren die Gefahr Adduktlevel zu unterschätzen, denn aufgrund der verschiedenen Schritte, wie z.B. DNA-Verdau, Addukt-Labeling durch Polynukleotidkinase und Adduktanreicherung potenzieren sich mögliche Fehlerquellen. Beispielsweise kann der Verdau der DNA nicht vollständig abgelaufen sein, die Labelingrate nicht effizient vonstatten gegangen sein und des weiteren ein Verlust der Addukte während der Anreicherung oder während der verschiedenen Chromatographieschritte, aufgrund unterschiedlicher Pufferkonzentrationen, eingetreten sein (Reddy, 2000).

Auch die eingesetzte ATP-Konzentration spielt eine Rolle bei dem effizienten Addukt-Labeling. So werden z.B. polyzyklische aromatische Hydrokarbon Addukte optimal bei einer ATP-Konzentration von 1-2 μM (Randerath, 1989; Reddy, 1991) gelabelt, wohingegen bei Thymin Glykol-Addukten und aromatischen Amin-Addukten Konzentrationen von 60 μM und mehr notwendig sind (Mourato, 1999; Reddy, 1991).

Das Adduktlevel und das spezifische Adduktpattern ist von verschiedenen Faktoren, wie z.B. von der Spezies, dem Stamm, dem Gewebe und dem Geschlecht (Gupta, R. 1996; Randerath, K. 1986; 1994) abhängig. Eine zusätzlich wichtige Rolle bei der DNA-Addukt-Analyse spielen die I-Compounds, die mit einigen wichtigen Charakteristika von Nath, 1996, beschrieben wurden:

- I-Compounds nehmen mit dem Alter zu

- Das Adduktpattern und das Adduktlevel ist abhängig vom Gewebe, von dem Geschlecht und dem Futter

- Fütterung einer carbohydratreichen Diät erhöht das Adduktlevel wohingegen die Fütterung einer fettreichen Diät dieses verringert

- Auch die Fütterung einer kalorienreduzierten Diät erhöht das Adduktlevel

- Die Behandlung mit nicht genotoxischen Karzinogenen (z.B.

- Kohlenstofftetrachlorid, Peroxisomenproliferatoren, Aroclor 1254) führt zu einer chronischen Verringerung von I-Compounds

- Das Adduktlevel zeigt in Maus und Ratte zirkadiane Unterschiede

- I-Compounds korrelieren positiv mit der mittleren Lebenserwartung

Diese I-Compounds erschweren die Auswertung der Chromatogramme und verdeutlichen die Notwendigkeit des Mitführens einer Negativkontrolle. Diese I-Compounds tragen zur Erhöhung des Hintergrundes bei und stören damit die Detektion der substanzbedingten Addukte.

Da die Lebern der unbehandelten Ratten und Affen, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, immer in den frühen Morgenstunden entnommen wurden und damit zirkadiane Effekte weitgehend ausgeschlossen sind, spielt beim Adduktlevel der I-Compounds vor allem das Alter der unbehandelten Tiere die entscheidende Rolle.

5.2.1 Altersbedingte Einflüsse auf die Adduktbildung

Die altersbedingten Einflüsse auf die Adduktbildung kommen vor allem bei der Behandlung von weiblichen Rattenleberschnitten mit Ampicillin, Azathioprin, Clindamycin Hydrochlorid, Medryson, Melphalan zum Ausdruck, denn in diesen Versuchen waren die eingesetzten Ratten bereits ca. 8,5 Monate alt. Auf den Chromatogrammen können erhöhte I-Compound Adduktpattern erkannt werden, welche sowohl in den Kontrollschnitten, als auch in den substanzbehandelten Schnitten auftreten. Aus diesem Grund sollte bei der experimentellen Planung darauf geachtet werden, dass sehr junge Tiere zum Einsatz kommen, um das Level der I-Compounds so gering wie möglich zu halten.

Der Einfluss auf die Ergebnisse und auf die Interpretation konnte in den Experimenten jedoch als gering eingestuft werden, da diese I-Compound bei der Auswertung berücksichtigt wurden und die RAL-Werte nach Abzug der Kontrolle ermittelt wurden.

5.2.2 Fütterungsbedingte Einflüsse auf die Adduktbildung

Da die Ratten, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, mit einer einheitlichen Diät gefüttert waren, spielen die fütterungsbedingten Einflüsse bei der Ausbildung von uneinheitlichen Pseudoaddukten hier eine untergeordnete Rolle.

5.2.3 Geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Adduktbildung

Die unterschiedlichen geschlechtsspezifischen I-Compounds werden vor allen Dingen bei der Behandlung von Affennierenschnitten mit Acetazolamid deutlich. Die Negativkontrolle der männlichen Affennierenschnitte zeigt ein deutliches Pseudoaddukt, wogegen die Negativkontrolle der Weiblichen vier I-Compounds erkennen lässt.

Auffällig ist bei diesem Versuch auch das Ergebnis der positiven Kontrolle, denn Tamoxifen zeigte im Gegensatz zu den Affennierenschnitten weiblicher Tiere bei den Nierenschnitten männlicher Affen ein negatives Ergebnis. Zusätzlich fiel auch ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Toleranz von Substanzkonzentrationen auf. Wobei z.B. die Behandlung mit Acetazolamid zeigte, dass die Nierenschnitte weiblicher Affen bei Substanzkonzentrationen von 100 µg/mL und 200 µg/mL keine zytotoxischen Erscheinungen aufwiesen, wohingegen die gleichen Behandlungskonzentrationen bei Nierenschnitten männlicher Affen eine starke zytotoxische Wirkung zeigte. Der Metabolismus dieser Substanz erscheint geschlechtsunterschiedlich abzulaufen, welches durch die Ausbildung des Tamoxifenadduktes in Nierenschnitten weiblicher Affen bestätigt wird.

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausbildung der Adduktpattern zeigen sich auch bei der Behandlung der Leberschnitte mit einzelnen Substanzen. Besonders deutlich wird der Unterschied bei der Behandlung von Affenleberschnitten mit Kaliumcanrenoat. Während die Leberschnitte männlicher Affen bei Behandlungskonzentration von 20 und 50 µg/mL ein deutliches Addukt aufweisen (Abbildung 99), können bei Leberschnitten weiblicher Affen vier Addukte bei gleichen Behandlungskonzentrationen detektiert werden (Abbildung 103).

5.2.4 Speziesspezifische Einflüsse auf die Adduktbildung

Auch speziesspezifische Unterschiede in der Ausbildung der Adduktpattern sind in dieser Arbeit erkennbar. Dies ist u.a. auch in dem Behandlungsversuch mit Kaliumcanrenoat zu erkennen, denn das Adduktpattern, welches in den behandelten Rattenleberschnitten entstanden ist, unterscheidet sich von seinem Ausmaß und Lokalisation von dem Pattern, welches bei den Affenleberschnitten detektiert wurde. Auch der Versuch mit Hydrocortison verdeutlicht die speziesspezifischen Unterschiede, denn in Rattenleberschnitten wurden Addukte ermittelt, wohingegen die Behandlung von Affenleberschnitten negativ ausfiel. Dies könnte auf Unterschiede im Metabolismus und in der CYP 450-Enzymausstattung hinweisen.

