

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologe Andreas Schnurstein  
aus: Mannheim  
Tag der mündlichen Prüfung:.....

Untersuchungen zur Genotoxizität in Fischen und Fischzellen  
mit der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)  
- Möglichkeiten und Grenzen im Umweltmonitoring -

Gutachter: HD Dr. Thomas Braunbeck  
Zoologisches Institut I, Universität Heidelberg

Prof. Dr. Thomas Rausch  
Botanisches Institut, Universität Heidelberg

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut I der Universität Heidelberg im Zeitraum von 1996 bis 1999 erstellt und vom Umweltbundesamt (UBA Dresden, Zweigstelle Bad Elster) unter der Projektnummer 02 WU 9556 gefördert. Zum Gelingen der Arbeit haben viele Personen beigetragen, mein besonderer Dank gilt deshalb:

Herrn HD Dr. Thomas Braunbeck für sein in mich gesetztes Vertrauen, seine Hilfe und Diskussionsbereitschaft sowie für den wissenschaftlichen Freiraum, auch eigene Gedanken und Ziele zu verfolgen,

Herrn Prof. Dr. Thomas Rausch für die Übernahme des Korreferats,

Frau Dr. T. Grummt vom UBA Bad Elster für ihre großartige Betreuung im Rahmen des Projekts,

Alexander Froschauer und Astrid Tischmeyer für die freundschaftliche Zusammenarbeit, auch in schwierigen Phasen,

Thomas Berbner für seine ständige Hilfsbereitschaft bei der EDV,

der gesamten Arbeitsgruppe, namentlich Susanne Knörr, Markus Islinger, Marija Strmac, Ute Bieberstein, Jens Konradt, Monika Cermak, und den vielen Ungenannten für die gute Arbeitsatmosphäre, die vielen kleinen Hilfestellungen sowie den einen oder anderen Scherz zur rechten Zeit,

Erik Leist für die Arbeiten im Aquariumraum

Frau G. Adam für ihren unermüdlichen Einsatz bei den Fotoarbeiten,

Frau C. Kempendorf und Frau R. Mummert für ihre Hilfe im Labor,

meinen Eltern, die mir das Biologiestudium ermöglicht haben,

Astrid für ihre liebevolle Unterstützung und Hilfe.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	DNA-Schäden und -Reparatur .....	2
1.2	Verschiedene Testsysteme zum Nachweis von DNA-Schäden .....	5
1.2.1	Comet Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese) .....	7
1.3	Ziele der Arbeit .....	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1	Monosubstanzen.....	13
2.1.1	2-Acetylaminofluoren.....	13
2.1.2	Benzo[a]pyren.....	14
2.1.3	Dimethylnitrosamin.....	15
2.1.4	Nitrofurantoin .....	16
2.1.5	4-Nitroquinolin-N-oxid .....	17
2.1.6	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin.....	17
2.1.7	UV-Licht.....	18
2.2	Wasserproben.....	18
2.2.1	Untersuchungsgewässer.....	20
2.3	Testsysteme .....	22
2.3.1	RTG-2 Zellen.....	22
2.3.2	Der Zebraärbling ( <i>Danio rerio</i> ) .....	23
2.3.3	Freilandtiere .....	24
2.4	Zellisolation.....	27
2.4.1	In vitro-Experimente mit <i>Danio rerio</i> .....	27
2.4.2	In vivo-Experimente mit <i>Danio rerio</i> .....	28
2.5	Exposition.....	29
2.5.1	Belastung von RTG-2 Zellen mit ausgewählten Monosubstanzen .....	29
2.5.2	In vitro-Exposition von Primärzellen aus Fischen.....	30
2.5.3	In vivo-Exposition des Zebraärblings .....	31
2.5.4	Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Fischen aus dem Freiland .....	32
2.6	Comet-Assay .....	33
2.6.1	Testprotokoll.....	33
2.6.2	Variationen im Testprotokoll des Comet-Assays .....	34
2.6.3	Auswertung des Comet-Assays .....	35
2.6.4	Statistische Auswertung.....	36
2.7	Cytotoxizitätsuntersuchungen.....	37
2.7.1	Der Fluoresceindiacetat (FDA)-Assay.....	37
2.8	Der Mikronukleus Test.....	38
2.9	Elektronenmikroskopie .....	39
2.9.1	Perfusion .....	39
2.9.2	Einbettung von Organen .....	39
2.9.3	Einbettung von Zellen.....	40

2.9.4	Histochemie .....	40
2.9.5	Semidünnschnitte für die Lichtmikroskopie .....	40
2.9.6	Kontrastierung für die Elektronenmikroskopie.....	41
<b>2.10</b>	<b>Untersuchungen zur teratogenen Wirkung genotoxischer Substanzen .....</b>	<b>41</b>
2.10.1	Embryotoxizitäts- und Early-Life-Stage Tests mit dem Zebraärbling nach Nagel.....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Einzelzellelektrophorese (Comet Assay) mit Fischen und Fischzellen .....</b>	<b>45</b>
3.1.1	<i>In vitro</i> -Expositionsschemata für Zelllinien und Primärkulturen .....	45
3.1.2	Die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) mit Fischzellen.....	46
3.1.3	Voruntersuchungen zur Optimierung des Testprotokolls mit Fischzellen.....	49
3.1.4	Optimierung der Isolations- und Kulturbedingungen von primären Hepatocyten und Kiemenzellen aus dem Zebraärbling.....	51
3.1.5	Untersuchungen zum Einfluß des Geschlechts auf die Ergebnisse im Comet-Assay.....	52
3.1.6	Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung ausgewählter Monosubstanzen auf isolierte Hepatocyten und Kiemenzellen aus dem Zebraärbling .....	55
3.1.7	<i>In vivo</i> -Untersuchungen am Zebraärbling ( <i>Danio rerio</i> ).....	66
3.1.8	Untersuchungen von Zebraärblingen nach Belastung mit genotoxischen Substanzen in Life-Cycle-Experimenten .....	70
3.1.9	Voruntersuchungen zur genotoxischen Belastung von Wasserproben mit dem Comet Assay und primären Fischzellen .....	73
<b>3.2</b>	<b><i>In vitro</i>-Untersuchungen an Primärzellkulturen aus dem Zebraärbling nach Belastung mit Wasserproben aus Rhein, Elbe und Neckar .....</b>	<b>75</b>
<b>3.3</b>	<b><i>In vitro</i>-Untersuchungen zur Überprüfung des genotoxischen Potentials von Umweltproben stärker kontaminierter Standorte.....</b>	<b>80</b>
<b>3.4</b>	<b>Vergleichende Untersuchungen mit Zebraärblingen zur <i>In vivo</i>-Belastung mit Wasserproben.....</b>	<b>82</b>
<b>3.5</b>	<b>Anmerkungen zur Statistik .....</b>	<b>84</b>
3.5.1	Unterschiedliche Bewertung der genotoxischen Untersuchungen durch verschiedene Endpunkte: Tail Moment versus Tail Length .....	86
<b>3.6</b>	<b>Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Fischen im Freiland mit dem Comet Assay.....</b>	<b>88</b>
3.6.1	<i>In vitro</i> -Untersuchungen mit Primärzellkulturen aus dem Rotauge, <i>Rutilus rutilus</i> und dem Gründling, <i>Gobio gobio</i> .....	90
3.6.2	<i>In situ</i> -Experimente.....	92
<b>3.7</b>	<b>Der Mikronukleus Test.....</b>	<b>97</b>
3.7.1	Vergleichende Untersuchungen zur Auswirkung der Belastung von RTG-2 Zellen mit genotoxischen Substanzen im Mikronukleus Test.....	97
3.7.2	Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Fischen im Neckar mit dem Mikronukleus-Test.....	100
<b>3.8</b>	<b>Morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen von RTG-2 Zellen unter dem Einfluß genotoxischer Belastung .....</b>	<b>103</b>
3.8.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen.....	103
3.8.2	Ultrastrukturelle Untersuchungen .....	106
<b>3.9</b>	<b>Morphologie und Ultrastruktur der eingesetzten Primärzellen .....</b>	<b>117</b>
<b>3.10</b>	<b>Ultrastrukturelle Veränderungen in Leber und Kieme von Zebraärblingen unter dem Einfluß genotoxischer Belastung.....</b>	<b>119</b>

3.11	<b>Untersuchungen zur teratogenen Wirkung der Referenzsubstanzen auf die Embryonalentwicklung des Zebrabärblings.....</b>	<b>131</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>139</b>
4.1	<b>Voruntersuchungen zur Optimierung des Comet Assays mit RTG-2 Zellen .....</b>	<b>139</b>
4.2	<b><i>In vitro</i>-Untersuchungen mit isolierten Primärzellen aus dem Zebrabärbling .....</b>	<b>139</b>
4.2.1	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zur Genotoxizität ausgewählter Monosubstanzen .....	139
4.2.2	Untersuchungen zum Nachweis genotoxischer Substanzen in den Wasserproben von Rhein, Neckar und Elbe im <i>In vitro</i> -Ansatz.....	146
4.3	<b><i>In vivo</i>-Untersuchungen.....</b>	<b>147</b>
4.3.1	<i>In vivo</i> -Untersuchungen mit den Monosubstanzen .....	147
4.3.2	Untersuchungen zum Nachweis genotoxischer Substanzen in Wasserproben im <i>In vivo</i> -Ansatz .....	149
4.3.3	Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Zebrabärblingen aus einem Life-Cycle Experiment mit <i>4-Nitroquinolin-N-oxid</i> und <i>Benzo[a]pyren</i> .....	150
4.4	<b>Vergleich verschiedener Endpunkte in der Auswertung des Comet Assays .....</b>	<b>150</b>
4.5	<b>Nachweis von DNA-Schäden an Freilandfischen aus dem Neckar mit dem Comet Assay .....</b>	<b>152</b>
4.6	<b>Vergleichende Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Fischen .....</b>	<b>154</b>
4.6.1	Mikrokern-Untersuchungen .....	154
4.6.2	Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen von belasteten RTG - Zellen ..	156
4.6.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Leber und Kieme von Zebrabärblingen aus einem Life-Cycle Experiment mit <i>4-Nitroquinolin-N-oxid</i> .....	161
4.6.4	Untersuchungen zur Embryo- und Early-Life-Stage-Toxizität der im Comet Assay untersuchten Genotoxine mit dem Zebrabärbling.....	162
4.7	<b>Zusammenführung.....</b>	<b>165</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>173</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>175</b>

## 1 Einleitung

Durch die rasche technische und industrielle Entwicklung und den damit verbundenen Anstieg der gesellschaftlichen Konsumbedürfnisse sind in den letzten Jahrzehnten rund vier Millionen neuer chemischer Verbindungen und Stoffgemische in die Umwelt entlassen worden, mit denen die verschiedenen Lebensformen auf unserer Erde bis vor etwa 100 Jahren noch nicht in Berührung gekommen waren (Ditton und Erdinger, 1994). Nach OECD-Schätzungen steigert sich diese Zahl jährlich um 1500 neue Chemikalien, die in unterschiedlichem Ausmaß freigesetzt werden (López-Barea und Pueyo, 1998). Ein Schritt, diese Entwicklung zumindest zu überwachen war die Implementierung des Chemikaliengesetzes der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1982. Diesem Gesetz zufolge müssen alle nach diesem Zeitpunkt auf den Markt gebrachten Substanzen je nach prognostizierter Produktionsmenge einem darauf abgestimmten Prüfungsverfahren unterzogen und unter anderem auf ihre mutagene Aktivität untersucht werden. Weiterhin müssen nun auch Untersuchungen zur Beurteilung des ökotoxischen Potentials durchgeführt werden, wobei Organismen unterschiedlicher Organisationsstufe wie Bakterien, Algen, Wasserflöhe und Fische herangezogen werden müssen (Rudolph und Boje, 1987). Da aber alle vor diesem Zeitpunkt eingeführten Substanzen sowie deren Zwischenprodukte aus den Herstellungsprozessen nicht auf ihre erbgutschädigende Wirkung hin untersucht werden müssen, konnte bisher nur ein Bruchteil der eingetragenen Stoffe bezüglich möglicher Umweltgefährdungspotentiale überprüft werden. Weiterhin kann die Klassifizierung eines Stoffes in verschiedene Gefährdungsstufen das Verhalten dieser Substanz in der Umwelt, bedingt durch synergistische / antagonistische chemischen Interaktionen sowie durch Modifikationen in biologisch-stoffwechselaktiven Systemen häufig nur unvollständig wiedergeben.

Auch im Wasserhaushaltsgesetz ist die Prüfung auf Erbgutschädigung mittlerweile verankert, denn der Paragraph § 7a fordert die Erfassung des genotoxischen Potentials von Abwassereinleitungen, eine unbedingt notwendige Maßnahme, da größere Fließgewässer, aus abwassertechnischer Sicht auch als Vorfluter bezeichnet, sowohl der Abwasserentsorgung wie auch gleichzeitig der Trinkwassergewinnung dienen. Der Rhein entsorgt als einer der wichtigsten mitteleuropäischen Flüsse nicht nur die kommunalen und industriellen Hinterlassenschaften mehrerer Ballungsräume, sondern ist auch Trinkwasserreservoir, über z.B. Uferfiltrate, für etwa 20 Millionen Menschen.

Aufgrund der enormen Stoffvielfalt und möglicher Modifikationen durch die Umwelt sowie des apparativen und finanziellen Aufwands ist die chemischen Analytik zur Identifizierung einzelner genotoxischer Noxen kein geeignetes Mittel zum Screening von Umweltproben im aquatischen Bereich. Hier sind biologische Testsysteme die schnellere und praktikablere Alternative (Claxton et al., 1998). In den letzten Jahren hat der enorme Fortschritt in den unterschiedlichsten biologischen Wissenschaftszweigen auch für die Ökotoxikologie neue Werkzeuge zur Beurteilung von Umweltproben geliefert. Somit kann immer häufiger zumindest im Screening auf die Belastung von Lebewesen in sogenannten akuten Toxizitätstests verzichtet werden. An deren Stellen treten immer häufiger prokaryontische und/oder eukaryontische Systeme, die auf den unterschiedlichsten biologischen Ebenen für die entsprechenden Fragestellungen modifiziert wurden. Allerdings zeigen diese als sogenannte Screening- oder Indikatortests bezeichneten Systeme nur die mit dem gewählten biologischen Endpunkt charakterisierte Reaktion auf eine Umweltprobe an. Ist die Probe beispielsweise in einem Genotoxizitätstest positiv, sind jedoch in der Regel noch keine Rückschlüsse auf die verantwortlichen Inhaltsstoffe und/oder das tatsächliche Gefährdungspotential der Probe möglich. Weiterhin ist die Kombination verschiedener, einander ergänzender Indikatortests notwendig, da einzelne biologische Systeme nicht

in der Lage sind, das genotoxische Potential, beispielsweise eines belasteten Gewässers, vollständig zu erfassen (Helma et al., 1994).

Zur effektiven Prüfung und Charakterisierung von Umweltproben bezüglich Genotoxizität ist somit eine hierarchisch gegliederte Testbatterie mit einfach durchzuführenden, unterschiedliche Endpunkte repräsentierenden Indikator-Tests in der 1. Stufe notwendig. Bei einem positivem Befund wird eine Teststrategie aus biologischen Tests zur Charakterisierung des Schadensereignisses und gegebenenfalls chemischer Analyse der Probe zur Identifizierung von Agens und eventuell Verursacher induziert. Die Zusammensetzung einer solchen Testbatterie vereinfacht sich deutlich, falls auf Indikator-Testsysteme zurückgegriffen werden kann, die nicht nur für die Routine-Prüfung etabliert und sensitiviert, sondern deren Endpunkte vor allem hinsichtlich ihrer biologischer Bedeutung ausreichend charakterisiert wurden. Da besonders die Verwirklichung des letzten Punktes hohe Arbeitsanforderungen und Kosten bedingt (*Durchführung verschiedener akuter und chronischer Tests*) sowie die Gefahr birgt, den selbst etablierten Test aufgrund mangelnder biologischer Relevanz nicht empfehlen zu können, befindet sich die biologische Charakterisierung dieser Endpunkte gerade unter ökotoxikologischen Gesichtspunkten häufig noch in den Anfängen.

Einen Anstoß zur Entwicklung und zum Einsatz von Genotoxizitätstests im Biomonitoring der aquatischen Umwelt lieferten Studien, die pathologische Veränderungen und Tumorzinzen in Fischen aus stark kontaminierten Gewässern feststellen konnten (Malins et al., 1985; Myers et al., 1987; als Review siehe Moore und Myers (1994)). Weiterhin konnten epidemiologische Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen Gewässerkontaminationen mit genotoxischen Substanzen und cancerogenen Effekten bei Menschen und Tieren aufzeigen (Black und Baumann, 1991; Griffith und Riggan, 1989; Helma et al., 1994; Varanasi et al., 1989). Anderson und Wild (1994) wiesen darauf hin, daß genotoxische Belastungen durch die negative Beeinflussung der Reproduktion über Absterben von Gameten, erhöhter Mortalität von Entwicklungsstadien oder durch Induktion von Mutationen einen starken Einfluß auf die Populationsdynamik nehmen können und somit die Genotoxizität ein wichtiges Untersuchungsgebiet innerhalb der Ökotoxikologie darstellt.

Fische reagieren, wie in den Untersuchungen zu Tumorzinzen in stark kontaminierten Gewässern gezeigt, sehr sensitiv auf Belastung mit cancerogenen Stoffen. Weiterhin sind sie die einzige Gruppe primär wasserlebender Vertebraten und damit häufig Endglieder der Nahrungskette; als solche sind sie wichtige Testorganismen zur Beurteilung von Gewässerbelastungen (Nagel und Isberner, 1998). Auch wenn es das primäre Ziel ökotoxikologischer Untersuchungen ist, *die Auswirkungen von Umweltchemikalien, wie z.B. Pflanzenschutzmittel, auf Organismen, Populationen und Lebensgemeinschaften bis hin zu Ökosystemen, soweit aufgrund einer Exposition direkt oder indirekt Schäden entstehen zu erfassen* (Klein und Debus, 1994), so kann eine gewisse Fokussierung auf das Schutzgut menschliche Gesundheit im Zusammenhang mit der Nutzung dieser untersuchten Gewässer selten verneint werden. Auch unter diesem Gesichtspunkt wird die Verwendung des Wirbeltieres Fisch als aquatisches Untersuchungsobjekt mit der geringsten evolutiven Distanz zum Menschen häufig betrachtet.