5.3 Fazit

Sollte eine Substanz uneinheitliche Ergebnisse in den Genotoxizitätstests zeigen und/oder in Kanzerogenitätstests ein positives Ergebnis liefern, jedoch in der Standardtestbatterie negativ ausfallen, so wäre es von Vorteil, wenn man die DNA-Addukt-Analyse zur Risikobewertung der Substanz mit hinzuziehen würde.

Denn diese DNA-Addukt-Analyse dient dem Zweck unter diesen Umständen herauszufinden, ob die fragliche Substanz oder ihre Metaboliten das Potential besitzen, direkt mit der DNA zu reagieren und dabei kovalente DNA-Addukte bilden können, oder ob lediglich ein epigenetisches Karzinogen vorliegt.

Ein negatives Ergebnis kann auf indirekte Mechanismen hinweisen, die eine Schwelle in den anderen Standardtests vermuten lassen.

Ein positives Ergebnis in der DNA-Addukt-Analyse führt dazu, dass weitere Untersuchungen und Anstrengungen unternommen werden müssen, um eine Aussage zur Sicherheit der untersuchten Substanz zu treffen.

Konservativ interpretiert ist die DNA-Addukt-Bildung ein toxischer Prozess, der keine Schwelle oder sicheren Grenzwert besitzt.

In dem CPMP (Committee for proprietary medicinal products) draft 2 vom 18.12.2002, herausgegeben von der EMEA (The European Agency for the evaluation of medicinal products, *Evaluation of Medicines for Human Use*) „Limits von genotoxischen Verunreinigungen“, wird die Festlegung des akzeptablen Dosislevels von Substanzen mit genotoxischem Potential generell als ein besonders kritisches Problem angesehen. Dieses Problem ist bisher in den existierenden Guidelines (Richtlinien) nicht speziell abgedeckt.

Aus diesem Grund wurde in diesem o.g. Papier ein genereller Rahmen und eine praktikable Herangehensweise beschrieben, in wieweit mit genotoxischen Verunreinigungen bei der neuen Wirkstoffentwicklung umgegangen werden soll.

Im aktuellen Zusammenhang wird die Klassifizierung einer Substanz als genotoxisch folgendermaßen beschrieben: Die eindeutigen Beweise für eine genotoxische Aktivität einer Substanz resultieren von positiven Ergebnissen aus *in vivo* Säugetiertests. Dabei werden die Beweise durch Ergebnisse aus *in vitro* Tests unterstützt. Bei den positiven Substanzen handelt es sich meistens um Tierkanzerogene, die im Verdacht stehen auch für den Menschen kanzerogen zu sein. Laut aktueller regulatorischer Praxis wird angenommen, dass Substanzen, die *in vivo* genotoxisch sind, ein Potential besitzen, DNA bei jedem eingesetzten Expositionslevel zu schädigen.

Diese Schäden können zu einer Tumorentwicklung führen. Aus diesem Grund ist es angebracht davon auszugehen, dass es für genotoxische Karzinogene keine erkennbare Schwelle gibt und dass jedes Level der Exposition ein Risiko birgt. Jedoch wird die Existenz von Mechanismen, die zu biologisch bedeutungsvollen Schwelleneffekten führen, immer mehr auch für genotoxische Events anerkannt. Dies gilt besonders auch für Substanzen, die nicht mit DNA-Strukturen reagieren. Auch für potentielle Mutagene, welche vor dem Kontakt mit kritischen Zielen detoxifiziert werden, werden Schwelleneffekte zunehmend anerkannt. Die regulatorische Herangehensweise an solche Chemikalien basiert zum einen auf der Identifikation des NOEL (No observed effect level) und zum anderen auf der Einbeziehung von Unsicherheitsfaktoren. Für Substanzen, die direkt mit DNA-Molekülen reagieren können, kann eine Extrapolation in einer linearen Art und Weise von Effekten im Hochdosisbereich zum Niedrigdosisbereich nicht gerechtfertigt werden. Dies lässt sich damit begründen, dass gerade im Niedrigdosisbereich verschiedene protektive Mechanismen sehr effektiv arbeiten.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist es sehr schwierig, experimentell einen klar abgegrenzten Schwellenwert für bekannte Mutagene unter Einbezug dieses Konzeptes nachzuweisen. Aus diesem Grund sollte bei Abwesenheit von geeigneten Beweisen für die Existenz eines Schwellenwertes bei genotoxischen Substanzen davon ausgegangen werden, dass kein sicherer Expositionsgrenzwert existiert.

Daher wurde eine Empfehlung herausgegeben, in der für die Bestimmung von akzeptablen Expositionsniveaus beim Einsatz von genotoxischen Karzinogenen auch mögliche Aktionsmechanismen und Dosis-Wirkungs-Beziehungen als wichtige Komponenten mit einbezogen werden sollten.

Alkylierende Substanzen werden als eine Klasse betrachtet, die zur Gruppe der genotoxischen Substanzen gehört und nach IARC Klassifizierung der Gruppe 1 (Karzinogen für den Menschen) zugeordnet wurden. Für diese Substanzen können generell keine klaren Beweise für einen schwellenbasierten Mechanismus erwartet werden. Obwohl von regulatorischer Seite aufgezeigt wird, dass die Kontrolle von DNA-reaktiven Mutagenen bei einer gewissen Schwelle akzeptiert wird (z.B. Ethylenoxid), werden diese Fälle als Ausnahmen angesehen und nur toleriert, wenn ihr unvermeidlicher Einsatz ausreichend gerechtfertigt ist. Vom toxikologischen Standpunkt aus ist ein generisches Level, welches als Akzeptanzkriterium eingesetzt wird, nicht wünschenswert.

Stattdessen sollte in erster Linie von Fall zu Fall entschieden werden, ob die Substanz vom pharmazeutischen Standpunkt aus akzeptiert werden kann, bevor eine gründliche Sicherheitsbeurteilung erforderlich ist. Für die Alkylantien wurde aufgrund der zytotoxischen Wirkung, die auf eine Reaktion mit der DNA zurückzuführen ist, ein positives Ergebnis in der Adduktanalyse erwartet. Doch dieses konnte bei keinem der untersuchten Alkylantien (siehe Kapitel 4.1.1.1) nachgewiesen werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sich das hier angewandte Prozedere der DNA-Addukt-Analyse als frühes erfolgreiches Screening auf Strukturverwandte bekannter Adduktbildner beschränkt. Allerdings kann diese Analyse vorteilhaft zur Abklärung von Risikobewertungen bei uneinheitlichen positiven und negativen Ergebnissen aus Kanzerogenitäts- und Mutagenitätstests herangezogen werden, auch wenn sich dieses Verfahren sehr aufwendig und zeitintensiv darstellt.