### 1.1 DNA-Schäden und -Reparatur

Die DNA als Träger der Erbinformationen ist, bedingt durch ihre Größe und ihren chemischen Aufbau, ein nur bedingt stabiles Molekül, welches spontanen und chemisch induzierten Veränderungen unterworfen ist (Vonarx et al., 1998). Hierbei ist die Klassifizierung in spontane und umweltinduzierte DNA Schäden eher beliebig, da es keine mechanistischen Unterschiede zwischen beiden Formen gibt und ‚spontan‘ die Möglichkeit nicht ausschließt, daß das putative Agens bisher nur noch nicht identifiziert wurde (Friedberg et al., 1995). Eine der Hauptquellen für ‚spontane‘ Veränderungen der DNA ist das ‚mispairing‘ von Basen während der DNA-Synthese bei der Replikation oder der Reparatur von

Schäden selbst, da einerseits die reine Energiedifferenz bei der Paarung komplementärer Basen im Vergleich zu nicht-komplementären Basen nur äußerst gering ist und andererseits die Basen in verschiedenen tautomeren Formen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften vorliegen können (Friedberg et al., 1995). Zur Stabilität der Erbinformation tragen also hauptsächlich weitere Faktoren wie Reparatur- und ‚proof reading‘-fähige Enzymsysteme bei.

Eine weitere wichtige Quelle für DNA-Schäden ist der oxidative Stress, also der Angriff reaktiver Sauerstoffformen (z.B. Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikal, Singulett-Sauerstoff, Superoxidradikalanion) auf zelluläre Makromoleküle. Diese entstehen auch im ‚normalen‘ Zellstoffwechsel und haben zur Implementierung von Abwehrsystemen, wie Superoxiddismutase, Katalase, und Radikalfängern wie Gluthation und Vitamin C geführt. Nach Dizdaroglu (1992) reagieren die verschiedenen Sauerstoffspezies allerdings nicht direkt mit der DNA, sondern produzieren in einer Fenton-Reaktion mit komplexierten Eisenionen Hydroxylradikale. Diese können Strangbrüche, AP-Stellen (apurinische/apyrimidinische Stellen) sowie Basenmodifikationen wie das 8-Hydroxyguanin induzieren, welches zu ‚mismatching‘ während der Replikation führt.

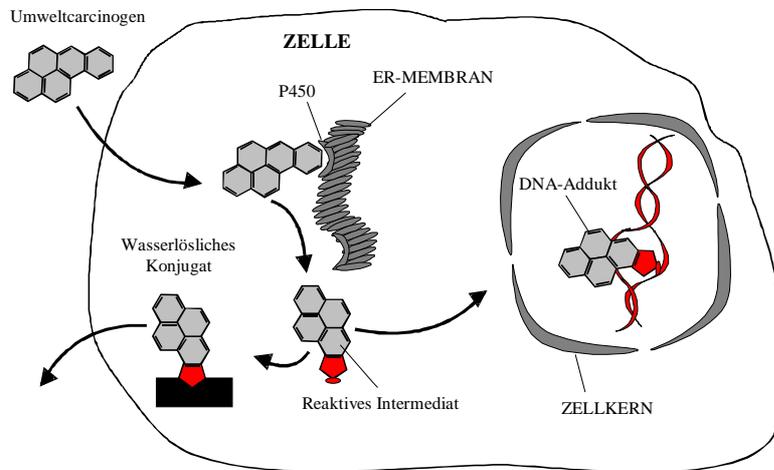
Eine breite Palette von Umweltfaktoren kann mit der DNA in Wechselwirkung treten. In diesem Zusammenhang wären die verschiedenen Formen von Strahlung wie ionisierende und UV Strahlen zu nennen, die Basenmodifikationen, Photoprodukte, wie unterschiedliche Basendimere, Strangbrüche und AP-Stellen direkt oder indirekt über radikalische Reaktionen induzieren können (Alapetite et al., 1996; Arlett et al., 1993; Kruszewski et al., 1998; Sak et al., 1996; Tornaletti und Pfeifer, 1996; Wojewodzka et al., 1998).

Eine wichtige Stoffgruppe sind alkylierende Substanzen; hierunter faßt man elektrophile Substanzen zusammen, die eine hohe Affinität zu nukleophilen Zentren in organischen Makromolekülen haben (Friedberg et al., 1995). Als Beispiele können hier die auch in dieser Studie verwendeten Gentoxine *Dimethylnitrosamin* und *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* genannt werden; letzteres methyliert praktisch alle erreichbaren Sauerstoff- und Stickstoffatome der DNA (Slamenova et al., 1997). Innerhalb der alkylierenden Substanzen werden noch mono- und bifunktionelle Alkylantien unterschieden, erstere mit nur einer funktionellen Gruppe, letztere mit zwei Gruppen. Diese Substanzen leiten dann zu einem weiteren DNA-Schaden über, der Vernetzung von DNA-Strängen (*Cross links*), durch die die Replikation in diesen Bereichen unterbunden werden kann.

Weitere häufige Schadereignisse sind die Bildung von Addukten an der DNA, oft verursacht durch eigentlich wenig reaktive Umweltchemikalien wie viele polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs), die erst durch die Verstoffwechslung in der Zelle in reaktive Metabolite überführt werden und dann an die DNA binden (siehe Abb. 1). DNA-Addukte sind wichtige Auslöser der chemischen Carcinogenese und ein Anzeiger für die genotoxische Belastung von Organismen (Maccubbin, 1994).

Auch wenn schon erwähnt, muß hier nochmal auf einen weiteren DNA-Schaden eingegangen werden, nämlich DNA-Strangbrüche. Man unterscheidet Einzelstrang- (SSBs) und Doppelstrangbrüche (DSBs). Einzelstrangbrüche sind das weitaus häufigere Schadereignis (Belastung mit  $\gamma$ -Strahlen, 1.0 Gy: 600- 1000 SSBs, 16 – 40 DSBs. (Friedberg et al., 1995)) und können Effekte energiereicher Strahlung sein oder auf radikalische Angriffe auf die DNA zurückgehen. Details der Entstehung von Strangbrüchen sind weiterhin nicht restlos geklärt. Da bei SSBs in der Regel auch die entstehenden Enden chemisch verändert werden, ist die Reparatur nur über einen Ligationsschritt meist nicht möglich, sondern erfordert die Aktivierung komplexerer Reparaturmechanismen. Auch die Entstehung von DSBs ist nicht verstanden, sowohl ein Radikaltransfer vom ursprünglich angegriffenen Strang auf den komplementären wird diskutiert (Friedberg et al., 1995) wie auch die Entstehung von DSBs aus ‚multiple damaged sites‘. Hierfür wird dann mehr als ein Schadereignis in großer räumlicher Nähe benötigt (Pfeiffer et al., 1996). DSBs werden als Läsionen mit weitreichenden biologischen Konsequenzen

betrachtet, da sie als die Ursache von Chromosomenaberrationen, Deletionen und Mikronuklei angesehen werden (Vock et al., 1999).



**Abb. 1:**

Schematische Darstellung der metabolischen Aktivierung von unpolaren polycyclischen Umweltchemikalien über das Cytochrom P450 System. Die Bildung wasserlöslicher, gut ausscheidbarer Konjugate oder aber die Bildung von DNA -Addukten über reaktive Zwischenformen verläuft häufig häufig als Konkurrenzreaktionen. Nach (Friedberg et al., 1995), verändert.

Bei den aufgeführten DNA-Schäden handelt es sich um primäre Ereignisse: alkylierte und methylierte Basen können direkt über mispairing bei der Replikation zu Mutationen führen und DNA-Strangbrüche können in Rekombinationsereignissen, Translokationen, Deletionen und im Verlust größerer Chromosomenbruchstücke münden. Weiterhin zeigen auch die induzierten DNA-Reparaturmechanismen selbst eine gewissen Fehlerhäufigkeit. Die daraus resultierenden Ereignisse wie Mutationen und Rekombinationen sind in der Regel, bedingt durch die komplexen Genome und langen Generationszeiten, in höheren Eukaryonten kein geeigneter Endpunkt für schnelle Screeningtests. In den letzten Jahren kann aber immer häufiger auf gentechnisch veränderte Organismen (Bol et al., 1998) und modifizierte Zellkulturen als Detektionssystem zurückgegriffen werden (Bignami et al., 1987; Pluth et al., 1996; Speit et al., 1996), für Routineanwendungen haben sich diese Techniken aber noch nicht durchgesetzt. Für den direkten Nachweis von Mutationen in Kurzzeittests muß deshalb weiterhin auf Bakterientests wie den Ames Test zurückgegriffen werden. Hier wird zwar mit Mutationen der aussagekräftigere Endpunkt nachgewiesen, aber eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf beispielsweise Wirbeltiere ist nicht möglich. Sind letztere das Untersuchungsobjekt, so kann weiterhin nur der Nachweis primärer DNA-Veränderungen erbracht werden.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden große Fortschritte im Verständnis von DNA-Reparatur und der Entschlüsselung der zugrundeliegenden biochemischen Mechanismen erzielt. Hierbei konzentrierte sich die Forschung aber hauptsächlich auf Prokaryonten sowie als eukaryontische Organismen auf Hefen und Säuger. Auch zu Nematoden mit dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* sowie über die in der Genetik nicht wegzudenkende *Drosophila* ist einiges bekannt. Ansonsten aber klaffen große evolutive Lücken und schon bei Fischen ist auf diesem Gebiet nur wenig bekannt. Indirekte Indizien wie die hohen Tumorinzidenzen in belasteten Gewässern sowie das nur geringe Anschlagen von Reparaturtests sprechen für, im Vergleich zum Säuger, schwächere Reparaturleistungen (Ishikawa et al., 1984; Moore und Myers, 1994; Walton et al., 1984 a,b). Auch über DNA-Reparatur bei Pflanzen ist vergleichsweise wenig bekannt, Hinweise auf die Photoreaktivierung zur Korrektur von UV-Schäden sowie die Nukleotidexcisionsreparatur konnten aufgezeigt werden. Die Existenz weiterer Reparaturwege kann bisher allerdings nur theoretisch aufgrund der gleichen chemisch bedingten Fehlerhäufigkeit angenommen werden (Vonarx et al., 1998). Doch auch mit Pflanzen und Pflanzenzellen wurden in den letzten Jahren verschiedene Genotoxizitätstests etabliert (Grant, 1994; Ichikawa, 1992;

Keane et al., 1998; Koppen und Angelis, 1998; Koppen und Verschaeve, 1996; Ma et al., 1994, 1996; Navarrete et al., 1997).

Unter dem Begriff DNA-Reparatur werden verschiedene biochemische Mechanismen zusammengefaßt. Nach Friedberg (1994) kann eine grobe Einteilung in 3 unterschiedliche Kategorien vorgenommen werden: **(1)** Rückgängigmachung des DNA-Schadens: hierzu gehören die enzymatische Photoreaktivierung über DNA-Photolyasen, die Reparatur von O<sup>6</sup>-Guanin, O<sup>4</sup>-Alkylthymine und Alkylphosphotriestern über DNA-Alkyltransferasen sowie die reine Ligation von DNA-Strangbrüchen; **(2)** Excision eines DNA-Schadens mit der Basenexcisionsreparatur über DNA-Glykosylasen (kann zu AP-Stellen führen), der mismatch-Excisionsreparatur sowie der Nucleotidexcisionsreparatur über Endonukleasen (Entfernen eines kompletten Oligonucleotids); und **(3)** Tolerierung von DNA-Schäden.

Da der Schwerpunkt der vorliegenden Studie auf einem Genotoxizitätstest mit dem Endpunkt DNA-Strangbruch liegt, ist die folgende Unterscheidung wichtig: *Nachgewiesenen DNA – Strangbrüchen können viele unterschiedliche primäre DNA – Schäden zugrunde liegen; diese werden aufgrund der Testbedingungen in Strangbrüche übersetzt. Wird als Ergebnis eines solchen Tests von erhöhter Strangbruchrate gesprochen, so ist damit nur eine Interaktion Agens – DNA nachgewiesen und noch nichts über die tatsächliche Läsion ausgesagt, es muß sich hierbei primär nicht um Strangbrüche handeln!*

## 1.2 Verschiedene Testsysteme zum Nachweis von DNA - Schäden

Als Testsysteme im aquatischen Bereich kommen sehr unterschiedliche Methoden (siehe Tab. 1) zur Anwendung, z.B. der **Mikronukleus Test** mit Fischen (Al Sabti und Metcalfe, 1995; Belpaeme et al., 1997; De Flora et al., 1993; Hayashi et al., 1998; Minissi et al., 1996), Muscheln (Bolognesi et al., 1999; Burgeot et al., 1996), Amphibien (Djomo et al., 1995; Gauthier, 1996) sowie Zellkulturen aus Walen (Gauthier et al., 1999). Auch in der Einzelstofftestung im industriellen Bereich wird dieser Test angewendet (Albertini und Kirsch-Volders, 1997; Albertini et al., 1997). Daneben wird der **Schwesterchromatidaustausch Test** sowie der **Chromosomenaberrationstest**, die beide proliferierende Zellsysteme als Grundlage bedingen, mit verschiedensten Organismen im aquatischen Bereich angewendet (Alink et al., 1980; Hooftman und Vink, 1981; Hose und Brown, 1998). Ein weiteres häufig angewendetes Verfahren ist der **Nachweis von DNA-Addukten**, die in der chemisch induzierten Carcinogenese eine wichtige Rolle spielen (Canova et al., 1998; De Flora et al., 1991; Harvey et al., 1999; Maccubbin, 1994; Randerath, 1999; Sikka et al., 1991; Varanasi et al., 1989). Auch der **UDS Test** kann in diesem Zusammenhang genannt werden (Ishikawa et al., 1984; Walton et al., 1984 a,b,c).

Unter den gut standardisierten Bakterien-Tests sind der **Ames Test** (Helma, 1998; Knasmüller, 1998; Lambolez et al., 1994; Vahl et al., 1997; Vargas et al., 1995) sowie der **umu Test** (Oda et al., 1995; Reifferscheid et al., 1991; Vahl et al., 1997) zu nennen.

Ein weiterer Endpunkt in Genotoxizitätsprüfungen ist der **DNA-Strangbruch**. Dieser reparable DNA-Schaden kann auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden: den direkten Angriff reaktiver Substanzen und energiereicher Strahlung auf das Phosphatester-Grundgerüst der DNA, oder aber durch die Versuchsbedingungen ‚künstlich‘ induziert werden, um chemisch induzierte Veränderungen der DNA in Strangbrüche zu übersetzen. Weiterhin können die in den Assays gemessenen Strangbrüche auch eine Folge der zellulären Reparatur sein. Als Tests wären hier zu nennen die **Alkalische Filterelution** (Bihari et al., 1992; Bolognesi et al., 1999; Holme et al., 1999) und der **DNA-Aufwindungstest** (Ahnstrom, 1988). Zu diesen Genotoxizitätstests gehört auch die **Einzelzellgelelektrophorese** oder der **Comet Assay**. In diesem Test werden ebenfalls DNA-Strangbrüche quantifiziert, im Unterschied zu den beiden vorgenannten Strangbruchtests aber für einzelne Zellen. Da dieser Test

in der vorliegenden Studie eine zentrale Rolle einnimmt, wird er im folgenden Unterkapitel gesondert besprochen.

Die schnelle Entwicklung in der Molekularbiologie und Gentechnologie hat weitere, neue Methoden zum Nachweis von Genotoxizität in Umweltproben geschaffen, zu nennen wären Untersuchungen zur Detektion genetischer Veränderungen in Fischpopulationen mittels **PCR** (*polymerase chain reaction*) (Theodorakis et al., 1998, 1999) und **DNA-Sequenzanalysen** (Wirgin und Waldman, 1998). Auch erste Versuche mit **transgenen Fischen** wurden schon durchgeführt. Die Kombination von Promotor-Elementen der Metallothionein- sowie heat shock-induzierten Gene des Zebraäbrblings mit dem eingeführten GFP Reporter-Gen führte zu transgenen Fischen, die ein direktes *In vivo*-Monitoring von Schwermetall- sowie anderer Verschmutzungsbelastungen zulassen (Maclean, 1998).

**Tabelle 1:** Im Umweltmonitoring routinemäßig eingesetzte Genotoxizitätstests und ihr zugrundeliegendes Testprinzip

<b>Genotoxizitätstest</b>	<b>Testprinzip</b>
<b>Mikronukleus Test</b>	Bei der Zellteilung gehen unter Schadstoffeinfluß Chromosomen-Buchstücke oder ganze Chromosomen verloren und werden nicht in die Tochterkerne inkorporiert.
<b>Schwesterchromatidenaustausch-Test</b>	Verschiedene Zell-Präparationstechniken, differentielle Markierung der Schwesterchromatiden, mikroskopische Auswertung.
<b>Chromosomenaberrations-Test</b>	Verschiedene Zell-Präparationstechniken, Chromosomen-Anfärbung, mikroskopische Auswertung.
<b>Nachweis von DNA Addukten</b>	DNA –Verdau, Nachweis von veränderten Basen oder großen Addukten mittels HPLC, GC-MS, immunochemischen Methoden; <sup>32</sup> P-Postlabelling in Expositionsexperimenten.
<b>UDS Test (unscheduled DNA synthesis)</b>	Die Reparatursynthese, ausgelöst durch DNA-Schäden, wird durch den Einbau von <sup>3</sup> H-Thymidin quantifizierbar.
<b>Ames Test</b>	Erfassung von <i>Salmonella typhimurium</i> -Revertanten eines His <sup>-</sup> Strains auf histidin-freiem Agar nach genotoxischer Belastung.
<b>Umu Test</b>	Photometrische Bestimmung von mit dem Reparaturgen umu C gekoppelten Reporter-Gen-Produkten.
<b>Alkalische Filterelution</b>	Die DNA eines Zellpools wird isoliert und über einem Filter eluiert; mit erhöhter Strangbruchrate steigt die Geschwindigkeit, mit der die DNA den Filter passiert)
<b>DNA-Aufwindungstest</b>	Die DNA eines Zellpools wird isoliert; geschädigte DNA kann schneller in die Einzelstränge aufgeschmolzen werden als ungeschädigte; ein unterschiedliches Verhältnis einzelsträngiger zu doppelsträngiger DNA zwischen Kontrollen und Belastungsgruppen kann fluorometrisch bestimmt werden.
<b>Comet Assay</b>	Vereinzelte Zellen werden in ein Gel eingegossen und verdaut. Die Wanderung von DNA-Fragmenten während der Elektrophorese kann detektiert und quantifiziert werden.