6 Zusammenfassung

DNA-Addukte sind sowohl aufgrund ihrer möglichen Beteiligung an mutagenen und karzinogenen Prozessen als auch als Expositionsindikatoren gegenüber Mutagenen von großem Interesse. Für viele verschiedene umweltbedingte und arbeitsbedingt relevante Substanzen, wie zum Beispiel Benzo(a)pyren und aromatische Amine, sind verschiedene Schritte in der Krebsentstehung, ausgelöst durch DNA-Adduktbildung, gut beschrieben. Pharmazeutika dagegen sind weit weniger gut untersucht. Um das Wissen über das DNA-Adduktbildungspotential von Medikamenten zu erhöhen, sollten in der vorliegenden Arbeit ausgesuchte Pharmazeutika mit Hilfe des ^{32}P -Postlabeling-Verfahren in Rattenleberschnitten untersucht werden.

Es wurden Pharmazeutika ausgewählt, welche bereits mindestens 30 Jahre auf dem deutschen Markt erhältlich waren und ein Molgewicht von 100 bis 600 g/mol aufwiesen. Diese Kriterien wurden angewandt, um zu gewährleisten, dass die Latenzzeit der meisten Krebsentstehungen durchlaufen wurde und die DNA-Addukte aufgrund ihrer Größe im ^{32}P -Postlabeling-Verfahren auch detektierbar sein würden. Mit Hilfe der IARC-Klassifizierung, dem *in silico* DEREK-Programm und einer epidemiologischen Literaturstelle wurden die insgesamt erhaltenen 734 Substanzen weiter unterteilt und jeweils repräsentativ ausgewählt.

Nach Inkubation der Pharmazeutika mit Rattenleberschnitten in einem statischen Inkubationssystem wurde die DNA isoliert. Die entstandenden DNA-Addukte wurden angereichert, mit ^{32}P markiert und über ein Dünnschichtchromatographie-Verfahren sichtbar gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das eingesetzte ^{32}P -Postlabeling-Verfahren, welches für die Untersuchung von DNA-reaktiven steroidal Substanzen optimiert wurde, in der Lage ist, DNA-Addukte verschiedener Substanzklassen zu identifizieren. Jedoch wurden bei einigen Pharmazeutika (z.B. den Alkylantien Chlorambucil, Cyclophosphamid und Melphalan), bei denen DNA-Addukte erwartet wurden, keine DNA-Addukte identifiziert. Dies lässt sich höchst wahrscheinlich durch die strukturellen Veränderungen der DNA-Basen durch die Alkylierung erklären, welche zu klein waren, um mit Hilfe der Chromatographie sichtbar gemacht zu werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass das Adduktlevel und das spezifische Adduktpattern von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Alter, Geschlecht, Gewebe und Spezies abhängig ist und die Auswertung durch das Vorkommen von I-Compound erschwert sein kann.

Allerdings ermöglicht die DNA-Addukt-Analyse in Gewebeschnitten eine Untersuchung von verschiedenen Substanzen und auch Konzentrationen aus z.B. ein und derselben Leber in einem *in vitro* Versuch. Aufgrund des möglichen Einsatzes von verschiedenen Geweben (in dieser Arbeit: Leber und Niere) wird die Effizienz und Aussagekraft dieser Methode noch erhöht. Auch der benötigte Einsatz von nur geringen Substanzmengen bildet einen weiteren Vorteil dieses Verfahrens. Diese Analyse kann vorteilhaft zur Abklärung von Risikobewertungen bei uneinheitlichen positiven und negativen Ergebnissen aus Kanzerogenitäts- und Mutagenitätstests herangezogen werden, auch wenn sich dieses Verfahren sehr aufwendig und zeitintensiv darstellt.

7 Summary

Investigation of the DNA Adduct Forming Potential from selected Pharmaceuticals

DNA adducts are of interest both because of their possible direct involvement in mutagenic and carcinogenic processes and as indicators of exposure to mutagens. For several environmentally or occupationally relevant compounds, i.e. benzo(a)pyrene and several aromatic amines, the different steps in the process of carcinogenesis initiated by DNA adduct formation are well established. However, pharmaceuticals are less well investigated. To broaden the knowledge about the adduct forming potential of pharmaceuticals we selected in this thesis pharmaceuticals which should be investigated with the ^{32}P -postlabeling assay in rat liver slices.

We selected drugs which had been on the German market for at least 30 years and which had a molecular weight in the range of 100 to 600 g/mol. These criteria were chosen to ensure that the latency period of most cancers was surpassed and that because of their volume the DNA-adducts would be detectable in the ^{32}P -postlabeling assay. By means of the IARC-Classification, the DEREK-program and an epidemiologic literature screen we further divided the received 734 drugs and selected them representatively.

After incubation of the pharmaceuticals with the rat liver slices in a submerged incubation system the DNA was isolated. The originated DNA-adducts were enriched, labeled with ^{32}P and visualized with a thin layer chromatography-process. In this thesis we showed that the chosen test system which had been optimized to investigate DNA reactivity of steroidal compounds is able to detect DNA-adducts from various classes of pharmaceuticals. However, several drugs which were expected to cause adducts were surprisingly negative, namely alkylating antineoplastics like chlorambucil, cyclophosphamide and melphalan. Most probably the structural changes of the DNA bases caused by alkylation were too small to be chromatographically detectable. In addition we could show that the adduct-level and the specific adduct-pattern depends on several factors, for example age, gender, tissue and species, and the examination will be hindered due to I-compounds. However, the DNA-adduct analysis in tissue slices enabled an examination of different drugs and concentrations in one liver in only one *in vitro* experiment. Due to the fact that different tissues (in this thesis: liver and kidney) could be chosen, the efficiency and the significance of this method was broadened. Even the use of only small amount from substance is another benefit of this procedure.

Although this procedure is very complex and time-consuming, the analysis could be chosen to clear up risk assessments from inconsistent combination of positive and negative results in carcinogenic and mutagenic experiments.