### 1.2.1 Der Comet Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese)

Die vorliegende Studie befaßte sich im Rahmen des BMBF-Projekts „Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächengewässer“ mit der Sensitivität, Praktikabilität und Plausibilität des Comet-Assays (Einzelzellgelelektrophorese, Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) als Indikatorrest für die Induktion genotoxischer Veränderungen in Fischen (*in vivo*) und Fischzellen (*in vitro*). Dazu wurde der Comet-Assay für den Einsatz mit Zellen aus Fischgewebe optimiert und die Auswertung automatisiert.

Die Methode des Comet-Assays wurde erstmals von Rydberg und Johanson (1978) sowie von Östling und Johanson (1984) beschrieben, die die Diffusion von DNA in auf Objektträgern gegossenen Gelen beobachteten, und von Singh et al. (1988) in der Säugertoxikologie etabliert. Der Comet-Assay ist ein einfacher, schnell durchführbarer Test, der es erlaubt, DNA-Schäden auf dem Niveau der Einzelzelle zu detektieren (Fairbairn et al., 1995). Die Durchführung ist mit fast jedem eukaryontischen Zelltyp möglich und vom Zellzyklus unabhängig. DNA-Schäden können somit sowohl in proliferierenden als auch in nicht-proliferierenden Zellen nachgewiesen werden. Nachweisbare Effekte mit der hier angewendeten alkalischen Version des Assays sind Einzel- und Doppelstrangbrüche, AP-Stellen (apurinische/apyrimidinische Stellen), Cross Links und die Intensität der zellulären Reparatur, ein indirektes Maß für die Bildung von Addukten (McKelvey-Martin et al., 1993).

Der Comet-Assay findet ein weites Anwendungsfeld in sehr unterschiedlichen Bereichen aus Biologie und Medizin. Exemplarisch zu nennen wären hier Untersuchungen zum Einfluß unterschiedlicher Strahlungsarten auf Zellen und Organismen (Abt et al., 1997; Nocentini, 1995; Plappert et al., 1997; Wojcik et al., 1996), der Einsatz in der Tumorforschung und -diagnostik (Müller et al., 1994; Olive, 1995; Olive und Banath, 1996), in der Einzelsubstanzprüfung (Andreoli et al., 1997; Ashby et al., 1995; Devaux et al., 1997; Deventer, 1996; Erbes et al., 1997; Speit und Hartmann, 1995; Weßler et al., 1997) sowie neuerdings auch im Umweltmonitoring (Belpaeme et al., 1997, 1998; Binkova et al., 1996; Clements et al., 1997; Devaux 1998; Hartmann et al., 1998; Moretti et al., 1996; Pandrangi et al., 1995; Ralph und Petras, 1997, 1998 a,b; Steinert et al., 1998; Tice et al., 1997; Weßler et al., 1998). Auch mit Pflanzen wurde der Test in den vergangenen Jahren etabliert, so z. B. mit Zellen aus Tabakblättern (Gichner und Plewa, 1998; Gichner et al., 1999). Im Gegensatz zu *In vivo*-Versuchen mit Tieren, in denen isolierte und vereinzelt Zellen in das Gel eingegossen werden können, mußte das Versuchsprotokoll für Pflanzen verändert werden, um direkt aus dem exponierten Gewebe isolierte Kerne verarbeiten zu können.

### 1.3 Ziele der Arbeit

In den Untersuchungen zum Comet Assay mit Fischen und Fischzellen im Rahmen der vorliegenden Studie steht die Etablierung des Systems mit Primärzellen aus dem Zebra-Bärbling (*Danio rerio*) sowie der Vergleich der genotoxischen Wirkung *in vivo* und *in vitro* im Vordergrund. Erste Grundlagenuntersuchungen hierfür wurden mit der Dauerzelllinie RTG-2 aus der Gonade der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) vorgenommen und dabei das von Neumüller (1995) etablierte Versuchsprotokoll für Routinetestungen modifiziert. Langfristig werden Genotoxizitäts-Untersuchungen, wenn immer möglich, mit schmerzfreien *In vitro*-Systemen durchzuführen sein, jedoch spielt die Verifikation der *In vitro*-Befunde im intakten Organismus (hier: Fisch) auf dem derzeitigen Stadium der Entwicklung noch eine wesentliche Rolle.

Als Untersuchungssysteme für die *In vitro*-Experimente dienen Primärkulturen von Hepatocyten und Kiemenzellen aus dem Zebra-Bärbling; die *In vivo*-Untersuchungen wurden ebenfalls mit dem Zebra-Bärbling durchgeführt. In Phase I der Untersuchungen wurden die Fische bzw. Fischzellen mit defi-

nierten Modellsubstanzen, in Phase II mit nativen und aufkonzentrierten Proben von Oberflächengewässern belastet. Die Untersuchungen mit bekannten genotoxischen Substanzen in der Phase I dienen der Validierung und Optimierung des Testsystems Comet-Assay im *In vivo*- und *In vitro*-Ansatz mit dem Zebraäbrbling.

Weiterhin wurden in Kooperation mit M. Diekmann aus der Arbeitsgruppe Nagel der TU Dresden Zebraäbrlinge auf DNA Schäden in Hepatocyten und Kiemenzellen untersucht, die in Life Cycle-Experimenten mit Gentoxinen in umweltrelevanten Konzentrationen belastet wurden.

Als Grundlagenuntersuchungen wurden mit der permanenten Zelllinie RTG-2 folgende Experimente durchgeführt:

1. Validierung des Testprotokolls mit Hilfe ausgewählter Monosubstanzen,
2. Einfluß unterschiedlicher Denaturierungszeiten auf die Sensitivität des Assays,
3. Einfluß unterschiedlicher Elektrophoresezeiten auf die Sensitivität des Assays.

Mit isolierten Hepatocyten und Kiemenzellen aus dem Zebraäbrbling wurden folgende Experimente durchgeführt:

1. Untersuchungen zum Einfluß des Geschlechts der Spendertiere auf die Sensitivität des Assays,
2. Optimierung und Validierung des *In vitro*-Testprotokolls für den Comet-Assay mit Hilfe ausgewählter Monosubstanzen,
3. Optimierung und Validierung eines *In vivo*-Testprotokolls für den Comet-Assay mit Hilfe ausgewählter Monosubstanzen.

Als Cytotoxizitätstest wurde der Fluoresceindiacetat (FDA) Assay mit den untersuchten Substanzen sowie den Wasserproben routinemäßig durchgeführt. Um im Comet Assay nachgewiesene DNA-Schäden nur auf eine genotoxische Wirkung der untersuchten Noxe zurückführen zu können, wurden mit dem FDA Assay nicht-cytotoxische Testkonzentrationen bestimmt. Da auch über cytotoxische Prozesse eine Fragmentierung der DNA in den betroffenen Zellen ausgelöst werden kann, wäre in einem solchen Konzentrationsbereich eine Trennung cytotoxischer und genotoxischer Effekte im Comet Assay nicht möglich.

In Versuchsphase 2 wurden die weitgehend optimierten Testsysteme mit nativen Wasserproben von 4 Probenahmestellen am Rhein (Wahnbach-Talsperre, Karlsruhe, Köln und Düsseldorf) sowie 3 Probenahmestellen an der Elbe (Dessau/Mulde, Schmilka und Schnackenburg) auf ihre Eignung als Screeningtest bezüglich Sensitivität und Reproduzierbarkeit untersucht. Grundlage für die Prüfung des Oberflächenwassers waren die optimierten Einstellungen aus den Untersuchungen an den Monosubstanzen wie die dort ermittelte optimale Expositionszeit, um so ein möglichst breites Spektrum an Substanzen mit dem Comet-Assay und Fischzellen nachweisen zu können. Neu entwickelt werden mußte allerdings ein *In vitro*-Expositionsschema, welches es erlaubt, unter möglichst einfachen arbeitstechnischen Bedingungen die eingesetzten Zellen einem möglichst hohen Anteil der zu untersuchenden Wasserprobe zu exponieren. Da die Phase I-Ergebnisse belegen, daß die beiden Zellsysteme Hepatocyten und Kiemenzellen in ihrer Reaktion auf die Mutagene recht einheitlich reagieren, wurden in der Phase 2 hauptsächlich die metabolisch kompetenteren und an vielen Entgiftungsreaktionen des Körpers beteiligten Hepatocyten getestet und die Kiemenzellen nur exemplarisch untersucht.

Zusätzlich zu den Untersuchungen der Wasserproben von der Rhein- und Elbeschiene im Rahmen des Routine-Meßprogramms wurden im Rahmen des Projekts weitere Umweltproben untersucht. Im August und Oktober 1997 wurden 2 Grundwasserproben aus dem Sanierungsgebiet der Gaswerke Düsseldorf, welches vor allem mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) belastet ist,

auf ein mögliches genotoxisches Potential untersucht. Von Februar 1998 bis Mai 1998 wurden 2 weitere Proben von der Wassergütestation Schmilka sowie 2 Proben von der Wupper, einem weiterhin als stark verschmutzt einzustufenden Fluß, getestet. Ebenso wurden Wasserproben aus dem Neckar getestet, um diese mit den Ergebnissen von Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Rotaugen (*Rutilus rutilus*) und Gründlingen (*Gobio gobio*) von diesen Probenahmestellen zu vergleichen. Die *In situ*-Untersuchung wurde auch durch die Ergebnisse einer älteren Studie stimuliert, in der cytopathologische Veränderungen in Rotaugen von diesen Standorten beobachtet werden konnten (Schnurstein, 1996).

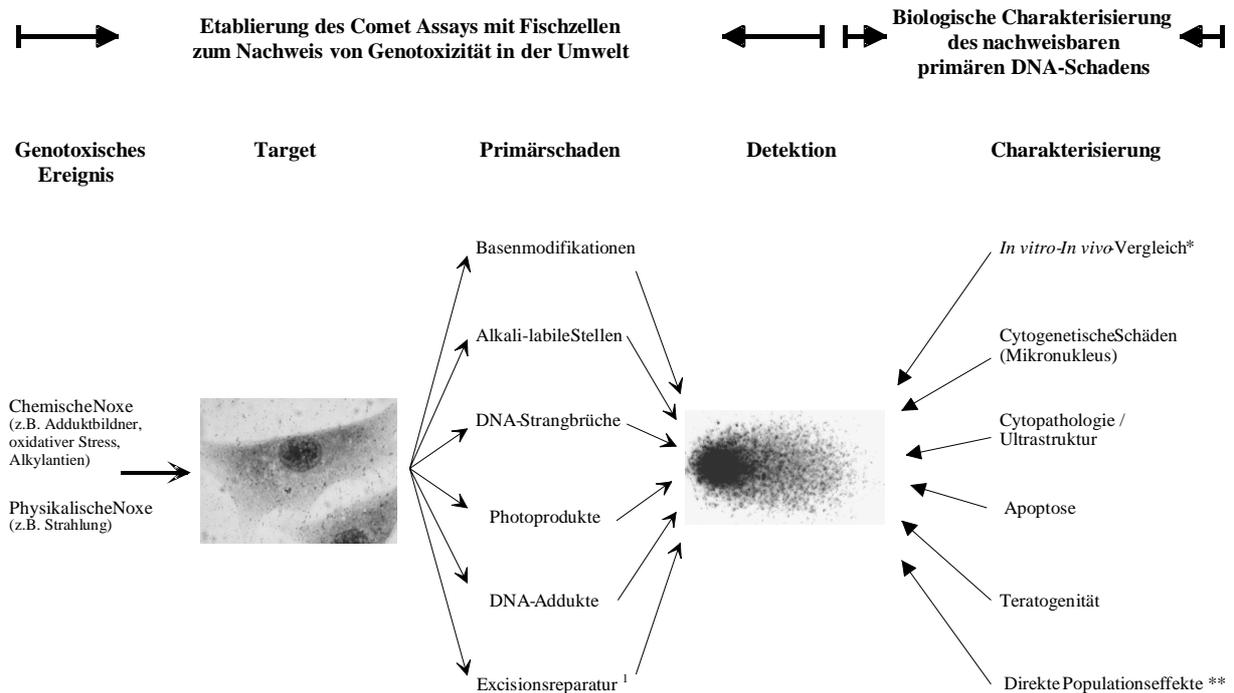
Nach Abschluß der Untersuchungen zur Eignung des Comet Assays als Routine-Screeningtest sollte in einer 3. Phase der Versuch unternommen werden, mit vergleichenden Untersuchungen zu anderen biologischen Endpunkten erste Antworten auf Fragen nach der biologischen Relevanz des Endpunkts DNA-Strangbruch im Comet Assay mit Fischen und Fischzellen zu ermitteln (siehe Abb. 2 und Tab. 1).

Hierzu wurde ein weiterer Genotoxizitätstest, der Mikronukleus Test durchgeführt. Dieser Test ist als Routinetest in der Genotoxikologie fest etabliert und wird sowohl von Behörden wie Industrie mit Knochenmarkszellen aus der Maus sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* routinemäßig eingesetzt (Fahrig, 1994). Im Gegensatz zum ‚Durchgangsphänomen‘ DNA-Strangbruch handelt es sich bei diesem Endpunkt um einen nicht reversiblen Schaden, der entweder auf eine chromosomenbrechende Wirkung des Schadagens zurückzuführen ist (*clastogene Wirkung*) oder aber auf Störungen der Funktion des Spindelapparats (*aneugene Wirkung*) beruht. Sowohl für betroffene somatische Zellen als auch für sich aus geschädigten Keimzellen entwickelnde Organismen kann dieser Schadensfall drastische Konsequenzen haben. Der Mikronukleus oder Mikrokern Test wurde mit RTG-2 Zellen und den im Comet Assay verwendeten Monosubstanzen sowie mit Erythrocyten aus Blutproben der Freilandfische aus dem Neckar durchgeführt.

In zahlreichen Untersuchungen haben sich cytologische und ultrastrukturelle Veränderungen als sensitive Parameter zum Nachweis von Schadstoffbelastungen und umweltinduziertem Stress bewährt (Braunbeck, 1989, 1992, 1998; Braunbeck und Storch, 1992; Braunbeck und Völkl, 1993; Burkhardt-Holm et al., 1990, 1999; Réz, 1986; Segner, 1998). Über die Kooperation mit der TU Dresden konnten auch Zebraabärblinge aus dem Life Cycle mit *4-Nitroquinolin-N-oxid*, eines der im Comet Assay getesteten Genotoxine, elektronenmikroskopisch auf Veränderungen in Leber und Kieme durch chronische genotoxische Belastung untersucht werden. Weiterhin wurden mit RTG-2 Zellen Expositionsversuche mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* in den im Comet Assay getesteten Konzentrationen mit unterschiedlichen Expositionszeiten unternommen und die Zellen ebenfalls auf ultrastrukturelle Veränderungen untersucht. Hiermit sollte geklärt werden, ab welcher Schadensintensität im Comet Assay ultrastrukturelle Veränderungen auftreten, ob eine Stressantwort der Zellen auf die genotoxische Belastung erkennbar wird (*beispielsweise eine Proliferation der Peroxisomen als Antwort auf oxidativen Stress*) und ob sich die Verlängerung der Expositionszeit auf die Schadensintensität auswirkt.

Alle im Comet Assay getesteten genotoxischen Noxen wurden auch auf ihr teratogenes (keimschädigendes) Potential in Embryotoxizitäts- und Early-Life Stage Tests mit dem Zebraabärbling untersucht. Da es sich bei der Embryo-Larval-Phase um einen sehr sensitive Abschnitt im Leben eines Organismus handelt (McKim, 1985; Nagel und Isberner, 1998) sollte sich dieses Testsystem besonders zur Evaluierung genotoxischer Effekte eignen, denn rasche Differenzierungsprozesse und die hohe Zellteilungsrate (der Zebraabärbling entwickelt sich unter den gewählten Bedingungen innerhalb von 96 h zur freischwimmenden Larve) müssten eigentlich sehr empfindlich auf Interaktionen genotoxischer Noxen

mit der DNA reagieren. Gleichzeitig zeigt der Endpunkt Embryo-Larval-Toxizität auch eine ökologisch wichtige Dimension auf.



**Abb. 2:** Schematische Übersicht zur Aufgabenstellung in dieser Untersuchung: (1) Etablierung des Testsystems Comet Assay mit Fischzellen und Fischen zum Nachweis genotoxischer Effekte in der Umwelt, (2) Charakterisierung der nachgewiesenen Effekte im Comet Assay mit vergleichenden Untersuchungen.<sup>1</sup> Im Zuge der Excisionsreparatur werden Schnitte gesetzt, um schadhafte Oligonukleotide zu entfernen oder um neue Basen einzusetzen; die Reparatur ist natürlich eine Folge primärer DNA Schäden; da ihre Intensität aber im Comet Assay darstellbar ist, wurde sie auch unter Primärschäden gruppiert.\* Vergleich der *In vitro*-Comet Assay Ergebnisse mit *In vivo*-Belastungen unter Laborbedingungen sowie *In situ*-Belastungen im Freiland. \*\* Ergebnisse von M. Diekmann, AG Nagel, Hydrobiologie, TU Dresden.

Mit diesen zusätzlichen biologischen Testsystemen sollte überprüft werden, inwieweit der Comet Assay die in diesen Tests beobachteten Effekte sinnvoll abbildet. Lassen sich beispielsweise mit keiner der getesteten Monosubstanzen in einem anderen Testsystem / Untersuchungsobjekt in den im Comet Assay untersuchten Konzentrationen irgendwelche biologischen Antworten erzielen, so muß die Relevanz der Comet-Daten bezweifelt werden (*falsch-positive Ergebnisse*). Finden sich andererseits schon deutliche Effekte an der Nachweisgrenze im Comet Assay oder sogar darunter (als Beispiel sei eine stark erhöhte Embryonensterblichkeit genannt) dann wäre der Test nicht sensitiv genug; dieses ließe allerdings Spielraum für Modifikationen im System.

Für die Empfehlung als Indikator-test im Rahmen einer Testbatterie sowie als notwendige Interpretationsgrundlage für die mit dem Test erarbeiteten Daten sind solche vergleichenden Untersuchungen von eminenter Wichtigkeit. Die im folgenden beschriebenen und diskutierten Untersuchungen haben dieses Thema keineswegs vollständig abgedeckt, eine bessere Einordnung des Testsystems auf dieser Basis ist aber durchaus möglich.