8 Zitierte Literatur

1. Anders A, Anders F, Zechel Ch, Gröger H, Schmidt D, Smith A, Schlatterer B: Genetische Mechanismen der Tumorgenese – Prüfung erb- und umweltabhängiger Krebsrisiken in *Xiphophorus*-Testsystemen. In: Schlatterer B (Hrsg): Chemische Krebsrisikofaktoren der Umwelt. Erich Schmidt, Berlin 1991: 81-115.
2. Anders F: A biologist's view of human cancer. In: Neth R, Gallo RC, Greaves MF: Modern trends in human leukemia. V III. Springer, Berlin 1989: 23-45.
3. Anderson D, Bishop JB, Garner RC, Ostrosky-Wegman P, Selby PB: Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation Research* 1995; 330: 115-181.
4. Ashby J, Tennant RW: Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutation Research* 1988; 204, 1: 17-115.
5. Ashby J, Tennant RW, Zeiger E, Stasiewicz S: Classification according to chemical structure, mutagenicity to Salmonella and level of carcinogenicity of a further 42 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutation Research* 1989; 223, 2: 73-103.
6. Ashby J, Paton D: The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures. *Mutation Research* 1993; 286, 1: 3-74.
7. Bach, P. H., Vickers, A. E. M., Fisher, R., Baumann, A., Brittebo, E., Carlile, D. J., Koster, H. J., Lake, B. G., Salmon, F., Sawyer, T. W., and Skibinski, G. The use of tissue slices for pharmacotoxicology studies. ECVAM workshop report 20, ATLA 24, 839-923. 1996. (GENERIC) Ref Type: Report
8. Bali D, Singh JR, Singh H, Sandhu D: In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs. I. Hydrocortisone. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1990; 16: 250-254.
9. Bank BB: Studies of Chlorambucil-DNA adducts. *Biochemical Pharmacology* 1992; 44: 571-575.
10. Bartsch H: Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutation Research* 2000; 462: 255-279.
11. Bauer KH: Mutationstheorie der Geschwulstentstehung. Springer, Berlin 1928.
12. Baumann A, Kerdar RS, Kramer P, et al: Use of rat and human liver slices for the detection of steroid hormone-induced DNA-adducts *in vitro* by means of the ³²P-postlabeling technique. *Pharmacology & Toxicology* 1996; 78: 214-223.
13. Beamand JA, Price RJ, Cunninghame ME, Lake BG: Culture of precision-cut liver slices: Effect of some peroxisome proliferators. *Food and Chemical Toxicology* 1993; 31: 137-147.
14. Beamand JA, Price RJ, Blowers SD, Wield PT, Cunninghame ME, Lake BG: Use of precision-cut liver slices for studies of unscheduled DNA-synthesis. *Food and Chemical Toxicology* 1994; 32: 819-829.
15. Beamand JA, Price RJ, Phillips JC, et al: Lack of effect of piperonyl butoxide on unscheduled DNA synthesis in precision-cut human liver slices. *Mutation Research* 1996; 371: 273-282.

16. Beamand JA, Barton PT, Tredger JM, Price RJ, Lake BG: Effect of some cooked food mutagens on unscheduled DNA synthesis in cultured precision-cut rat, mouse, and human liver slices. *Food and Chemical Toxicology* 1998; 36: 455-466.
17. Berenblum I: The mechanism of carcinogenesis: A study of the significance of carcinogenic actions and related phenomena. *Cancer Research* 1941, 1: 807-814.
18. Bergman K, Müller L, Weberg Teigen S: The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re)view. *Mutation Research* 1996; 349: 263-288.
19. Berry MN, Friend DS: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *Journal of Cell Biology* 1969; 43: 506-520.
20. Bhide SV, Maru GB, Mate NB, Menon M, Gangadharan P: Metabolic studies on the possible mode of action of isoniazid tumorigenicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1981; 99, 1-2: 153-166.
21. Boveri T: Zur Frage der Entstehung maligner Tumore. Gustav Fischer, Jena 1914
22. Brendel K, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Smith PF: Tissue slicing and culturing revisited. *Trends in Pharmacological Science* 1987; 8: 11-15.
23. Brown AP, Gandolfi AJ: Glutathione-S-transferase is a target for covalent modification by a halothane reactive intermediate in the guinea pig liver. *Toxicology* 1994; 89: 35-47.
24. Bursch W, Lauer B, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Schuppler J, Schulte-Hermann R: Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* 1984, 5, 4: 453-458.
25. Campbell AK, Hales CN: Maintenance of viable cells in an organ culture of mature rat liver. *Experimental Cell Research* 1971; 68: 33-42.
26. Carlile DJ, Hakooz N, Houston JB: Kinetics of drug metabolism in rat liver slices: IV. Comparison of ethoxycoumarin clearance by liver slices, isolated hepatocytes, and hepatic microsomes from rats pretreated with known modifiers of cytochrome P-450 activity. *Drug Metabolism and Disposition* 1999; 27: 526-532.
27. Chen T, Aidoo A, Mittelstaedt RA, Casciano DA, Heflich RH: *Hprt* mutant frequency and molecular analysis of *Hprt* mutations in Fischer 344 rats treated with thiotepa. *Carcinogenesis* 1999; 20: 269-277.
28. Clouser TE: Tissue bath improvements for the Oxford Vibratome. *Stain Technology* 1977; 52: 319-322.
29. Cohen SM, Ellwin LR: Genetic errors, cell proliferation and carcinogenesis. *Cancer Research* 1991, 51: 6493-6505.
30. Connors S, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Brendel K: Lysosomal and cytosolic enzyme release as a measure of organelle specific toxicity in cultured rat liver slices. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 1988; 31: 143-147.
31. Connors S, Rankin DR, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Keop LJ, Brendel K: Cocaine hepatotoxicity in cultured liver slices: a species comparison. *Toxicology* 1990; 61: 171-183.
32. De Kanter R, Koster HJ: Cryopreservation of rat and monkey liver slices. *ATLA (Alternatives to laboratory animals)* 1995; 23: 653-665.
33. De Kanter R, Olinga P, De Jager MH, Merema MT, Meijer DKF, Groothuis GMM: Organ slices as an *in vitro* test system for drug metabolism in human liver, lung and kidney. *Toxicology in vitro* 1999; 13: 737-744.

34. De Kanter R, Monshouwer M, Meijer DKF, Groothuis GMM: Precision-cut organ slices as a tool to study toxicity and metabolism of xenobiotics with special reference to non-hepatic tissues. *Current Drug Metabolism* 2002, 3: 39-59.
35. Deml E, Schwarz LR, Oesterle D: Initiation of enzyme-altered foci by the synthetic steroid cyproterone acetate in rat liver foci bioassay. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1229-1231.
36. Dobias L, Cerna M, Rössner P, Sram R: Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutation Research* 1994; 317: 177-194.
37. Dogterom P: Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metabolism and Disposition* 1993; 21: 699-704.
38. Durowicz S, Olszewski WL: A liver perfusion model for studies of selective adherence and transient halting of portal blood leukocytes in sinusoids. *Journal of Immunological Methods* 2002; 9247: 1-8.
39. Eden van den SK, Friedman GD: Prescription Drug Screening for Subsequent Carcinogenicity. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 1995; 4: 275-287.
40. Ehrenberg I: Detection and measurement of protein adducts: Aspects of risk assessment. *Progress in clinical and biological research* 1991; 372: 79-87.
41. Ekins S: Short-term maintenance of phase I and II metabolism in precision-cut liver slices in dynamic organ culture. *Drug Metabolism and Disposition* 1996; 24: 364-366.
42. Estler C.-J.: *Pharmakologie und Toxikologie*. Schattauer 1995: 17.
43. Fang S, Liao S: Antagonistic action of anti-androgens on the formation of a specific dihydrotestosterone-receptor protein complex in rat ventral prostate. *Molecular Pharmacology* 1969; 4: 428-431.
44. Feser W, Kerdar RS, Baumann A, Körber J, Blode H, Kuhn W: DNA adduct formation of selected sex steroids in human liver slices *in vitro*. *Toxicology in vitro* 1998; 12: 353-364.
45. Fisher RL, Barr J, Zukoski CF, et al: In vitro hepatotoxicity of three dichlorobenzene isomers in human liver slices. *Human and Experimental Toxicology* 1991; 10: 357-363.
46. Fisher RL, Gandolfi AJ, Sipes IG, Brendel K: Culture medium composition effects the relative toxicities of chlorobenzenes in rat liver slices and the isolated perfused liver. *Drug and Chemical Toxicology* 1993; 16: 321-339.
47. Fisher RL, Shaughnessy RP, Jenkins PM, et al: Dynamic organ culture is superior to multiwell plate culture for maintaining precision-cut tissue slices. Part I. *Toxicology Methods* 1995; 5: 99-113.
48. Fisher RL, Ulreich JB, Nakazato PZ, Brendel K: Histological and biochemical evaluation of precision-cut liver slices. *Taylor&Francis Health Sciences* 2001, 11, 2: 59-79
49. Friedwald WF, Rous P: The initiating and promoting elements in tumor production: An analysis of the effects of tar, benzpyrene and methylcholanthrene on rabbit skin. *The Journal of Experimental Medicine* 1944, 80: 101-126.
50. Ghantous HN, Fernando J, Gandolfi AJ, Brendel K: Toxicity of halothane in guinea pig liver slices. *Toxicology* 1990; 62: 59-69.
51. Ghantous HN, Fernando J, Gandolfi AJ, Brendel K: Minimal biotransformation and toxicity of desflurane in guinea pig liver slices. *Anesth.Analg.* 1991; 72: 796-800.