**Tabelle 1:** Im Rahmen dieser Studie zu Genotoxizität bei Fischen und Fischzellen durchgeführte Untersuchungen

Testsystem		Substanzen	Zellen/Organismus
<b>Comet Assay</b>	<i>in vitro</i>	Monosubstanzen: 2-AAF, BP, DMNA, NF, MNNG, 4-NQO, UV C <sup>1</sup>	RTG-2 Zellen Hepatocyten, Kiemenzellen aus Zebrabärbling, Rotauge und Gründling
		Wasserproben (Rhein, Elbe, Neckar, Wupper, Gaswerke Düsseldorf)	RTG-2 Zellen Hepatocyten, Kiemenzellen aus dem Zebrabärbling
	<i>in vivo</i>	Monosubstanzen  Life Cycle Proben <sup>2</sup> BP, 4-NQO Wasserproben	Hepatocyten, Kiemenzellen aus dem Zebrabärbling Hepatocyten, Kiemenzellen aus dem Zebrabärbling Hepatocyten, Kiemenzellen aus dem Zebrabärbling
	<i>in situ</i>	Freilanduntersuchungen: Neckar, Forellenbach, Kraichbach	Hepatocyten, Kiemen- und Darm- zellen aus Rotauge, Gründling, Bachforelle und Stichling
<b>FDA<sup>3</sup> Assay</b>	<i>in vitro</i>	Cytotoxizitätstest in Monosubstanz- und Wasserproben-Untersuchungen <i>in vitro</i> ;	Primärzellen aus Fischen, RTG-2 Zellen
	<i>in vivo</i>	Vitalitätstest nach Zellisolation <i>in vivo</i>	Primärzellen aus Fischen,
<b>Mikronukleus Test</b>	<i>in vitro</i>	Monosubstanzen: BP, MNNG, 4-NQO	RTG-2 Zellen
	<i>in situ</i>	Freilanduntersuchungen: Neckar, Forellenbach	Erythrocyten aus Blutproben der Tiere für den Comet Assay: Rot- augen, Gründlinge, Bachforellen
<b>Elektronenmikroskopie</b>	<i>in vitro</i>	4-NQO	RTG-2 Zellen, Primärzellkulturen von Zebrabärbling und Rotauge
	<i>in vivo</i>	4-NQO im Life Cycle	Leber und Kieme von Zebrabär- blingen
<b>Embryo- und Early Life Stage-Toxizität</b>		Monosubstanzen: 2-AAF, BP, DMNA, NF, MNNG, 4-NQO, UV C	Embryo-Larvalentwicklung des Zebrabärblings

<sup>1</sup> Untersuchte Monosubstanzen: 2-AAF: 2-Acetylaminofluoren; BP: Benzo[a]pyren; DMNA: Dimethylnitrosamin; NF: Nitrofurantoin; MNNG: N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin; 4-NQO: 4-Nitroquinolin-N-oxid; UV C: UV C-Licht.

<sup>2</sup> Life Cycle durchgeführt von M. Diekmann, AG Nagel, Hydrobiologie, TU Dresden

<sup>3</sup> FDA Assay: Fluoresceindiacetat Assay



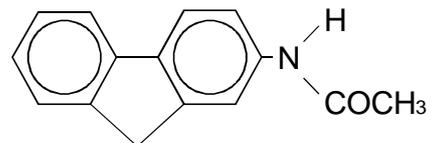
## 2 Material und Methoden

### 2.1 Monosubstanzen

Bei den im Rahmen der Etablierung und Validierung des Comet Assays mit Fischen und Fischzellen untersuchten genotoxischen Noxen handelt es sich um bekannte Mutagene bzw. potentielle Carcinogene. Hierbei wird zwischen direkt und indirekt wirkenden Carcinogenen unterschieden, die direkt wirkenden, wie z.B. *Wasserstoffperoxid* und *UV Licht* können ohne metabolische Aktivierung mit der DNA in Wechselwirkung treten, die indirekten, wie z.B. *Benzo[a]pyren* werden dazu erst vom Zellstoffwechsel in aktivierte Formen überführt. Im folgenden wird der Terminus indirekt wirkend ausschließlich für die Genotoxine verwendet, die über das Cytochrom P450 System aktiviert werden, alle anderen, wie auch die über zelluläre Nitroreduktasen metabolisierten Substanzen *Nitrofurantoin* und *4-Nitroquinolin-N-oxid* werden als direkt wirkend bezeichnet. Diese Einteilung wird durch das unterschiedliche Verhalten der beiden Stoffgruppen in den folgenden Untersuchungen mit dem Comet Assay illustriert. Von den getesteten Substanzen wurden Stammlösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt, dieser Lösungsvermittler wird aufgrund seines vergleichsweise geringen toxischen Potentials häufig in biologischen Experimenten eingesetzt (Ashby et al., 1995; Mitchelmore et al., 1998; Weßler et al., 1998). In Vorversuchen wurden DMSO-Konzentrationen ermittelt, in denen keine im Test meßbaren Beeinflussungen der Zellen durch den Lösungsvermittler bezüglich Geno- und Cytotoxizität feststellbar waren. In jedem Einzelexperiment wurden dem Kontrollansatz eine der DMSO-Stammlösungen der höchsten Konzentration adäquate Menge reinem DMSO zugegeben. Hierbei lag die maximal eingesetzte DMSO-Konzentration im *In vitro*- wie auch im *In vivo*-Ansatz bei 1 %. Zur Ermittlung der LOEC- (*Lowest observed effect concentration*) und NOEC- (*No observed effect concentration*) Werte zur Genotoxizität im Comet Assay wurden jeweils mindestens 3 unabhängige Versuche pro Substanz durchgeführt.

#### 2.1.1 2-Acetylaminofluoren

*2-Acetylaminofluoren* (2-AAF, Abb. 3) gehört zu den aromatischen Aminen (Arylaminen), die mit Ausnahme einiger komplexer Verbindungen, die während der Pyrolyse entstehen (z.B. an der Oberfläche von zu stark gebratenem Fleisch) nicht natürlich vorkommen, sondern ausschließlich synthetisch hergestellt werden (Farbstoffe, Pharmaka, Antioxidantien, (Marquardt, 1994). Carcinogen wirksame aromatische Amine sind in der Regel nicht lokal wirksam, sondern erzeugen Tumore in ganz bestimmten,



**Abb. 3:**  
*2-Acetylaminofluoren*

für die Substanz charakteristischen Geweben (Organotropie, (Neumann, 1992). *2-Acetylaminofluoren* wurde als Insektizid entwickelt, jedoch aufgrund festgestellter Toxizität und Tumorgenität nicht auf den Markt gebracht (Verna et al., 1996). 2-AAF ist eine der am häufigsten untersuchten Modellsubstanzen in der Krebsforschung (Kriek, 1992). Die Substanz ist ein Procarcinogen, das erst nach metabolischer Umwandlung auf die DNA wirkt. Es sind mehrere Metabolite bekannt, die in unterschiedlichen Stoffwechselwegen entstehen und verschiedene Eigenschaften bezüglich ihrer Interaktion mit der DNA und Detoxifizierung haben (Lenk und Rosenbauer-Thilmann, 1993). Der erste Schritt der Metabolisierung von 2-AAF zum Carcinogen ist die *N*-Hydroxylierung durch Cytochrom P450 zu *N*-Hydroxy-AAF, wobei CYP1A2 die höchste Umwandlungsrate innerhalb der Enzymfamilie des Cyto-

chrom P450 besitzt (Rodrigues et al., 1994). *N*-Hydroxy-AAF ist der wichtigste Metabolit, da aus ihm durch Einwirkung von Deacetylase Aminofluoren entstehen kann, das nur in geringem Umfang Addukte an der DNA bildet (Steward et al., 1995), aber auch verschiedene stärkere Carcinogene, die durch andere cytosolische Enzyme gebildet werden:

1. Die *N*-Acetyltransferase wandelt *N*-Hydroxy-AAF in *N*-Acetoxy-Aminofluoren um, das instabil ist und nach Abspaltung des Essigsäurerests kovalent an die DNA bindet (King, 1974). Dieses Enzym zeigt beim Menschen einen Polymorphismus (geringe und hohe Metabolisierungskapazität), während Hamster schnell, Hunde und Ratten aber nur langsam acetylieren; für die toxische Wirkung sind diese kinetischen Unterschiede von Bedeutung (Marquardt, 1994)
2. Die Sulfotransferase bildet mit *N*-Hydroxy-AAF einen *N*-Sulfatester, der ebenfalls instabil ist und kovalent an die DNA bindet (Monteith, 1992).
3. Die Glucuronyltransferase überträgt einen Glucuronsäurerest, das entstehende AAF-*N*-O-Glucuronid spaltet leicht die *N*-O-Bindung oder Essigsäure ab und bindet ebenfalls kovalent an die DNA.
4. Parallel zur *N*-Hydroxylierung erfolgen in der Leber von Hamster und Maus auch Hydroxylierungen der Kohlenstoffatome 3, 5, 7 und 9. Die Umwandlung von 9-Hydroxy-AAF führt zu einem weiteren wichtigen Metaboliten, AAF-9-on, der zwar durch *N*-Hydroxylierung ebenfalls zum Procarcinogen umgewandelt werden kann, aber möglicherweise leichter detoxifiziert wird als AAF selbst (Ray und Wejbe, 1964).

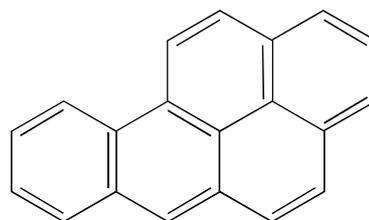
Die Bindung der reaktiven Intermediate an die DNA erfolgt bevorzugt an Guanin, die Angriffspunkte sind C8 und N2, als Addukte entstehen dG-C8-AAF und dD-N2-AAF (Monteith, 1992).

Die beschriebenen Metabolisierungsmöglichkeiten wurden hauptsächlich an Säugetieren untersucht (Steward et al., 1995), aber auch für verschiedene Fischarten wie Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Medaka (*Oryzias latipes*) und Guppy (*Poecilia reticulata*) bestätigt (James et al., 1994). Allerdings existieren zwischen den genannten Arten aufgrund der verschiedenen Isoformen der an der Metabolisierung von 2-AAF beteiligten Enzyme große Unterschiede in der Umsetzungsrate der verschiedenen Metabolite (Sikka, 1995). Die Befunde an den untersuchten Fischarten weisen darauf hin, daß Fische den ersten Umwandlungsschritt von AAF zu *N*-Hydroxy-AAF im Vergleich zu Säugern nur sehr langsam vollziehen, da ihr Cytochrom P450-System nur eine geringere Spezifität für AAF besitzt. Als Folge davon ist das Gleichgewicht der vorhandenen Metabolite in Richtung leichter zu detoxifizierender Metabolite verschoben (Steward et al., 1995).

Untersucht wurden in den *In vitro*-Prüfungen Konzentrationen zwischen 1,12 mg/L und 223,3 mg/L, in den *In vivo*-Prüfungen zwischen 1,1 mg/L und 11,0 mg/L.

### 2.1.2 *Benzo[a]pyren*

*Benzo[a]pyren* (BP, Abb.4) ist ein aus fünf Ringen bestehender Vertreter der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAHs oder PAKs) und stellt eines der am längsten bekannten Carcinogene dar (1775 berichtete Pott über die ungewöhnlich hohe Inzidenz von Hodenkrebs bei Schornsteinfegern). *Benzo[a]pyren* wird in der Natur möglicherweise durch verschiedene Bakterien oder Algen synthetisiert, entsteht bei Verbrennungen und kommt in Rohöl vor (Hofer und Lackner, 1995). In reiner Luft wurden durchschnittlich 0,01 ng/m<sup>3</sup> gemessen, in Stadtluft 6,5 ng/m<sup>3</sup> und in Autoabgasen bis 20 ng/m<sup>3</sup>. Rohöl enthält bis zu 2,8 mg/L *Benzo[a]pyren*, Benzin bis zu 0,14 mg/L, Straßenteer bis zu 10 g/kg und Zigarettenrauch bis zu 25 ng pro Zigarette (Rippen, 1995). Die in die Um-



**Abb.4:**  
*Benzo[a]pyren*

welt eintretende Menge an *Benzo[a]pyren* beträgt 5000 t/a (Heizung und Elektrizitätserzeugung 2600 t, Abfallverbrennung 1350 t, Kokserzeugung 1000 t). Es ist in wäßrigen Medien sehr schlecht löslich und reichert sich in Gewässern vor allem im Sediment an (Rhein: 10 – 165 ng/L, (Streit, 1994). *Benzo[a]pyren* ist wie AAF ein Procarcinogen und wird ebenfalls durch Cytochrom P-450 aktiviert. Die an Zellkulturen von Nagern gut untersuchte Aktivierung von BP erfolgt über CYP1A1 zu BP-7,8-Epoxid, das durch Epoxid-Hydrolasen in BP-7,8-Diol umgewandelt wird. Eine zweite Katalyse durch CYP führt zum BP-7,8-Diol-9,10-Epoxid, das in vier Stereoisomeren vorliegt. Nur ein Stereoisomer, (+)*anti*-BP-7,8-Diol-9,10-Epoxid, bildet durch kovalente Bindung Addukte an der DNA (Walum et al., 1990).

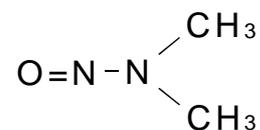
Diese Form der Aktivierung wurde für den Braunen Katzenwels (*Ictalurus nebulosus*) in *In vitro*- und *In vivo*-Untersuchungen bestätigt (Sikka et al., 1990; Sikka, 1991). Zusätzlich wurde ein weiterer Detoxifizierungsweg über Glucuronidasen nachgewiesen, über den primäre Hepatocyten das wasserlösliche BP-7,8-Diol-Glucuronid bilden (Steward et al., 1990). *In vitro*-Untersuchungen an primären Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) (Gagné und Blaise, 1995) und des Spiegelkarpfens (*Cyprinus carpio*) (Zaleski, et al., 1991) wiesen die Adduktbildung von BP-Metaboliten nach; verschiedene Zelllinien von Fischen (BB, BF-2, RTG-2) lieferten ähnliche Ergebnisse (Smolarek et al., 1987).

Die Adduktbildung führt allerdings nicht direkt zu Strangbrüchen in der DNA; derartige stabile Addukte, wie sie z.B: in verschiedenen Nordseefischen nachgewiesen wurden (Varanasi et al., 1989; Varanasi et al., 1981), können durch die Versuchsbedingungen in der alkalischen Form des Comet Assays in alkalilabile Stellen überführt werden, welche dann in ihrer Gesamtheit als DNA-Fragmentierung im Assay nachweisbar sind. Die Metabolisierung von BP durch Cytochrom P450 zu einem labilen DNA-Addukt über eine Ein-Schritt-Ein-Elektron-Oxidation, wie sie von Cavalieri et al. (1990) (Cavalieri et al., 1990) vorgeschlagen wurde, wird als Begründung für positive Ergebnisse im Comet-Assay nach 4 h Belastung von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle genannt (Devaux et al., 1997).

Untersucht wurden in den *In vitro*-Prüfungen Konzentrationen von 0,025 mg/L bis 252,3 mg/L, in den *In vivo*-Prüfungen zwischen 2,5 mg/L und 10,0 mg/L.

### 2.1.3 Dimethylnitrosamin

*Dimethylnitrosamin* (DMNA, oder *N*-Nitroso-dimethylamin, Abb.5) gehört zu den *N*-Nitroso-Verbindungen, die eine wichtige Klasse chemischer Carcinogene darstellen. Sie entstehen aus der Reaktion von Aminvorstufen mit Nitrit oder Stickoxiden und entstehen sowohl biogen als auch synthetisch. *Dimethylnitrosamin* wurde bereits vor 30 Jahren als hochgradig hepatotoxisch und carcinogen identifiziert (Williams und Weisburger, 1986; Eisenbrand und Köhl, 1994). In



**Abb. 5:**  
*Dimethylnitrosamin*

Inhalationsexperimenten traten bereits bei einer Gesamtdosis von nur 2 mg/kg *Dimethylnitrosamin* in mehr als einem Drittel der behandelten Ratten mucoepidermale Tumore in der Nasenhöhle auf (Eisenbrand und Köhl, 1994). Tagesdosen von 2 mg/kg Körpergewicht führen bei chronischer oraler Gabe zur Ausbildung hyperplastischer Knoten in der Leber männlicher Ratten. *Dimethylnitrosamin* ist Bestandteil des Zigarettenrauches mit einer Dosis von 0,1 - 180 ng im Hauptstrom einer Zigarette und stellt damit für den Menschen eine wichtige Ursache für Tumore dar (Hoffmann und Wynder, 1994). Eine weitere wichtige Quelle für *Dimethylnitrosamin* sind Nitrite (u.a. als Lebensmittelzusatz), die durch die Nahrung aufgenommen und im Organismus in Nitrosamine umgewandelt werden. Die Bildung von Nitrosaminen wird mit der Genese des menschlichen Magenkrebses in Zusammenhang ge-

bracht; diese Nitrosierungsreaktion ist mittels Vitamin C hemmbar und so ist der signifikante Rückgang des Magenkrebses in den letzten Jahrzehnten mit dem zunehmenden Pro-Kopf-Verzehr von frischem Obst und Gemüse korrelierbar (Marquardt, 1994).

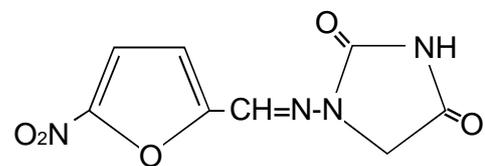
*Dimethylnitrosamin* ist wie 2-AAF und BP ein Procancerogen, dessen erster Aktivierungsschritt über das Cytochrom P450-System läuft: DMNA wird durch Hydroxilierung des  $\alpha$ -Kohlenstoffs in *N*-Nitrosoalkyl- $\alpha$ -Hydroxyalkylamin umgewandelt und bildet unter Eliminierung von Formaldehyd ein Diazoniumion, das durch die Abspaltung eines Carbeniumions unspezifische methylierende Wirkung auf Moleküle seiner Umgebung (DNA, RNA, Proteine) hat (Kroeger-Koepke, 1981).

Je nach Stelle der Methylierung treten verschiedene Folgereaktionen in der DNA auf: Die O<sup>6</sup>-Methylierung am Guanin führt zur Trennung der Wasserstoffbrücken der C-G-Basenpaarung und spielt eine wichtige Rolle in der Tumorgenese (Coccia et al., 1988; Fadlallah et al., 1994). *N*-Methylierungen hingegen führen zu 3- und 7-Methylpurinen, deren N-glykosidische Bindung destabilisiert ist und die Abspaltung der Base zur Folge haben. Eine solche Stelle wird als AP-Stelle bezeichnet (apurinische / apyrimidinische Stelle), bei der der DNA-Backbone intakt ist, jedoch durch die oxidative Spaltung der glykosidischen Bindung eine Base fehlt; diese Instabilität kann zu Einzelstrangbrüchen führen (Den Engelse et al., 1983). Solche AP-Stellen werden in der alkalischen Version des Comet-Assays aufgrund der Versuchsbedingungen in Einzelstrangbrüche übersetzt.

Untersucht wurden in den *In vitro*-Prüfungen Konzentrationen von 0,074 mg/L bis 74,08 mg/L, in den *In vivo*-Prüfungen 0,74 mg/L bis 22,3 mg/L.

#### 2.1.4 Nitrofurantoin

*Nitrofurantoin* (NF, Abb.6) ist ein Furanderivat, das durch Einführung einer Nitrogruppe in Position 5 am Furanring, der bereits in Position 2 einen Substituenten besitzt, bakterizide Wirkung erhält (Kuschinski und Lüllmann, 1987). Es ist ein verbreitetes Antibiotikum zur Behandlung von Infektionen des Urogenitaltrakts. Obwohl keine Cancerogenität in Langzeitexperimenten nachgewiesen wurde, war die DNA-schädigende Wirkung in *In vitro*-Experimenten Gegenstand



**Abb. 6:**  
*Nitrofurantoin*

vieler Untersuchungen, ohne jedoch die am Stoffwechselweg beteiligten Enzyme in ihrer Wirkung quantifizieren zu können (Babich et al., 1993; Hasspieler et al., 1997; Jurado et al., 1994; Martinez et al., 1995; Ni et al., 1987; Parodi et al., 1983; Russo et al., 1982). Für die metabolische Aktivierung von *Nitrofurantoin* wurde die Reduktion der Nitrogruppe zu einem Nitro-Radikalanion nachgewiesen, bei der nach Abspaltung eines Sauerstoffradikals zunächst eine Nitrosogruppe entsteht, die nach weiteren Reduktionen schließlich in ein Amin umgewandelt wird. Als wichtigste an der Reaktion beteiligten Enzyme wurden in Säugetieren wiederum Cytochrome der P450-Familie und cytosolische Nitroreduktasen wie z.B. Xanthinoxidasen nachgewiesen (Wang et al., 1974; Youngman et al., 1982). Beide Reaktionswege konnten auch in Fischen wie dem Gefleckten Katzenwels (*Ictalurus punctatus*) und der Amerikanischen Scholle (*Parophrys vetulus*) nachgewiesen werden (Nishimoto et al., 1991; Washburn und Di Giulio, 1988). Hierbei entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die allerdings auch im unbeeinflussten Zellstoffwechsel produziert werden und durch ein effektives Abwehrsystem, bestehend aus Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase, Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol abgefangen werden können (Younes, 1994). Zusätzliche Belastung, wie durch die Verstoffwechslung von *Nitrofurantoin*, bei der neben den erwähnten reaktiven Sauerstoffspezies auch noch das Nitroanion-Radikal entsteht, können dieses System aber überfordern, die überschüssigen Radikale können nun mit allen Makromolekülen der Zelle in Wechselwirkung treten. (Washburn und Di Giulio, 1988).

Die Schädigung der DNA resultiert in diesen Fällen hauptsächlich aus der Oxidation von Basen, die durch *N*-Glycosylasen erkannt und aus der DNA entfernt werden; hierbei entstehen AP-Stellen (Apyrimidinische / apyrimidinische Stellen) (Myles und Sancar, 1990). Weiterhin können die entstandenen Sauerstoffspezies und Radikale mit der Zucker-Phosphat-Kette in Wechselwirkung treten und so direkt Strangbrüche verursachen (Younes, 1994). Diese unter dem Phänomen des oxidativen Stresses zusammengefassten Reaktionen sind im Comet-Assay gut detektierbar.

Untersucht wurden in den *In vitro*-Prüfungen Konzentrationen von 0,23 mg/L bis 238,3 mg/L, in den *In vivo*-Prüfungen von 2,3 mg/L bis 40 mg/L.

### 2.1.5 4-Nitroquinolin-*N*-oxid

4-Nitroquinolin-*N*-oxid (4-NQO, Abb. 7) gehört wie 2-Acetylaminofluoren zu den aromatischen Aminen. Quinoline induzieren hepatozelluläre Karzinome und Hämangioendotheliome in Ratten und Mäusen sowie Tumore in der Haut. 4-Nitroquinolin-*N*-oxid ist ein Nitroazaren und gilt als carcinogen für verschiedene Organe (Marquardt, 1994). Da die Chinoline aus Strukturen bestehen, auf denen viele Medikamente basieren, ist die Erforschung ihrer Carcinogenität von großem Interesse für die pharmazeutische Industrie (Williams und Weisburger, 1986).

4-Nitroquinolin-*N*-Oxid wird in Säugern durch Nitroreduktasen in 4-Hydroxyl-Ammoniquinolin-*N*-Oxid umgewandelt, welches Addukte an der DNA bilden kann. In *In vitro*-Untersuchungen wurde die Adduktbildung und daraus resultierende AP-Stellen in Abhängigkeit von der Tertiärstruktur der DNA nachgewiesen (Galiègue-Zouitina et al., 1985; Menichini et al., 1989)). Die wichtigsten Angriffspunkte sind hierbei das C8 und N2 des Guanosins und das N2 des Adenosins (Yang et al., 1991). Kasamatsu und Kollegen wiesen 1996 in einem modifizierten Comet-Assay nach, daß 4-NQO ohne biologische Aktivierung keine DNA-Schäden verursacht. Ein zweiter Stoffwechselweg von 4-NQO resultiert in oxidativem Streß; die beteiligten Metabolite sind jedoch bisher kaum untersucht (Yano et al., 1995). Nunoshiba und Demple (1993) konnten jedoch zeigen, daß NQO ein sehr starker Induktor von oxidativem Stress ist.

Untersucht wurden in den *In vitro*-Prüfungen Konzentrationen von 0,00019 mg/L bis 1,91 mg/L, in den *In vivo*-Prüfungen von 0,0019 mg/L bis 0.0095 mg/L.

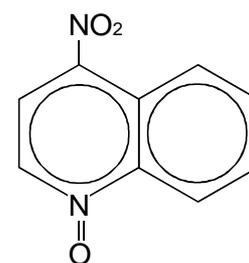


Abb. 7:  
4-Nitroquinolin-*N*-oxid

### 2.1.6 *N*-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidin

*N*-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidin (MNNG, Abb. 8) gehört in die Gruppe der Nitrosamide und ist ein direktes Cancerogen. Derartige Substanzen sind chemisch reaktiv (elektrophil) und interagieren spontan mit zellulären Makromolekülen wie DNA, RNA oder Proteinen (Marquardt, 1994). Bei oraler Gabe ist es eine Modellschubstanz zur experimentellen Induktion von Krebs im Gastrointestinaltrakt, speziell im Magen (Williams und Weisburger, 1986).

Alkylierende Substanzen wie MNNG reagieren mit zellulärer DNA unter Bildung von DNA-Addukten, ihre mutagene Wirkung

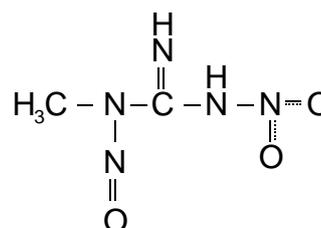


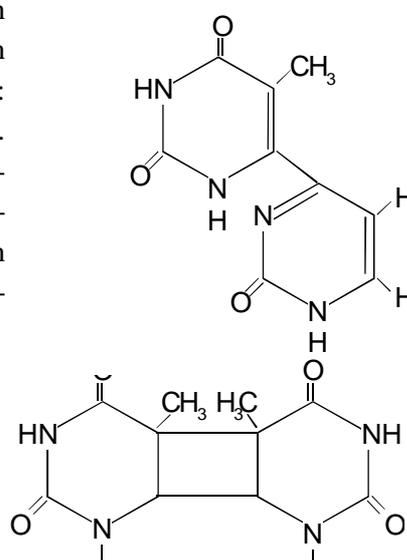
Abb. 8:  
*N*-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidin

entfalten sie hierbei überwiegend über die Bildung von O<sup>6</sup>-Methylguanin; dieses führt bei der DNA-Replikation zu ‚Missmatches‘ mit Thyminid, so daß es zu einer GC-AT Transition kommt (Bignami et al., 1987). Somit kommt es durch die Interaktion von MNNG mit der DNA nicht direkt zu Strangbruchereignissen. Die in der alkalischen Version des Comet Assays detektierbaren Strangbrüche resultieren hauptsächlich aus unvollständiger Basen- und zum Teil auch Nukleotid-Excisionsreparatur (Slamenova et al., 1997). Neben der Bildung von O<sup>6</sup>-Methylguanin kann MNNG sämtliche Sauerstoffatome, sowie die meisten Stickstoffatome der DNA methylieren. Methylierte Bereiche der DNA werden über das UVRabc Nukleotid-Excisionsreparatur-System nur sehr schwer erkannt und nur unvollständig repariert (Slamenova et al., 1997).

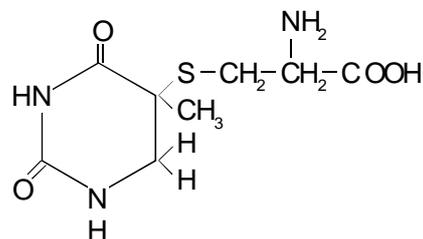
### 2.1.7 UV-Licht

Die Ultraviolettstrahlung (UV-Licht), im Spektrum zwischen sichtbarem Licht und den ionisierenden Röntgenstrahlen gelegen, wird in 3 Wellenlängenbereiche unterteilt: UV C: 200 – 280 nm, UV B: 280 – 320 nm, UV A: 320 – 400 nm. UV C wird von der Erdatmosphäre absorbiert und ist in manchen Entkeimungslampen im Einsatz. UV B ist auch Bestandteil von künstlichen Lichtquellen (Solarien) und hat den Hauptanteil an der biologischer Wirkung von UV Licht (Hagen, 1994). UV A ist weniger wirksam, trägt aber auf der Erde zu ca. 90 % der UV-Intensität bei.

Die DNA-schädigende Wirkung des UV-Lichts geht auf die Absorption des Lichts in den Nucleinsäuren zwischen 240 nm und 280 nm zurück. Hierbei entstehen die unterschiedlichsten Photoprodukte, zu nennen wären sowohl Basenvernetzungen wie das für die Induktion von Mutationen wichtige 6-4-Pyrimidin-Thymindimer (siehe Abb. 9) als auch DNA-Protein-Vernetzungen (siehe Abb. 10). Derartige Schäden können entweder über Excisionsreparatur oder aber über Photoreaktivierung repariert werden (Hagen, 1994). UV Strahlung wird aufgrund der bekannten Wirkmechanismen sowie der induzierten Reparaturformen in Mutations- und Genotoxizitätsuntersuchungen häufig eingesetzt. Hierbei wären so unterschiedliche Forschungsschwerpunkte wie die Aufklärung von Reparaturdefekten bei vererbaren Krankheiten (Alapetite et al., 1997; Alapetite et al., 1996; Green et al., 1992), die Validierung neuer Testverfahren in der Genotoxikologie (Bauer et al., 1998; Freeman et al., 1986; Gedik et al., 1992; Tornaletti und Pfeifer, 1996) sowie Untersuchungen in der Umwelttoxikologie zum Einfluß veränderter Umweltbedingungen auf verschiedene Organismen (Ankley, 1998; Applegate und Ley, 1988) zu nennen.



**Abb. 9:** UV-induzierte Photoprodukte: oben: *Thymin-Dimer*; unten: *Pyrimidin-Thymin-Addukt*. Aus Marquardt, 1995, verändert.

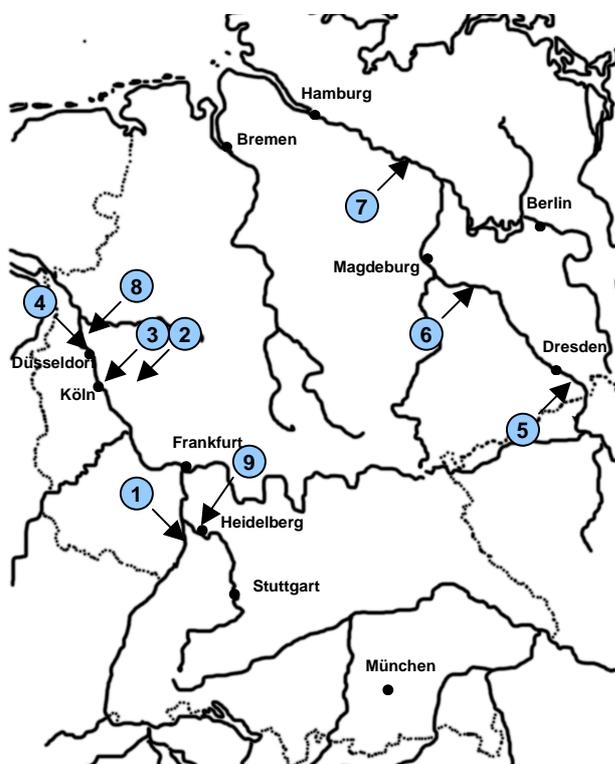


**Abb. 10:** UV-induzierte Photoprodukte, unten: *5-S-Cystein-6-Hydro-Thymin*, als Beispiel für eine DNA-Proteinvernetzung. Aus Marquardt, 1995, verändert.

## 2.2 Wasserproben

Zur Überprüfung des Comet Assays mit Fischen und Fischzellen auf seine Eignung als Routinetest im Rahmen der Gewässerüberwachung wurden Proben von stark anthropogen beeinflussten Oberflächengewässern auf ein ihr genotoxisches Potential untersucht. Im monatlichen Wechsel wurden von Februar 1997 bis Januar 1998 jeweils 4 Proben von der Rheinschiene (Wahnbach-Talsperre, Karlsruhe, Köln und Düsseldorf) sowie 3 Proben von der Elbe (Dessau/Mulde, Schmilka und Schnackenburg) mit dem Comet Assay getestet. Weiterhin wurden als Beispiel für stark kontaminierte Umweltproben im August und Oktober 1997 Wasserproben aus dem Sanierungsgebiet der Gaswerke Düsseldorf getestet, und ab Februar 1998 wurden weitere Probenahmen an der Wupper, der Elbe bei Schmilka sowie dem Neckar bei Heidelberg vorgenommen.

Die Wasserproben wurden am Probenahmetag in 2L Glasflaschen abgefüllt und den beteiligten Arbeitsgruppen in isolierten, mit Trockeneis gekühlten Containern innerhalb von 24 h zugestellt. Das Probenvolumen pro Standort belief sich für die Comet Assay-Untersuchungen am Zoologischen Institut auf 2 Liter. Bei Ankunft im Labor wurden folgende Parameter protokolliert: Eingang der Proben, Probentemperatur, Lufttemperatur, Trockeneismenge. Im Anschluß wurden die Wasserproben portioniert. Hierfür wurde die Wasserprobe aufgeschüttelt und in 25 mL- (*In vitro*-Ansatz) bzw. 250 mL-Portionen (*In vivo*-Ansatz) aufgeteilt. Der erste *In vitro*-Testansatz wurde am gleichen Tag durchgeführt, die Proben für Testwiederholungen in der gleichen Woche wurden bei 4° C gelagert. Rückstellproben sowie die Proben für eventuelle *In vivo*-Prüfungen, die erst nach entsprechender *In vitro*-Indikation durchgeführt wurden, wurden bei -20°C gelagert. Ebenso wurde mit den im Oktober und Dezember 1998 sowie April 1999 untersuchten Wasserproben vom Neckar verfahren.



### Probenahmestellen:

- |  |                 |
|--|-----------------|
| ① Karlsruhe                              |                 |
| ② Trinkwasserreservoir Wahnbachtalsperre |                 |
| ③ Köln                                   |                 |
| ④ Düsseldorf                             | ⑦ Schnackenburg |
| ⑤ Schmilka                               | ⑧ Wupper        |
| ⑥ Dessau/Mulde                           | ⑨ Neckar        |

### Termine:

- |                                       |                          |
|---------------------------------------|--------------------------|
| 05.02.97 Elbe                         | 07.01.98 Rhein           |
| 03.03.97 Rhein                        | <b>Zusatz:</b>           |
| 02.04.97 Elbe                         | 17.02, 24.03.98 Wupper   |
| 12.05.97 Rhein                        | 29.04, 13.05.98 Schmilka |
| 25.06.97 Elbe                         | 23.10, 14. 12.98 Neckar  |
| 21.07.97 Rhein                        | 16.4.99 Neckar           |
| 20.08.97 Elbe (+ Sonderprobe Gaswerk) |                          |
| 29.09.97 Rhein                        |                          |
| 15.10.97 Elbe (+ Sonderprobe Gaswerk) |                          |
| 12.11.97 Rhein                        |                          |
| 10.12.97 Elbe                         |                          |

**Abb. 11:** Probenahmestandorte für die untersuchten Wasserproben von Rhein, Elbe, Wupper und Neckar im Rahmen des BMBF-Projekts ‚Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächenwasser‘.