52. Gokhale MS, Bunton TE, Zurlo J, Yager JD: Cytochrome P-450 1A1/1A2 induction, albumin secretion and histological changes in rat liver slices. *In Vitro Toxicology* 1995; 4: 357-368.
53. Gokhale MS, Bunton TE, Zurlo J, Yager JD: Cytochrome P450 isoenzyme activities in cultured rat and mouse liver slices. *Xenobiotica* 1997; 27: 341-355.
54. Gold LS, Slone TH, Ames BN: Summary of Carcinogenic Potency Database by Chemical. In: *Handbook of Carcinogenic Potency and Genotoxicity Databases*. Gold LS, Zeiger E, eds. Florida: CRC Press, 1997; 621-660.
55. Greim H, Deml E: *Toxikologie: Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner*. Wiley-VCH 1996.
56. Guillouzo A, Morel F, Fardel O, Meunier B: Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. *Toxicology* 1993; 82: 209-219.
57. Gupta RC, Reddy MV, Randerath K: ^{32}P -postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis* 1982; 3: 1081-1092.
58. Gupta RC: Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 81: 6943-6947.
59. Gupta RC: Enhanced sensitivity of ^{32}P -postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer Research* 1985; 45: 5656-5662.
60. Gupta RC, Spencer-Beach G: Natural and endogenous DNA adducts as detected by ^{32}P -postlabeling. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1996; 23: 14-21.
61. Hümpel M, Nieuweboer B, Düsterberg B, Wendt H: Die Pharmakokinetik vom Cyproteronacetat beim Menschen. In: *Androgenisierungserscheinungen bei der Frau*. Hammerskin L-F, Neumann, Plenig, eds. *Experta Medien*, 1979; 212-223.
62. Harris JW, Rahman A, Kim BR, Guengerich FP, Collins JM: Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Research* 1994; 54: 4026-4035.
63. Hashemi E, Dobrota M, Till C, Ioannides C: Structural and functional integrity of precision-cut liver slices in xenobiotic metabolism: a comparison of the dynamic organ and multiwell plate culture procedures. *Xenobiotica* 1999; 29: 11-25.
64. Heinemann LAJ, DoMinh T, Guggenmoos-Holzmann I, Thiel C, Garbe E: Oral Contraceptives and liver cancer. Results of the multicentre international liver tumor study (MILTS). *Contraception* 1997a; 56: 275-284.
65. Heinemann LAJ, Will-Shahab L, van Kesteren P, Gooren LJG, and the collaborating centres: Safety of Cyproterone Acetate: Report of active surveillance. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 1997b; 6: 169-178.
66. Hemminki K, Rajaniemi H, Lindahl B, Moberger B: Tamoxifen-induced DNA adducts in endometrial samples from breast cancer patients. *Cancer Research* 1996; 56, 19: 4374-4377.
67. Hemminki K, Rajaniemi H, Koskinen M, Hansson J: Tamoxifen-induced DNA adducts in leucocytes of breast cancer patients. *Carcinogenesis* 1997; 18, 1: 9-13.
68. Henry B, Grant SG, Klopman G, Rosenkranz HS: Induction of forward mutations at the thymidine kinase locus of mouse lymphoma cells: evidence for electrophilic and non-electrophilic mechanisms. *Mutation Research* 1998; 397: 313-335.

69. Izzotti A: Detection of modified DNA nucleotides by postlabeling procedures. *Toxicology Methods* 1998; 8: 175-205.
70. Kallama S, Hemminki K: Alkylation of guanosine by phosphoramidate mustard, chloromethine hydrochloride and chlorambucil. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 1984; 54, 3: 214-220.
71. Kasper P, Tegethoff K, Mueller L: In vitro mutagenicity studies on cyproterone acetate using female rat hepatocytes for metabolic activation and as indicator cells. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2309-2314.
72. Kasper P, Mueller L: Time-related induction of DNA repair synthesis in rat hepatocytes following in vivo treatment with cyproterone acetate. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2271-2274.
73. Kasper P: Cyproterone acetate: A genotoxic carcinogen? *Pharmacology & Toxicology* 2001; 88: 223-231.
74. Kerdar RS: ³²P-postlabeling analysis of bulky aromatic and non-aromatic adducts. *Exp.Toxic.Pathol.* 1996; 48: 461-466.
75. Kim BS, Margolin BH: Prediction of rodent carcinogenicity utilizing a battery of in vitro and in vivo genotoxicity tests. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1999; 34: 297-304.
76. Kitchin KT, Brown JL, Setzer RW: Dose-response relationship in multistage carcinogenesis: Promoters. *Environmental Health Perspectives* 1994; 1: 255-264.
77. Krumdieck CL, dos Santos JE, Ho KJ: A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Analytical Biochemistry* 1980; 104: 118-123.
78. Lake BG, Beamand JA, Japenga AC, Renwick AB, Davies S, Price RJ: Induction of cytochrome P450-dependent enzyme activities in cultured rat liver slices. *Food and Chemical Toxicology* 1993; 31: 377-386.
79. Lake BG, Charzat C, Tredger JM, Renwick AB, Beamand JA, Price RJ: Induction of cytochrome P450 isoenzymes in cultured precision-cut rat and human liver slices. *Xenobiotica* 1996; 26: 297-306.
80. Lake BG, Ball SE, Renwick AB, et al: Induction of CYP3A isoforms in cultured precision-cut human liver slices. *Xenobiotica* 1997; 27: 1165-1173.
81. Lake BG, Beamand JA, Tredger JM, Barton PT, Renwick AB, Price RJ: Inhibition of xenobiotic-induced genotoxicity in cultured precision-cut human and rat liver slices. *Mutation Research* 1999; 440: 91-100.
82. Lang R, Redmann U: Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 1979; 67: 361-365.
83. Lang R, Reimann R: Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: Examination for the induction of gene mutations using the Ames Salmonella/microsome test and the HGPRT test in V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1993; 21: 272-304.
84. Lee Y, Buchanan BG, Klopman G, Dimayuga M, Rosenkranz HS: The potential of organ specific toxicity for predicting rodent carcinogenicity. *Mutation Research* 1996; 358: 37-62.
85. Leeman WR, van de Gevel IA, Rutten AAJL: Cytotoxicity of retinoic acids, menadione and aflatoxine B₁ in rat liver slices using netwell inserts as a new culture system. *Toxicology in vitro* 1995; 9: 291-298.

86. Li J-T, Sheng S-J, Du X-L: Metabolism of terbufos in rat liver. *Journal of Occupational Health* 1999; 41: 62-68.
87. Lipschitz WL, Bueding E: Mechanism of the biological formation conjugated glucuronic acids. *Journal of Biological Chemistry* 1939; 129: 333-358.
88. Lutz WK, Maier P: Genotoxic and epigenetic chemical carcinogenesis: One process, different mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences* 1988; 9, 9: 322-326.
89. Lutz WK: Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis. *Mutation Research* 1990; 238, 3: 287-295.
90. Lutz WK, Cantoreggi S, Velic I: DNA binding and stimulation of cell division in carcinogenicity of styrene 7,8-oxide. *IARC Sci Publ.* 1993; 127: 245-252.
91. Maccubbin AE, Caballes L, Riordan JM, Huang DH, Gurtoo HL: A cyclophosphamide/DNA-phosphoester adduct formde in vitro and in vivo. *Cancer Research* 1991; 51, 3: 886-892
Erratum in: *Cancer Research* 1991; 51, 14: 3829
92. Marselos M, Vainio H: Carcinogenic properties of pharmaceutical agents evaluated in the IARC Monographs programme. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1751-1766.
93. Martelli A, Mattioli F, Fazio S, Andrae U, Brambilla G: DNA repair synthesis and DNA fragmentation in primary cultures of human and rat hepatocytes exposed to cyproterone acetate. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1265-1269.
94. Martelli A: Primary human and rat hepatocytes in genotoxicity assessment. *In vivo* 1997; 11: 189-194.
95. Martelli A, Mattioli F, Carrozzino R, et al: Genotoxicity testing of potassium canrenoate in cultured rat and human cells. *Mutagenesis* 1999; 14: 463-472.
96. Martelli A, Carrozzino R, Mattioli F, Bucci G, Lamarino G, Brambilla G: DNA damage in tissues of rat treated with potassium canrenoate. *Toxicology* 2002; 171: 95-103.
97. Maru GB, Bhide S, Saffhill R, O'Connor PJ: Formation and persistence of isoniazid-DNA adducts in mouse tissues. *Human Toxicology* 1987; 6: 153-158.
98. McIlwain H, Buddle HL: Techniques in tissue metabolism: 1. mechanical chopper. *Journal of Biochemistry* 1953; 53: 412-420.
99. McKee RL, Hraby VJ, Trivedi DB, et al: Perfused precision-cut liver slice system for the study of hormoneregulated hepatic glucose metabolism. *Journal of Pharmacological Methods* 1988; 19: 339-354.
100. Meredith C, Scott MP, Renwick AB, Price RJ, Lake BG: Studies an the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs *in vivo* and *in vitro* using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica* 2003; 33: 511-527.
101. Mereto E, Robbiano L, Ghia M, Allavena A, Martelli A, Brambilla G: Evaluation of DNA-damaging, clastogenic, and promoting activities of metoclopramide and procainamide in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1995; 131: 192-197.
102. Miller MG, Beyer J, Hall GL, Degraffenried LA, Adams PE: Predictive value of liver slices for metabolism and toxicity *in vivo*: Use of acetaminophen as a model hepatotoxicant. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1993; 122: 108-116.
103. Mourato LL, Beland FA: 32P-Postlabeling of N-(deoxyguanosin-8-yl) arylamine adducts: A comparative study of labeling efficiencies. *Chemical Research of Toxicology* 1999; 12, 7: 661-669.

104. Müller L, Kasper P: Human biological relevance and the use of threshold-arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutation Research* 2000; 464: 19-34.
105. Nath RG, Randerath K, Li D, Chung F-L: Endogenous production of DNA adducts. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1996; 23: 22-28.
106. Negwer M: *Organisch-chemische Arzneimittel und ihre Synonyma*. Berlin: Akademie-Verlag 1971.
107. Neumann F: The antiandrogen cyproterone acetate: discovery, chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research. *Experimental and clinical Endocrinology* 1994; 102: 1-32.
108. Neumann I, Thierau D, Andrae U, Greim H, Schwarz LR: Cyproterone acetate induces DNA damage in cultured rat hepatocytes and preferentially stimulates DNA synthesis in gamma-glutamyltranspeptidase-positive cells. *Carcinogenesis* 1992; 13: 373-378.
109. Neupert G, Glockner R, Muller D: Immunohistochemical localization of cytochrome P450 1A1 in precision-cut liver slices after in vitro exposure to beta-naphthoflavone. *Exp.Toxic.Pathol.* 1998; 50: 514-518.
110. NTP. NTP Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of promethazine hydrochloride (CAS No.58-33-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice. National Toxicology Program, Govt-Reports-Announcements-Index 425(24), 1-270. 1993. (GENERIC) Ref Type: Journal (Full)
111. Obatomi DK, Brant S, Anthonypillai V, Early DA, Bach PH: Optimizing preincubation conditions for precision-cut rat kidney and liver tissue slices: Effect of culture media and antioxidants. *Toxicology in vitro* 1998; 12: 725-737.
112. Olinga P, Groen K, Hof IH, et al: Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 1997; 38: 59-69.
113. Olinga P, Merema M, Hof IH, et al: Effect of human liver source on the functionality of isolated hepatocytes and liver slices. *Drug Metabolism and Disposition* 1998; 26: 5-11.
114. Oppermann JA, Cook C, Piper C, Gardiner P: Comparative metabolism of spironolactone and potassium canrenoate: current data in experimental animals and in man. *Journal of Drug Development* 1987; 1: 14-19.
115. Oshiro Y, Balwierz PS, Piper CE: Absence of a genotoxic response from steroids in the rat primary hepatocyte unscheduled DNA synthesis assay. *Environmental Mutagenesis* 1986; 8: 461-465.
116. Parrish AR, Gandolfi AJ, Brendel K: Minireview Precision-cut tissue slices: Applications in pharmacology and toxicology. *Life Science* 1995; 57: 1887-1901.
117. Parrish AR, Fisher R, Bral CM, et al: Benzo(a)pyrene-induced alterations in growth-related gene expression and signaling in precision-cut adult rat liver and kidney slices. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1998; 152: 302-308.
118. Phillips DH: Detection of DNA modifications by the ³²P-postlabelling assay. *Mutation Research* 1997; 378: 1-12.
119. Phillips DH, Castegnaro M: Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 1999; 14: 301-315.