## 2.2.1 Untersuchungsgewässer

### 2.2.1.1 Rhein

Der Rhein ist mit einer Länge von 1320 km und einem Einzugsgebiet von 185000 km<sup>2</sup> einer der Hauptströme Europas von großer volkswirtschaftlicher und ökologischer Bedeutung und unterliegt zahlreichen konkurrierenden Nutzungen. Zum einen stellt der Rhein ein wichtiges Reservoir zur Gewinnung von Trinkwasser für etwa 20 Millionen Menschen dar, ist Lebensraum zahlreicher tierischer und pflanzlicher Organismen und speist Natur- und Freizeitgebiete. Zum anderen ist der Rhein eine der am stärksten befahrenen Wasserstraßen und dient als Vorfluter für kommunale und industrielle Abwässer. Besondere Gefährdungspotentiale entstehen durch Stoßbelastungen als Folge von Störfällen z.B. in Betrieben der chemischen Großindustrie und durch Schiffsunfälle. Der Fluß ist von Rotterdam bis Basel schiffbar und eine der wichtigsten internationalen Schifffahrtsstraßen der Erde.

An der Rheinschiene liegen sechs kommunale und industrielle Ballungsräume mit Basel/Mülhausen/Freiburg (Chemische Industrie, Nahrungsmittelindustrie, Textil- und Metallindustrie), Straßburg (Zellstoff-, Nahrungsmittel-, Textil- und Metallindustrie), Rhein-Neckar (Karlsruhe, Heidelberg, Mannheim, Ludwigshafen mit herausragender chemischer Industrie), Rhein-Main (Chemische Industrie, Gummiindustrie, Elektro- und Metallindustrie, Dienstleistungszentren), Rheinschiene Köln – Ruhrgebiet (Petrochemie, Raffinerien, Metall- und Fahrzeugfabriken, Dienstleistungs- und Handelszentren Köln, Düsseldorf, Duisburg) sowie Rotterdam-Europoort (Werften, Raffinerien, Chemiewerke, Metall- und Fahrzeugbetriebe, europäisches Dienstleistungszentrum) (IKSR, 1999). Bereits vor fünfzig Jahren klagten die Niederländer darüber, daß insbesondere der Phenol- und Salzgehalt im Rhein die Wasserversorgung weiter Gebiete erschwert. Deswegen haben die Niederlande bereits frühzeitig die Anrainerstaaten an einen Tisch gerufen, um die Gewässerschutzprobleme am Rhein gemeinsam zu behandeln und nach Lösungen zu suchen. Am 11. Juli 1950 wurde in Basel die „Internationale Kommission zum Schutze des Rheins gegen Verunreinigung“ (IKSR) gegründet. Die „Rheinminister“ haben auf ihrer 9. Konferenz 1988 in Bonn beschlossen, daß die kommunalen Kläranlagen bis zum Jahr 2000 die Abwässer effektiver reinigen müssen. Die IKSR hat 1992 die Anforderungen weiter verschärft. Erste Erfolge zeichnen sich bereits ab. Verglichen mit 1985 entließen die Kläranlagen der Kommunen 1992 nur noch halb so viel Phosphor und deutlich weniger Stickstoff in das Flußsystem des Rheins. Das für 1995 anvisierte Ziel (50 Prozent Reduktion) ist also für Phosphor bereits drei Jahre früher erreicht worden (IKSR 1999).

Aufgrund seiner Bedeutung und Belastungsgeschichte wurden zahlreiche Studien zur Ökologie und zur Belastung verschiedener Organismen durchgeführt (Alink et al., 1980; Den Besten, 1995; Friedrich, 1990; Hendriks et al., 1998; Jatzek, 1990; Poels et al., 1980; Van Den Brink et al., 1990; Van Urk und De Vaate, 1990); besonders der Chemieunfall in Basel vom 1.11.1986 mit den folgenden, deutlich sichtbaren Folgen für den Fischbestand stimulierte zahlreiche Untersuchungen (Arnold und Braunbeck, 1994; Braunbeck et al., 1990; Burkhardt-Holm et al., 1990; Müller und Meng, 1990; Spazier et al., 1992).

Neben den 3 Probestandorten Karlsruhe, Köln und Düsseldorf wurde noch die Wahnbachtalsperre, ein Trinkwasserreservoir im Bergischen Land zwischen Neunkirchen-Seelscheid und Siegburg, beprobt.

### 2.2.1.2 Elbe

Das Einzugsgebiet der Elbe, die im Riesengebirge auf 1390 m über NN entspringt und nach 1143 km in die Deutsche Bucht entwässert, umfaßt 148500 km<sup>2</sup>. Die deutsche Elbe mit 728 km Länge wird

nach hydrologischen und morphologischen Gesichtspunkten in die Ober-, die Mittel- und die Tideelbe unterteilt (Schöll et al., 1995).

Die Elbe wurde im Rahmen des Projekts als Untersuchungsgewässer ausgewählt, da auf die am Strom etablierten Gewässerüberwachungsstationen Schmilka, Dessau und Schnackenburg der ARGE Elbe als Probenahmestellen mit ausreichender Infrastruktur zurückgegriffen werden konnte. Weiterhin galt die Elbe noch bis weit in die 80iger Jahre als einer der am stärksten verschmutzten Flüsse Deutschlands (Peters et al., 1987). Durch den wirtschaftlichen Niedergang Osteuropas und Maßnahmen zum Gewässerschutz in den Neuen Bundesländern hat sich die Wasserqualität verbessert, trotzdem ist der Fluß weiterhin als stark belastet anzusehen (Schöll et al., 1995). Die hohe Belastung der Elbe mit chlororganischen Verbindungen aus der Gruppe der Haloether, die als Nebenprodukte bei der industriellen Herstellung von Glycerin- und Epoxidharz-Vorprodukten entstehen, und von einem tschechischen Industriekombinat in die Elbe entsorgt werden, sorgte im vergangenen Jahr für Presseschlagzeilen [Weser-Kurier, Nr. 34, 09. 02. 99, S. 1; Hamburger Morgenpost, 02.11.99, S. 1].

### 2.2.1.3 Neckar

Der Neckar wurde als Untersuchungsgewässer ausgewählt, weil es zu diesem Fluß und seiner durch vielfältige Belastungen geprägten Geschichte gute Referenzdaten zur Wasserqualität gibt, auch die Kontamination der Sedimente durch verschiedenste Schadstoffe gut untersucht ist (Braunbeck et al., 1995; Förstner and Müller, 1974, Müller, 1986; Müller, 1991; Müller, 1992; Müller et al., 1993) und Untersuchungen zu den Auswirkungen auf einige dort lebende Tiergruppen vorliegen (Falter und Schöler, 1994; Geier, 1994; Haiber und Schöler, 1994; Schnurstein, 1996).

Der Neckar entspringt im Schwenninger Moor (706 m ü NN) in den Ausläufern des Schwarzwaldes, nicht weit von der Donauquellregion entfernt. Mit einer Länge von 370 km und einem Einzugsgebiet von 14.000 km<sup>2</sup> ist er Baden-Württembergs größter Fluß und fließt im Raum Stuttgart-Heilbronn durch das industrielle Zentrum des Bundeslandes. Dieses hat u.a. zur Folge, daß dem Neckar große Mengen an Abwässern kommunaler und industrieller Kläranlagen zugeführt werden. Trotz des für einen Fluß dieser Größenordnung recht großen Einzugsgebietes herrscht im Abflußregime ein gravierender Wassermangel, der vor allem mit den recht geringen Niederschlagsmengen im Regenschatten des Schwarzwaldes zusammenhängt (MÜLLER et al. 1993). Die langfristige mittlere Wasserführung des Neckars liegt bei 155 m<sup>3</sup>/sec., bei ungünstigen Verhältnissen kann dieser Wert jedoch auf 30 m<sup>3</sup>/sec. absinken (Malle, 1991).

Um den Fluß trotz dieser stark schwankenden Wasserführung als Großschiffahrtsstrasse nutzen zu können, wurde er auf einer Länge von 200 km zwischen Plochingen und Mannheim mit insgesamt 27 Schleusen reguliert (MÜLLER et al. 1993). Dadurch wird die Fließgeschwindigkeit des Neckars in diesem Abschnitt drastisch herabgesetzt, sie liegt im Unterlauf je nach Wasserstand oft erheblich unter 1 m/sec. Besonders bei Niedrigwasser kann der Wasseraustausch zwischen den einzelnen Staubecken sehr gering werden und es entsteht eine Kette von Stillgewässern (Alf, 1991).

Eine weitere Folge der geringeren Fließgeschwindigkeit ist die erhöhte Sedimentation von Schwebstoffen im Bereich der Staustufen. Schwermetalle und organische Schadstoffe (PCB, PAK u.a.) besitzen zum Teil eine sehr große Sorptionsfähigkeit, so daß sich ein großer Anteil dieser in den Fluß verbrachten Schadstoffe an Schwebstoffpartikel anlagert, mit diesen weitertransportiert wird und dann im Bereich von Hafenanlagen und Flußstauhaltungen sedimentiert. Hier kann es dann zu einer Akkumulation von Schadstoffen über längere Zeiträume kommen (Westrich, 1991). Untersuchungen der Sedimente einer Flachwasserzone am Neckar bei Eberbach und der Staustufe bei Laufen hinsichtlich

ihrer Wirkung auf Zellkulturen aus Fischen zeigten eine erhöhte toxische Wirkung der organischen Phase der Sedimente (Braunbeck et al., 1995).

Nachdem durch verstärkte kommunale Anstrengungen zur Aufbereitung der Abwässer in den siebziger Jahren die Primärbelastung durch abbaubare organische Substanzen deutlich zurückgegangen war, hat am Neckar die Sekundärbelastung, d.h. der gewässerinterne Aufbau pflanzlichen organischen Materials, erheblich zugenommen. Gefördert durch geringe Fließgeschwindigkeit und hohe Wassertemperatur kommt es zu einer raschen Eutrophierung des Gewässers und zu Massenentwicklung von Phytoplankton (Pinter, 1991).

Zur hohen Wassertemperatur tragen neben den baulichen Maßnahmen zur Schiffbarmachung auch die Kraftwerke am Neckar mit ihrem hohem Bedarf an Kühlwasser bei; die Erwärmung, als Differenz der Jahresmittelwerte, beträgt 3,8°C auf der kanalisierten Strecke mit zunehmender Tendenz (MALLE 1991). Der Sauerstoffgehalt des Neckarwassers ist zwar durch die Verbesserung der Abwassersituation deutlich gestiegen, aber im kanalisierten Flußabschnitt kann es besonders bei Niedrigwasser durch hohe Temperaturen, geringe Fließgeschwindigkeit und verstärkte Sekundärbelastung zu kritischer Sauerstoffzehrung kommen (MALLE 1991).

Auch die Anzahl der nachgewiesenen Tiergruppen über den Zeitraum der letzten 15 Jahre spiegelt die verbesserte ökologische Situation des Flusses wider. Seit 1981 liegt nahezu eine Verdreifachung der nachgewiesenen Makroinvertebratentaxa vor (ALF 1991). Hierbei muß allerdings daraufhingewiesen werden, daß ein Ersatz der nach wie vor häufigen Ubiquisten durch spezialisierte und ökologisch anspruchsvolle Arten bisher nicht stattgefunden hat (Marten, 1992). Auch die Fischfauna hat von diesem positiven Trend profitiert, im Neckar finden sich heute 35 Fischarten, wobei das Vorkommen von 5 Arten vollständig auf Besatzmaßnahmen zurückgeht (Ulrich, 1991).

## 2.3 Testsysteme

### 2.3.1 RTG-2 Zellen

Diese fibroblastenähnlichen Zellen wurden ursprünglich aus der Gonade der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) gewonnen (Wolf und Quimby, 1962). RTG-2-Zellen sind kommerziell von der American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, Maryland, USA) sowie von der Firma ICN / Flow in Meckenheim zu beziehen.

Die Kulturbedingungen für die Fibrocyten orientieren sich an den Vorschriften, wie sie im DIN-Vorschlag für den Cytotoxizitätstest mit RTG-2-Zellen formuliert sind: Die Zellen werden in Minimal Essential Medium (MEM), Eagle-Modifikation, mit 20 mM HEPES und Earle's Salzen, 2 mM L-Glutamin, supplementiert mit 350 mg/L Natriumhydrogencarbonat, 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 10 mL/L Penicillin/Streptomycin-Lösung in 80 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Nunclon™, Nunc, Mainz) bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C ohne spezielle Begasung gehalten. Nach einer Inkubationsdauer von etwa 4 Tagen sind die Zellen zu einem geschlossenen Monolayer ausgewachsen und können für Gentoxizitätsuntersuchungen verwendet werden.

Das alte Medium wird dazu zunächst aus den Flaschen abdekantiert, und die Zellen werden mit 15 mL PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Fa. Sigma, Deisenhofen) gespült. Nach Abdekantieren dieser Lösung werden 2 mL 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA-Lösung zu den Zellen pipettiert. Nach etwa 2-3 min lösen sich die festhaftenden Zellen vom Untergrund; die vereinzelt Zellen werden in 10 mL Medium aufgenommen - dabei wird das Trypsin durch die Protease-Inhibitoren des FKS sofort gehemmt - durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette resuspendiert und im Anschluß zu gleichen

Teilen auf 5 Petrischälchen ( $\varnothing$  3.5 cm, Nunc) aufgeteilt, in denen die Schadstoffexposition der Zellen stattfindet.

### 2.3.2 Der Zebraärbling (*Danio rerio*)

Als Modellfisch für die *In vivo*- und *In vitro*-Untersuchungen wird der Zebraärbling (*Danio rerio*, Abb. 12) eingesetzt, der neben der Regenbogenforelle zu den am besten untersuchten Fischarten gehört (Collodi, 1992). Der Zebraärbling kann problemlos im Labor gezüchtet werden, so daß jederzeit genügend genetisch verwandte Tiere zur Verfügung gestellt werden können (ein Laichansatz liefert bis zu 300 Eier und reicht selbst für zahlreiche größere Versuchsserien aus). Aus diesen Gründen wurde er auch häufig in Cancergenese-Studien mit Fischen eingesetzt (Streisinger, 1984). Die Größe adulter Zebraärblinge reicht eben für einen vollständigen Comet-Assay mit Leber- und Kiemenzellen aus. Für die *In vivo*-Prüfungen



**Abb. 12:** Zebraärblinge (*Danio rerio*); die zwei unteren Tiere sind Männchen; leicht von diesen zu unterscheiden anhand der Körperform und Färbung das geschlechtsreife Weibchen oben rechts.

mit dem Comet Assay sind pro Test ca. 750 mL Testgut notwendig. Somit sind 2 L einer Wasserprobe für die Durchführung von 2 Tests ohne Verdünnung ausreichend. Die Abwassermenge aus der Monosubstanzprüfung verhält sich entsprechend. Pro Konzentration werden drei Zebraärblinge (1 Weibchen, 2 Männchen) eingesetzt. Für die *In vitro*-Prüfungen werden pro Versuchsansatz mit 5 Konzentrationen 5 Tiere (3 Weibchen, 2 Männchen) zur Herstellung von Primärzellkulturen aus Leber- und Kiemenzellen benötigt.

#### 2.3.2.1 Hälterung der Zebraärblinge

Die Zebraärblinge werden in 150 L-Aquarien gehalten, die mit maximal 100 Tieren besetzt sind. Der Raum ist gegen den jahreszeitlichen Tageslichtrhythmus abgedunkelt, eine Zeitschaltuhr regelt den künstlichen Lichtzyklus auf 12 Stunden Tag / 12 Stunden Nacht. Handelsübliche Regelheizstäbe und Innenfilter mit Belüftungseinrichtung sorgen für gleichbleibende Bedingungen. Im Rhythmus von zwei Wochen werden die Aquarien gründlich gereinigt, wobei 30 % des Wassers ausgetauscht werden. Das zugegebene Wasser stammt aus einer Mischeinrichtung, die nach Messung der Leitfähigkeit das Verhältnis von Leitungswasser und vollentsalztem Wasser in einem Vorratstank über Zulaufventile regelt (Tab. 3). Zusätzlich wird das Wasser im Vorratsbehälter geheizt ( $25 \pm 1$  °C) und belüftet. Aus diesem Vorrat stammt auch das Wasser für die *In vivo*-Exposition.

#### 2.3.2.2 Fütterung der Zebraärblinge

Jungfische und Adulte werden zweimal täglich mit Zierfischfutter der Fa. Tetra (Melle) gefüttert (Staubfutter AZ-100 für Jungfische, Tetramin™ Flockenfutter für Zierfische). Zusätzlich erhalten

Laichgruppen und Jungfische täglich frisch geschlüpfte Artemien (*Artemia spec.*). Die Artemieneier werden in verdünnter Meersalzlösung angesetzt und so stark belüftet, daß sie herumgewirbelt werden. Nach 2-3 Tagen werden die geschlüpfte Artemien in einem Scheidetrichter von den Eiern getrennt und nach Abfiltrieren aus der Meersalzlösung in Leitungswasser aufgenommen.

**Tabelle 3:** Wasserwerte der Aquarienanlage

Wasserparameter	Aquarien	Vorratsbehälter
Temperatur	25 °C ± 0,5 °C	25 °C ± 0,5 °C
Sauerstoffgehalt	7,5 mg/L ± 0,5 mg/L	8,0 mg/L ± 0,5 mg/L
Gesamthärte	20 °dH	20 °dH
Carbonathärte	12 °dH	12 °dH
Ammonium	nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar
Nitrit	≤ 0,01 mg/L	Nicht nachweisbar
Nitrat	≤ 48 mg/L	≤ 20 mg/L

Die Wasserwerte wurden mit Schnelltestsets der Firma Merck (Darmstadt) bestimmt.

### 2.3.2.3 Zucht der Zebrabärblinge

Die Zucht der Versuchstiere erfolgt aus Wildfang-Nachzuchten von *Danio rerio*. Dazu wird eine Laichgruppe (2 weibliche und 4 männliche Tiere) in ein separates Becken gesetzt und drei Tage lang zusätzlich mit Artemien gefüttert (vgl. 2.3.2.2), um die Eibildung und -reifung zu stimulieren. Am Abend des dritten Tages wird eine Glasschale, die mit einem Kunststoffgitter (Gitterabstand 2 mm) abgedeckt ist, auf den Boden des Aquariums gestellt. Die Tiere laichen sofort bei Beginn der nächsten Lichtphase ab, und die Eier sinken durch das Gitter in die Glasschale, so daß sie nicht gefressen werden können. Nach spätestens vier Stunden der Lichtphase wird die Schale entnommen, die Eier werden in Petrischalen überführt und bei 25 °C bis zum Schlupf inkubiert. Auf diese Weise können pro Laichgruppe 200-400 Eier gewonnen werden, die bei einer durchschnittlichen Befruchtungsrate von 75 % zu bis zu 300 Jungfischen führen.