120. Pitot HC: Progression: The terminal stage of carcinogenesis. *Japanese Journal of Cancer* 1989, 80: 599-607.
121. Pitot HC: Stages in neoplastic development. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF: *Cancer Epidemiology and Prevention*. 2nd ed, Oxford University Press, Oxford, New York 1996: 65-79.
122. Platzer P, Thalhammer T, Hamilton G, et al: Metabolism of camptothecin, a potent topoisomerase I inhibitor, in the isolated perfused rat liver. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 2000; 45: 50-54.
123. Poirier MC, Beland FA: DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: Implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chemical Research in Toxicology* 1992; 5, 6: 749-755.
124. Poirier MC, Santella RM, Weston A: Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis* 2000; 21: 353-359.
125. Prenez A, Gillardeaux O, Arrivet E, Paillard F, Finot F, Vericat JA: Paracetamol-dependant induction of DNA adducts in primary rat hepatocytes treated *in vitro*. *Toxicology Letters* 1998; Suppl.1/95: 199.
126. Price RJ, Renwick AB, Beamand JA, Wield PT, Walters DG, Lake BG: Comparison of the metabolism of 7-Ethoxycoumarin and Coumarin in precision-cut rat liver and lung slices. *Food and Chemical Toxicology* 1995; 33: 233-237.
127. Price RJ, Ball SE, Barton PT, Beamand JA, Lake BG: Use of precision-cut rat liver slices for studies xenobiotic metabolism and toxicity: Comparison of the Krumdieck and Brendel tissue slicers. *Xenobiotica* 1998; 28: 361-371.
128. Qu S-X, Bai C-L, Stacey NH: Determination of bulky DNA adducts in biomonitoring of carcinogenic chemical exposures: features and comparison of current techniques. *Biomarkers* 1997; 2: 3-16.
129. Ré JL, De Méo MP, Laget M, et al: Evaluation of the genotoxic activity of metronidazole and dimetridazole in human lymphocytes by the comet assay. *Mutation Research* 1997; 375: 147-155.
130. Randerath K, Reddy MV, Gupta RC: 32P-labeling test for DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981; 78: 6126-6129.
131. Randerath K, Reddy MV, Disher RM: Age- and tissue-related DNA modifications in untreated rats: detection by ³²P-postlabeling assay and possible significance for spontaneous tumor induction and aging. *Carcinogenesis* 1986; 7: 1615-1617.
132. Randerath K, Randerath E: 32P-Postlabeling assay for carcinogen DNA adducts and other DNA modifications. *Journal UOEH* 1989; 11: 368-386.
133. Randerath K, Randerath E: ³²P-postlabeling methods for DNA adduct detection: Overview and critical evaluation. *Drug Metabolism Reviews* 1994; 26: 67-85.
134. Reddy MV, Gupta RC, Randerath E, Randerath K: 32P-postlabeling test for covalent DNA binding of chemicals in vivo: application to a variety of aromatic carcinogens and methylating agents. *Carcinogenesis* 1984; 5: 231-243.
135. Reddy MV, Irvin TR, Randerath K: Formation and persistence of sterigmatocystin DNA adducts in rat liver determined via 32P-postlabeling analysis. *Mutation Research* 1985; 152: 85-96.
136. Reddy MV, Randerath K: Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 1986; 7: 1543-1551.

137. Reddy MV, Hemminki K, Randerath K: Postlabeling analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells of foundry workers. *Journal of Toxicology Environmental Health* 1991; 34, 2: 177-185.
138. Reddy MV: Methods for testing compounds for DNA adduct formation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2000; 32, 3: 256-263.
139. Renwick AB, Watts PS, Edwards RJ, et al: Differential maintenance of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metabolism and Disposition* 2000; 28: 1202-1209.
140. Rogiers V, Vercruyssen A: Rat hepatocyte cultures and co-cultures in biotransformation studies of xenobiotics. *Toxicology* 1993; 82: 193-208.
141. Rosenkranz HS, Karol MH: Chemical carcinogenicity: can it be predicted from knowledge of mutagenicity and allergic contact dermatitis? *Mutation Research* 1999; 431: 81-91.
142. Russell WMS, Burch RL: *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen, 1959
143. Sanderson BJS, Shield AJ: Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. *Mutation Research* 1996; 355: 41-57.
144. Salyers KL, Barr J, Sipes IG: In vitro metabolism of theophylline by rat and human liver tissue. *Xenobiotica* 1994; 24, 5: 389-399.
145. Sauls RL, Ames BN: Background levels of DNA damage in the population. In: Simic M, Grossmann L, Upton A: *Mechanisms of DNA damage and repair*. Plenum Press, New York 1986: 529-535.
146. Schulte-Hermann R, Timmermann-Trosiener I, Schuppler J: Promotion of spontaneous preneoplastic cells in rat liver as a possible explanation of tumor production by nonmutagenic compounds. *Cancer Research* 1983; 43: 839-844.
147. Schuppler J, Günzel P: Liver tumors and steroid hormones in rats and mice. *Archives of Toxicology Supplements* 1979; 2: 181-195.
148. Schuppler J, Schulte-Hermann R, Timmermann-Trosiener I, Günzel P: Proliferative liver lesions and sex steroids in rats. *Toxicologic Pathology* 1982; 10: 132-145.
149. Schuppler J, Damme J, Schulte-Hermann R: Assay of some endogenous and synthetic sex steroids for tumor-initiating activity in rat liver using the Solt-Farber system. *Carcinogenesis* 1983; 4: 239-241.
150. Selby JV, Friedman GD, Fireman BH: Screening prescription drugs for possible carcinogenicity: Eleven to fifteen years of follow-up. *Cancer Research* 1989; 49: 5736-5747.
151. Shelby MD, Witt KL: Comparison of results from mouse bone marrow chromosome aberration and micronucleus tests. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1995, 25, 4: 302-313.
152. Shuker DEG: The enemy at the gates? DNA adducts as biomarkers of exposure to exogenous and endogenous genotoxic agents. *Toxicology Letters* 2002; 134: 51-56.
153. Smith PF, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, et al: Dynamic organ culture of precision liver slice for *in vitro* toxicology. *Life Science* 1985; 36: 1367-1375.
154. Smith PF, Krack G, McKee RL, et al: Maintenance of adult rat liver slices in dynamic organ culture. *In Vitro: Cellular and Development Biology* 1986; 22: 706-712.