Die Jungfische werden in 2 L-Aquarien überführt und darin bis zu einer Körperlänge von ca. 0,5 cm gehalten. In belüfteten 30 L-Aquarien ohne Strömungspumpe wachsen sie zu einer Körpergröße von ca 1,5 cm heran. In den beschriebenen 150 L-Aquarien wachsen sie zu Adulten heran und werden aus diesen für die *In vitro*- und *In vivo*-Untersuchungen mit dem Comet Assay entnommen.

### 2.3.3 Freilandtiere

#### 2.3.3.1 Fangmethode

Zum Fangen der Fische für die Genotoxizitätsuntersuchungen mit dem Comet Assay und dem Mikronukleus Test wird ein handelsübliches Senknetz, welches über ein Metallgestänge mit einer 2,5 m langen Schnur an einer 3 m langen Teleskopstange befestigt ist, eingesetzt. Das Senknetz ist quadratisch mit einer Kantenlänge von 1 Meter und einer Maschenweite von 0,7 cm. Die Ecken des Quadrats sind mit biegsamen, 1 Meter langen Metallstäben verbunden, die alle in eine kreuzförmige Aufnahme

gesteckt werden und so das Netz spannen. Die Aufnahme ist über die Schnur mit der Teleskopstange verbunden. Das Senknetz wird nun ausgeworfen, sinkt auf den Grund und wird dort eine Zeitlang belassen. Die sich beim Hochziehen über dem Netz befindenden Fische flüchten nach unten und damit auf das Netz, das bedingt durch die biegsamen Metallstäbe und den Wasserwiderstand einen Fangkorb bildet. Diese Fangmethode ist auf strömungsarme Uferbereiche mit ebenem Untergrund und einer Wassertiefe bis maximal 2 m beschränkt. Somit lassen sich neben Kleinfischarten des Uferbereichs hauptsächlich Jungfische fangen.

### 2.3.3.2 *Rutilus rutilus* L.: Rotauge oder Plötze, Familie Cyprinidae

*Rutilus rutilus* zeigt je nach Habitat einen mehr oder weniger hochrückigen, seitlich abgeflachten Körper. Die Augen sind rötlich gefärbt, die Bauchkante zwischen Bauchflossen und Afterflosse ist gerundet, der Ansatz des Vorderendes der Rückenflosse liegt über (oder nur wenig hinter) dem Ansatz der Bauchflossen. Anhand dieser Merkmale lassen sich Rotaugen sehr leicht von *Scardinius erythrophthalmus* L., der Rotfeder unterscheiden, deren Rückenflosse deutlich hinter den Bauchflossen liegt; weiterhin hat letztere, angepasst an die mehr oberflächenorientierte Lebensweise, ein oberständiges Maul, während das Rotauge eine schmale, endständige Mundspalte besitzt. *Rutilus rutilus* ist ferner durch große Cycloidschuppen gekennzeichnet, 39-48 (meist 42-45) entlang der Seitenlinie. Die Brustflossen haben 16, Rücken- und Afterflosse 12-14 Weichstrahlen. Die Schlundzähne sind einreihig, die Zahnformel lautet: 5 (6) - 5 ((Terofal, 1984).

Der Rücken ist dunkelgrün bis blaugrün, die Flanken sind silberfarbig mit gelblichem Schimmer, der Bauch kann zur Laichzeit rötlich glänzen. Die Brust- und Bauchflossen, sowie die Afterflosse sind rötlich (nicht zu verwechseln mit dem dunklen Rot der Flossen der Rotfeder).

Das Rotauge ist ein Schwarmfisch der pflanzenreichen Uferregion und verbringt den Winter an besonders geschützten, tieferen Stellen; mit einer Vorzugstemperatur von 8 - 25°C (Reichenbach-Klinke, 1976) gehört es zu den eurythermen Fischen. Die Laichzeit ist auf April und Mai beschränkt. Im Nekar konnten in den letzten Jahren auch schon Anfang März männliche Rotaugen mit Laichausschlag beobachtet werden, was sich eventuell auf die sehr milden Winter und das recht warme Flußwasser zurückführen läßt (eigene Beobachtungen); (Goldspink, 1979) berichtet von einer Wassertemperatur von 14°C, deren Erreichen im Frühjahr bei Rotaugen die Laichbereitschaft induziert. Die klebrigen, etwa 1 mm großen Eier ( 50.000-100.000, bei Wanderformen bis 200.000) haften ebenso wie die frisch geschlüpften Larven an Wasserpflanzen, Wurzelwerk und Steinen. Die Brutdauer beträgt 4-10 Tage. Nachdem der Dottervorrat aufgebraucht ist, ernähren sich die Fischlarven zuerst hauptsächlich von Phytoplankton. Ist die morphologische Entwicklung abgeschlossen und die Flossen vollständig ausgebildet, so entwickeln sich die Jungfische zu omnivoren Opportunisten (Reyes-Marchant et al., 1992). Dabei hat sich das Rotauge, wie auch andere omnivore Cypriniden, auf die eingewanderte Dreikantmuschel (*Dreissena polymorpha*) spezialisiert, die einen nicht unerheblichen Teil der aufgenommenen Nahrung ausmachen kann (Martyniak et al., 1991). Da Muscheln über ihre filtrierende Lebensweise häufig hohe Schadstoffkonzentrationen aufweisen, ist diese Nahrungsquelle ein wichtiges Vehikel zur Weiterleitung und Aufkonzentrierung von Schadstofffrachten im Nahrungsnetz des aquatischen Ökosystems. (Abbildung siehe Bildtafel 3, 3.7)

### 2.3.3.3 *Gobio gobio*, L.: Gründling, Familie Cyprinidae

Der Gründling gehört ebenso wie der Zebrabärbling zur Familie der Cyprinidae und hier zur Unterfamilie der Gobioninae. Der Körper des 8 - 20 cm großen Tieres ist langgestreckt und fast drehrund. Der

Rücken ist braun, mit grünlichem oder bläulichem Glanz, die Flanken sind aufgehellt. Dunkle Punkte auf dem Rücken und der Schwanzflosse sowie bläulich schimmernde dunklere Flecken an den Seiten sind weitere Erkennungsmerkmale dieses bodenbewohnenden Fisches. Der Gründling ist an den Uferregionen von Seen, in Flüssen mit sandig-kiesigem Untergrund und auch im Brackwasser als schwarmbildender Grundfisch anzutreffen. Er bevorzugt mittelhartes bis hartes bzw. neutral bis schwach alkalisches Wasser. Die Laichzeit dauert von Mai bis Juni, wobei die männlichen Tiere einen Laichauschlag ausbilden. Die Laichabgabe erfolgt ins Flachwasser an Steine und Pflanzen. Das Verbreitungsgebiet des Gründlings erstreckt sich über ganz Europa bis zum Ural, ausgenommen sind Nord-Skandinavien, Schottland, Südspanien und Süditalien. Seine Nahrung besteht aus wirbellosen Bodentieren, zuweilen auch aus Fischlaich. (Abbildung siehe Bildtafel 3, 3.8)

### 2.3.3.4 *Salmo trutta f. fario*, L.: Bachforelle, Familie Salmonidae

Die Bachforelle gehört zur Familie der Salmonidae und erreicht eine Größe von bis zu 50 cm, häufig sind jedoch Größenordnungen von 20-25 cm realistisch. Ihre Kennzeichen sind ein olivfarbener bis bräunlicher Rücken, eine rot gerandete oder rot gepunktete Fettflosse, silbrige bis messingfarbene Flanken sowie ein weiß bis gelblich erscheinender Bauch. Rücken, Kopf und Flanken sind außerdem mit schwarzen und hell gesäumten roten Punkten bedeckt. Ihr Lebensraum im Tiefland und Gebirge (bis 2500 m) beinhaltet reich strukturierte Fließgewässer und Seen mit kühlem, klarem und sauerstoffreichem Wasser. Die räuberisch lebende Bachforelle zeigt ein stationär ausgeprägtes Revierverhalten. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich über Europa und Kleinasien. Eingebürgert wurde sie in Nordamerika, Afrika, Indien, Australien und Neuseeland. Zu ihrer Nahrung gehören neben Kleinfischen auch Insektenlarven und andere Bodentiere. Die Fortpflanzungszeit des Winterlaichers beginnt im Oktober und dauert bis in den Januar hinein. (Abbildung, siehe Bildtafel 3, 3.9)

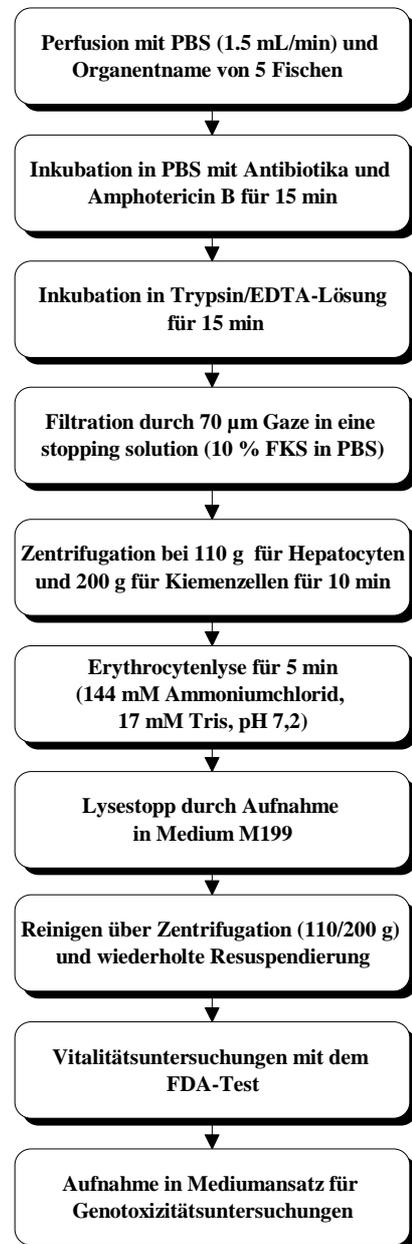
### 2.3.3.5 *Gasterosteus aculeatus*, L.: Dreistachliger Stichling, Familie Gasterosteidae

Die Stichlinge sind in Europa mit 2 Arten, *Gasterosteus aculeatus* und dem Zwergstichling, *Pungitius pungitius*, vertreten. Entsprechend seinem Namen trägt *G. aculeatus* zwischen 2 – 5, jedoch meist 3 bewegliche Stacheln vor der Rückenflosse. Der Körper ist gestreckt, seitlich abgeflacht mit spitzer Schnauze und endständiger Mundspalte (Terofal, 1984). Kopf und Körper sind schuppenlos, nur entlang der Seitenlinie findet sich eine Reihe von Knochenplatten, deren Form und Ausprägung Unterscheidungsmerkmal der 2 Unterarten f. *trachurus* und f. *leiurus* ist (Terofal, 1984). Die Bauchseite zwischen Kehle und Bauchflossen ist stark verköchert und kann somit als Widerlager zu den beweglichen Rückenstacheln dienen (Festsetzen in Unterständen). Die Männchen zeigen zur Laichzeit zwischen März und Juli eine rote Kehle und Brust und bauen ein Nest aus Pflanzenteilen, welche mit einem klebrigen Nierensekret zusammengefügt werden. Nach der Eiablage erfolgt die Brutpflege durch das Männchen. Der dreistachlige Stichling erreicht eine Körperlänge von 5 - 8 cm, maximal werden 11 cm erreicht. Er ist in Küsten- und Binnengewässern weit verbreitet und stellt bezüglich Wasserqualität keine hohen Ansprüche. Neben stationären Binnenformen, die auch in sehr kleinen Gewässern vorkommen können, gibt es auch marine Wanderformen, die im Küstenbereich leben und zum Laichen ins Süßwasser wandern.

## 2.4 Zellisolation

### 2.4.1 *In vitro*-Experimente mit *Danio rerio*

Die Isolation der Leber- und Kiemenzellen aus dem Zebrafisch erfolgt nach der für den Zebrafisch optimierten Modifikation der Immersionsmethode von Pärt (1993), Deventer (1996) und Rahmann (1996) und ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Isolationschritte erfolgen bei Raumtemperatur, direktes Sonnenlicht und Neonlicht (Raumbeleuchtung) auf den Arbeitsplatz sind zu vermeiden. Ein Zebrafisch wird in gesättigter Benzocainlösung betäubt, kurz mit Wasser abgespült und mit der Ventralseite nach oben auf einem Schaumstoffblock fixiert. Das Tier wird ventral mit einer feinen Schere eröffnet und das Herz durch einen bis zwischen die Brustflossen laufenden Schnitt freipräpariert. Die Brustflossen und seitliche Gewebeteile werden entfernt, so daß das Herz frei zugänglich ist und das Blut während der folgenden Perfusion schnell ablaufen kann. Nun wird das Herz mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig fixiert, der Sinus venosus durchtrennt und eine Glasmikroinjektionsnadel (Spitzenöffnung ca. 200 µm) in den Ventrikel gestochen. Durch einen Fußschalter wird eine Schlauchpumpe (Ismatec MS-4-Reglo-Schlauchpumpe) in Gang gesetzt (Flußrate ca. 1,5 mL/min) und der Fisch mit PBS-Lösung perfundiert, bis kein Blut mehr aus dem Blutgefäßsystem austritt. Nach der Perfusion werden die Leberlappen und die Kiemenbögen herauspräpariert und in 1 mL PBS mit Antibiotika (20 µL Amphotericinlösung [12,5mg/mL, Sigma, Deisenhofen], 5 mg/L Gentamycinsulfat [Sigma], 2 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung [Penicillin-Streptomycin-Solution stabilized, Penicillin: 5000 units, Streptomycin: 5 mg/L, Sigma] in 100 mL PBS) in Zellkulturschalen von 3,5 cm Durchmesser (Fa. Greiner) gesammelt. Nun werden die Organstücke für 15 min in PBS mit Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma Trypsin-EDTA-Solution: 0,5 g/L porcine trypsin, 0,2 g/L EDTA x 4 Na; 1 : 200 in PBS) inkubiert. Die Lösung wird dann durch eine 70 µm Gaze filtriert, und verbleibende Organstücke werden mechanisch vereinzelt. Dann wird die Trypsinwirkung durch die Zugabe von 1 mL PBS-FKS-Lösung (10 % FKS in PBS) gestoppt und die Suspension durch eine Gaze (Maschenweite 70 µm, Verseedac) filtriert. Zur mechanischen Vereinzelnung noch verbliebener Gewebstücke werden diese mit einem rundgeschmolzenen Glasstab durch die Gaze gedrückt. In zwei 1,5 mL Reaktionsgefäßen (Safe Lock™, Fa. Eppendorf, Hamburg) pro Konzentration erfolgt die Zentrifugation (Biofuge 17 RS, Fa. Heraeus, Hanau) bei 20 °C und 200 g für 10 min. Anschließend wird der Überstand abgezogen und das Pellet in 150 µL Erythrocyten-Lyse-Puffer (144 mM NH<sub>3</sub>Cl + 17 mM Tris in Aqua demin.) resuspendiert. Nach Eliminierung noch verbliebener Erythrocyten im Erythrocytenlysepuffer und Überführung der Zellen in Medium M199 (Hank's Modifikation: 20 mM Hepes, supplementiert mit 350 mg/L NaHCO<sub>3</sub>, 10 % FKS, 10 mL/L Penicil-

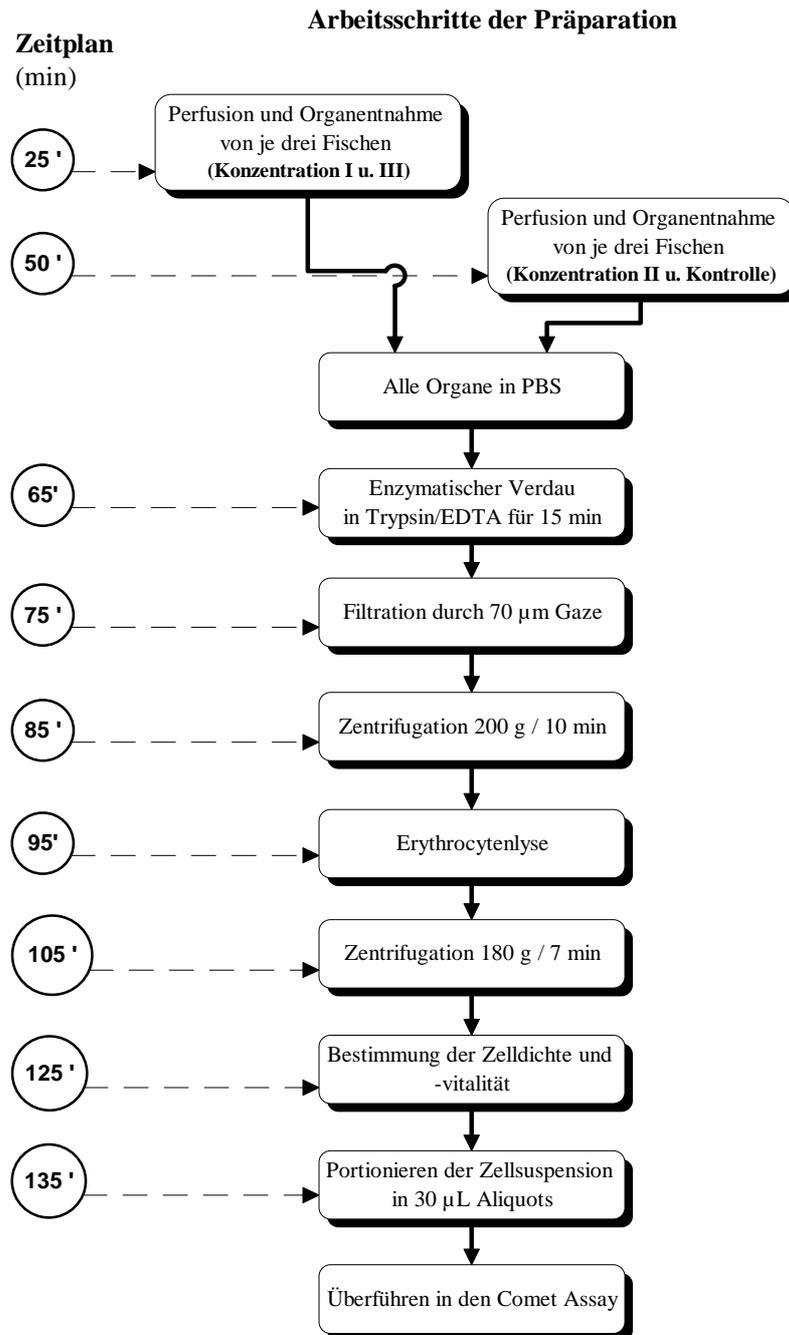


**Abb. 13:** Isolation von Primärzellen aus dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

lin/Streptomycin-Lösung) wird, nach 2 Waschschrinen, die Vitalität der Zellen mit dem Fluoresceindiacetat- (FDA-) Assay (vgl. 2.7.1) bestimmt. Anschließend werden die Zellen in mit dem zu testenden Schadstoff versetzten Medium aufgenommen und in den Wells einer sterilen 24 Well-Platte ausgesät. Nach Beendigung der Exposition werden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette resuspendiert, zentrifugiert und in den Comet-Assay überführt. Diese Methode der Isolation von Primärzellen wurde auch bei der Gewinnung von Primärzellkulturen aus den Freilandfischen angewendet.