155. Snyder RD, Green JW: A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutation Research* 2001; 488: 151-169.
156. Stadie WC, Riggs BC: Microtome for the preparation of tissue slices for metabolic studies of surviving tissues in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 1944; 154: 687-690.
157. Stearns RA, Miller RR, Doss GA, et al: The metabolism of DuP 753, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, by rat, monkey, and human liver slices. *Drug Metabolism and Disposition* 1992; 20: 281-287.
158. Steensma A, Beamand JA, Walters DG, Price RJ, Lake BG: Metabolism of coumarin and 7-ethoxycoumarin by rat, mouse, guinea pig, cynomolgus monkey and human precision-cut liver slices. *Xenobiotika* 1994; 24: 893-907.
159. Storey IDE: The synthesis of glucuronides by liver slices. *Journal of Biochemistry* 1950; 47: 212-222.
160. Swenberg JA, Fennell TR: DNA damage and repair in mouse liver. *Archives of Toxicology. Supplement* 1987; 10: 162-171.
161. Tennant RW, Spalding J, Stasiewicz S, Ashby J: Prediction of the outcome of rodent carcinogenicity bioassays currently being conducted on 44 chemicals by the National Toxicology Program. *Mutagenesis* 1990; 5, 1: 3-14.
162. Tennant RW, Ashby J: Classification according to chemical structure, mutagenicity to *Salmonella* and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutation Research* 1991; 257, 3: 209-227.
163. Teyssier C, Siess M-H: Metabolism of Dipropyl Disulfide by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. *Drug Metabolism and Disposition* 2000; 28: 648-654.
164. Thews G, Mutschler E, Vaupel P: *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1980;
165. Thompson DC, Perera K, London R: Metabolism and toxicity of 4-hydroxyphenylacetone in rat liver slices: comparison with acetaminophen. *Drug Metabolism and Disposition* 1996; 24: 866-871.
166. Toda T, Oshino N: Biotransformation of lisuride in the hemoglobin-free perfused rat liver and in the whole animal. *Drug Metabolism and Disposition* 1981; 9: 108-113.
167. Topinka J, Andrae U, Schwarz LR, Wolff T: Cyproterone acetate generates DNA adducts in rat liver and primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis* 1993; 14: 423-427.
168. Toutain HJ, Moronvalle-Halley V, Sarsat P, Chelin C, Hoet D, Leroy D: Morphological and function integrity of precision-cut liver slices in rotating organ culture and multiwell plate culture: Effects of oxygen tension. *Cell Biology and Toxicology* 1998, 14,3: 175-190.
169. Vainio H: Review: Use of biomarkers in risk assessment. *International Journal Hygiene Environmental Health* 2001; 204: 91-102.
170. Vickers AE, Connors S, Zollinger M, et al: The biotransformation of the rot derivative CQA 206-291 in human, dog, and rat liver slice cultures and prediction of in vivo plasma clearance. *Drug Metabolism and Disposition* 1993; 21: 454-459.
171. Vickers AEM, Fischer V, Connors S, et al: Cyclosporin A metabolism in human liver, kidney, and intestine slices. Comparison to rat and dog slices and human cell lines. *Drug Metabolism and Disposition* 1992; 20: 802-809.

172. Wallraff J: Leitfaden der Histologie des Menschen. Urban&Schwarzenberg 1972; 8: Tafel 50.
173. Warburg O: Biochemische Zeitung 1923; 142: 317.
174. Watanabe S, Cui Y, Tanae A, et al: Follow-up study of children with precocious puberty treated with cyproterone acetate. Ad hoc Committee for CPA. Journal of Epidemiology 1997; 7: 173-178.
175. Waters MD, Stack HF, Jackson MA: Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. Mutation Research 1999; 437: 21-49.
176. Weinberg RA: How cancer arises? Scientific American 1996; 275: 32-40.
177. Weisiger RA, Fitz JG: Sex differences in membrane potential in the intact perfused rat liver. American Journal of Physiology 1988; 255: G822-G825.
178. Weiss E: Geschwülste. In Frei A (Hrsg): Allgemeine Pathologie. Parey, Berlin, 1972: 295-347.
179. Werner S, Topinka J, Wolff T, Schwarz LR: Accumulation and persistence of DNA adducts of the synthetic steroid cyproterone acetate in rat liver. Carcinogenesis 1995; 16: 2369-2372.
180. Werner S, Kunz S, Wolff T, Schwarz LR: Steroidal drug cyproterone acetate is activated to DNA-binding metabolites by sulfonation. Cancer Research 1996; 56: 4391-4397.
181. Werner S, Kunz S, Beckurts T, Heidecke CD, Wolff T, Schwarz LR: Formation of DNA adducts by cyproterone acetate and some structural analogues in primary cultures of human hepatocytes. Mutation Research 1997; 395: 179-187.
182. Williams GM, Iatropoulos MJ, Jeffrey AM: Mechanistic basis for nonlinearities and thresholds in rat liver carcinogenesis by the DNA-reactive carcinogens 2-acetylaminofluorene and diethylnitrosamine. Toxicologic Pathology 2000; 28: 388-395.
183. Worboys PD, Bradbury A, Houston JB: Kinetics of drug metabolism in rat liver slices. Rates of oxidation of ethoxycoumarin and tolbutamide, examples of high- and low-clearance compounds. Drug Metabolism and Disposition 1995; 23: 393-397.
184. Worboys PD, Bradbury A, Houston JB: Kinetics of drug metabolism in rat liver slices. II. Comparison of clearance by liver slices and freshly isolated hepatocytes. Drug Metabolism and Disposition 1996; 24: 676-681.
185. Worboys PD, Bradbury A, Houston JB: Kinetics of drug metabolism in rat liver slices III. Relationship between metabolic clearance and slice uptake rate. Drug Metabolism and Disposition 1997; 25: 460-467.
186. Zhao C, Tyndyk M, Eide I, Hemminki K: Endogenous and background DNA adducts by methylating and 2-hydroxyethylating agents. Mutation Research 1999; 424, 1-2: 117-125.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Herrn Dr. Rasoul Kerdar, ehemals Pharmakokinetik bei der Schering AG, danke ich für die Überlassung des Themas und seine einführende Unterstützung.

Herrn Dr. Thomas Steger-Hartmann, bei der Schering AG, jetzt Bayer Schering Pharma AG Berlin, sei vielmals für die Übernahme der Betreuung dieses Dissertationsthemas und der Überführung des DNA-Addukt-Verfahrens in die Abteilung der Toxikologie gedankt. Ferner haben seine kritischen Durchsichten des Manuskriptes und seine Beharrlichkeit zur Verbesserung beigetragen.

Frau Univ.-Prof. H. Fink danke ich für die Übernahme der Arbeit als Erstgutachterin.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Kathrin Boettger, die mich sehr geduldig und unterstützend in die Arbeitsmethoden der DNA-Addukt-Analyse eingeweiht hat.

Herr Thomas Naumann hat mich stets sehr freundschaftlich bei der praktischen Durchführung der Experimente vom Rattenleberschnitt bis zur Chromatographie fachlich und menschlich unterstützt.

Desweiteren bedanke ich mich herzlich bei den Mitarbeitern der Experimentellen Toxikologie für die Bereitstellung von Lebern und Nieren Placebobehandelter Ratten und Affen.

Meinen Eltern, meinem Bruder samt Familie und Freunden, insbesondere Thomas Hradek möchte ich für ihre ständige Geduld und ihren Zuspruch danken.

9.2 Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt zu haben. Alle öffentlichen Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

Alleshausen, den 18. Juli 2008

Claudia Ehentraut