### **2.4.2 *In vivo-Experimente mit Danio rerio***

Die Isolation der Leber- und Kiemenzellen wird wie bei den *In vitro*-Tests durchgeführt. Allerdings werden die Organstücke in PBS (ohne Antibiotika) aufgenommen, da die Zellen nach der Isolation sofort in den Comet-Assay überführt werden und ein signifikantes Bakterienwachstum innerhalb von 30 min nicht zu erwarten ist. Die Methode erlaubt als Standardversuch die parallele Testung dreier Konzentrationen plus Kontrolle, ist aber durch ihren modulartigen Aufbau erweiterbar. Die Schritte bis zur Organentnahme und Überführung in PBS (siehe oben, Abschnitt 2.4.1) werden nacheinander mit den Fischen von zwei Konzentrationen durchgeführt, wobei die Organe der drei Fische einer Konzentration zu einem Pool vereint werden. Erst dann beginnt die Vereinzelnung der Zellen (Abb. 14), die ebenfalls schon im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde. Im Unterschied zum Abschnitt 2.4.1 werden die Zellen nicht in Medium aufgenommen und ausgesät sondern zu 30 µL Zellsuspensionen portioniert und direkt im Comet-Assay weiterverarbeitet (vgl. 2.6.1), der Rest steht für den FDA-Assay zur Verfügung (vgl. 2.7.1). Das in der folgenden Abbildung dargestellte Arbeitsschema weist eine Zeitachse auf. Diese liegt darin begründet, daß für einen vollständigen *In vivo*-Versuch mit Kontrolle und 3 Konzentrationen 12 Fische verarbeitet werden müssen, hierbei ist die Einhaltung eines Zeitlimits für die einzelnen Versuchsschritte von herausragender Bedeutung für die Qualität der erhaltenen Primärzellen.



**Abb. 14:** Schematisches Protokoll der Zellisolation aus dem Zebraäbrbling (*Danio rerio*) und des Einbringens der Zellen in den Comet Assay nach *In vivo*-Exposition gegenüber drei Konzentrationen plus Kontrolle.

## 2.5 Exposition

### 2.5.1 Belastung von RTG-2 Zellen mit ausgewählten Monosubstanzen

Die RTG-2 Zellen werden im Medium MEM Eagle (MEM, Eagle`s Modifikation mit 20 mM Hepes und 2 mM L-Glutamin, Sigma; komplettiert mit 50 mL FKS, 25 mg Neomycinsulfat und 5 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung auf 500 mL Medium) in sterilen Petrischalen (Ø 3.5 cm, Nunc) ausgesät und 24 h bei 20 °C inkubiert, um eine Anheftung der Zellen in den Schalen zu ermöglichen. Die Exposition erfolgt durch einen Austausch des Mediums gegen ein mit dem entsprechenden Schadstoff ver-

setztes Medium am folgenden Tag. Beim Dekantieren des alten Mediums werden auch geschädigte Zellen, die sich nicht angeheftet haben, aus dem Versuch entfernt.

Nach Beendigung der Exposition wird das Medium abdekantiert, die Zellen werden kurz mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gespült, und 200  $\mu\text{L}$  Trypsin/ EDTA-Lösung werden in die Petrischalen pipettiert. Das Ablösen der Zellen kann nun entweder über die einsetzende Trübung des Petrischalenbodens oder unter dem Inversmikroskop verfolgt werden. Nach erfolgter Ablösung wird die Trypsinwirkung durch Zugabe von 800  $\mu\text{L}$  Medium gestoppt und die Zellsuspension 10 min bei 150 g zentrifugiert. Die resultierenden Zellpellets werden in 100  $\mu\text{L}$  Medium aufgenommen, und die entstandene Zellsuspension wird im Comet-Assay weiter verarbeitet.

### 2.5.2 *In vitro*-Exposition von Primärzellen aus Fischen

#### 2.5.2.1 Supplementierung mit S9-Präparaten

Verschiedene Biotransformationsschritte sind für die Aktivierung von körperfremden Chemikalien zu reaktiven Metaboliten mit mutagenem und cancerogenem Potential verantwortlich (Rodriguez-Ariza et al., 1995); in diesem Zusammenhang wären als Biotransformationsenzyme der Phase I vor allem die Mitglieder die Cytochrom P450-Familie zu nennen (Goksoyr and Förlin, 1992; Stegemann und Kloepper-Sams, 1987). Daraus hat sich die Supplementierung von Gentoxizitätstest mit S9-Präparaten (supernatant 9000 g) aus der Leber von mit unterschiedlichen Induktoren vorbelasteten Spendertieren entwickelt, um so den jeweiligen Assay mit der metabolischen Kompetenz induzierter Hepatocyten aus dem Säugetier zu ergänzen. Dies hat sich als Standardmethode in der Gentoxikologie etabliert (Dhillon und Dhillon, 1995; Haggerty und Holsapple, 1990; Kerklaan et al., 1983; Maron und Ames, 1983; Rodriguez-Ariza et al., 1995; Slamenova, et al., 1997; Speit et al., 1996; Stocker et al., 1998; Tafazoli, et al., 1998). In den unter Abschnitt 3.1.6 beschriebenen Expositionsversuchen wurden die Ansätze mit den indirekt wirkenden, d.h. über Cytochrom P450 metabolisierten Gentoxinen 2-Acetylaminofluoren, Benzo[a]pyren und Dimethylnitrosamin mit einem S9-Mix aus der Leber von mit Aroclor induzierten Ratten supplementiert (S9-Präparat, Fa. CCR, Roßdorf; S9-Präparat mit S9-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/mL verdünnen; S9-Puffer: 5 mM Gluc.-6-phosphat, 4 mM NADP, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30 mM KCl, 50  $\mu\text{M}$  Na-Phosphatpuffer, pH 7,4). Hierfür wurden bei 2 mL Endvolumen Medium pro Well 200  $\mu\text{L}$  fertiger S9-Mix und eine entsprechende Menge an höher konzentriertem Medium eingesetzt. Das Rezept der S9-Aktivierung orientiert sich an den Vorgaben von Maron und Ames (1983); wegen der unterschiedlichen Verdünnung, die sich aus dem Proteingehalt des S9-Präparats ergibt, werden geringe Abweichungen in Kauf genommen.

#### 2.5.2.2 Exposition gegenüber Monosubstanzen

Für die *In vitro*-Untersuchungen werden die Leber- und Kiemenzellen des Zebraäbrblings nach Abschnitt 2.4.1 isoliert und in sterilen 24-Wellplatten über einen Zeitraum von 20 h den Schadstoffen exponiert. Die indirekt wirkenden Gentoxine 2-Acetylaminofluoren, Benzo[a]pyren sowie Dimethylnitrosamin werden hierbei mit dem unter Absatz 2.5.2.1 beschriebenen S9-Präparaten supplementiert. Zur Steigerung der exogenen Metabolisierung werden die genannten Substanzen in Medium mit dem S9-Präparat für 1 h bei 37 °C vorinkubiert. Erste Testdurchgänge mit den Monosubstanzen werden mit 2 h Expositionsdauer durchgeführt. Da die eingesetzten Referenzsubstanzen zum Teil schlecht wasserlöslich sind, werden von allen Substanzen Stammlösungen in DMSO angesetzt und bei -20°C gelagert. Die maximal eingesetzte DMSO-Konzentration im Test liegt hierbei bei 1 %. Um eine gleichmäßige Verteilung der entsprechenden Schadstoffstammlösung im Well zu gewährleisten, werden die

Zellen nach Isolation und Waschschritten in dem mit der Schadstofflösung versetzten Medium aufgenommen und in die Wells ausgesät. Nach Abschluß der Schadstoffbelastung werden die Zellen durch mehrmaliges, vorsichtiges Aufziehen mit einer Pipette aufgeschwemmt, die Zellsuspension in Eppendorf-Tubes überführt, bei 200 g zentrifugiert, in 100 µL M 199 resuspendiert und nach Abschnitt 2.6.1 im Comet-Assay auf DNA-Strangbrüche untersucht.

Die gewonnenen Erkenntnisse zur Reaktion von Primärzellkulturen aus Fischen auf die Belastung mit genotoxischen Substanzen im Comet-Assay basiert auf Untersuchungen mit dem Zebraäbrbling (siehe Abschnitte 3.1 – 3.5). Um eventuell nachweisbare genotoxische Effekte in Fischen aus dem Freiland in ihrem Ausmaß besser abschätzen zu können und in Relation zu an *Danio rerio* erhobenen Daten setzen zu können, werden Primärzellkulturen aus dem Rotaugen (*Rutilus rutilus*) und dem Gründling (*Gobio gobio*) (Gewinnung der Primärzellen, siehe Abschnitte 2.4.1 und 2.4.2) mit den bekannten Monosubstanzen *Benzo[a]pyren* und *4-Nitroquinolin-N-oxid* für 20 h in sterilen 24-Wellplatten belastet. Hierbei wird nach dem mit den Primärzellen aus dem Zebraäbrbling etablierten Protokoll verfahren, einzige Änderung ist eine Verringerung der Zentrifugationskraft von 200 g auf 150 g.

### 2.5.2.3 Exposition gegenüber Wasserproben

Für die *In vitro*-Untersuchungen werden die Leber- und Kiemenzellen des Zebraäbrblings nach Abschnitt 2.4.1 isoliert und in sterilen 24-Wellplatten über einen Zeitraum von 20 h den Wasserproben exponiert. Fünffach konzentriertes Medium (ohne Zusätze) wird mit der entsprechenden Wasserprobe verdünnt und dann mit den verwendeten Zusätzen (Antibiotika, FKS) versehen. Somit kann die Wasserprobe in einer 1 : 1,43-Verdünnung getestet werden. Um eine gleichmäßige Verteilung der entsprechenden Wasserprobe im Well zu gewährleisten, werden die Zellen nach Isolation und Waschschritten in dem mit der Wasserprobe versetzten Medium aufgenommen und in die Wells ausgesät. *Um mögliche Reaktionen von Wasserinhaltsstoffen der Probe mit dem Medium, mit Mediumzusätzen wie dem FKS (fötales Rinderserum) oder den Gefäßwänden der Mischgefäße zu verhindern oder wenigstens im Ausmaß zu begrenzen, wird das Wasserprobe-Medium-Gemisch erst während der letzten Zentrifugationsschritte der Zellisolation angesetzt.* Nach Abschluß der Belastung werden die Zellen durch mehrmaliges, vorsichtiges Aufziehen mit einer Pipette aufgeschwemmt, die Zellsuspension wird in Eppendorf-Tubes überführt, bei 200 g zentrifugiert, in 100 µL M 199 resuspendiert und nach Abschnitt 2.6.1 im Comet-Assay auf DNA-Strangbrüche untersucht.

### 2.5.3 *In vivo*-Exposition des Zebraäbrblings

#### 2.5.3.1 Durchführung

Bei den *In vivo*-Untersuchungen werden jeweils drei Zebraäbrlinge (zwei männliche und ein weibliches Tier) in Bechergläsern (600 mL, niedrige Form, Fa. Schott, Mainz) in 250 mL Testgut unter kontinuierlicher Belüftung mit Glas - Pasteurpipetten (ca. 100 Blasen pro Minute) über einen Zeitraum von insgesamt 3 Tagen exponiert (Abb. 15). Die Form der Gefäße begünstigt einen sehr schonenden Wasserwechsel, der täglich durchgeführt wird und bei dem 90 % des Testguts ohne übermäßige Belastung der Tiere ausgetauscht werden kann. Zur Verdünnung der Substanzen bzw. der Wasserproben wird Wasser aus dem Vorratsbehälter entnommen, der Kontrolle wird derselbe Anteil Lösungsvermittler zugesetzt wie der höchsten Konzentration der Testsubstanz.

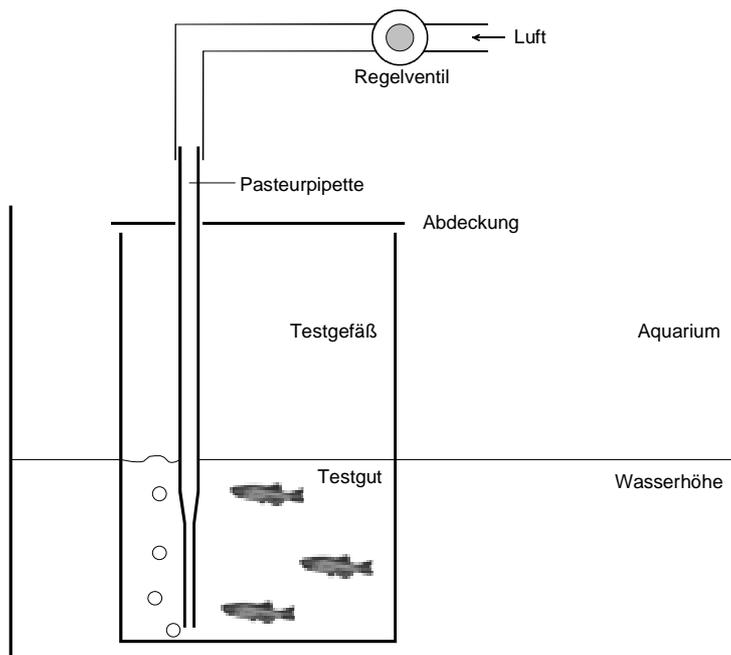
Die Versuchstiere werden vier Stunden vor Beginn des Experiments zum letzten Mal gefüttert. Dadurch wird verhindert, daß Substanzen, die an die Futterflocken adsorbieren können, von den Tieren in

unterschiedlicher Menge aufgenommen werden oder durch die Adsorption nicht mehr im Wasser verfügbar sind.

Nach Abschluß der Exposition werden die Leber- und Kiemenzellen nach den Angaben in Abschnitt 2.4.2 isoliert und nach Abschnitt 2.6.1 im Comet-Assay auf DNA-Strangbrüche untersucht.

### 2.5.3.2 Vorinduktion der Versuchstiere mit $\beta$ -Naphthoflavon

5 Tage vor Beginn der Belastung mit *Benzo[a]pyren* werden 6 Zebrabärblinge mit 27 mM  $\beta$ -Naphthoflavon (Fa Sigma, Deisenhofen), gelöst in Fischleberöl (Cod liver oil, ICN Biochemicals, Cleveland, USA), gespritzt, um die Biotransformation schon vor Beginn des Experiments zu induzieren. Hierzu werden die Tiere dem Aquarium entnommen, gewogen, auf einer feuchten Unterlage im Netz fixiert und mit Hilfe einer ausgezogene Glaskapillare 1  $\mu$ L des mit  $\beta$ -Naphthoflavon versetzten Fischleberöls unter die Bauchdecke gespritzt. Somit beträgt die Konzentration von  $\beta$ -Naphthoflavon im Tier bei einem Durchschnittsgewicht von 500 mg 15 mg/kg Körpergewicht. Die Tiere werden dann in ein Quarantäne-Becken überführt. Nachdem über den folgenden Zeitraum keine Veränderungen im Verhalten oder makroskopisch sichtbare Beeinträchtigungen beobachtet werden können, werden sie für 3 Tage mit 0.252 mg/L *Benzo[a]pyren* belastet oder unter gleichen äußeren Bedingungen ohne Schadstoffexposition als Kontrollen gehalten und die isolierten Hepatocyten (Abschnitt 2.4.2) nach Beendigung der Exposition in den Comet-Assay überführt (Abschnitt 2.6.1).



**Abb. 15:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur *In vivo*-Exposition von Zebrabärblingen. Dargestellt ist eins von bis zu vier Testgefäßen, die nebeneinander im Aquarium aufgebaut werden können.

### 2.5.4 Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Fischen aus dem Freiland

An zwei Probenahmestandorten (Heidelberg Wieblingen, Kläranlage Neckarhausen) werden die Fische mit Hilfe eines handelsüblichen Senknetzes gefangen und in einem belüfteten Transportgefäß ins Labor verbracht. Hier werden, wie unter Abschnitt 2.4.2 beschrieben, Primärzellkulturen aus Leber, Kieme und Darm hergestellt, die dann im Comet-Assay auf DNA Schäden untersucht werden. Als Kontrolltiere dienen Gründlinge und Rotaugen aus der Laborhaltung, die am Versuchstag vergleichba-

rem Fang- und Transportstress ausgesetzt werden. Weiterhin werden von den im Comet-Assay untersuchten Tieren Blutaustriebe angefertigt (siehe Abschnitt 2.8) und die Erythrocyten auf die Bildung von Mikrokernen untersucht.

Als weiteres Fließgewässer wird der Forellenbach südöstlich von Heidelberg untersucht. Der Bach ist durch einen weitgehend naturbelassenen Verlauf gekennzeichnet, jedoch befindet sich als Quelle anthropogener Beeinflussungen im Oberlauf der Zufluß einer Kläranlage, über welche die Abwässer der Klinik am Kohlhof aufbereitet in den Bach gelangen. Die Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) werden mit einem handelsüblichen Fischnetz gefangen und in einem Transportgefäß ins Labor verbracht; alle weiteren Schritte werden wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich werden auch Blutaustriebe angefertigt und auf die Bildung von Mikrokernen untersucht. Als Kontrolltiere dienen Bachforellen, die von einem kommerziellen Zuchtbetrieb (Fa. Belsler, Haigerloch-Gruol) erworben wurden und über mehrere Wochen an die Haltung im Labor adaptiert waren. Ebenso wird die genotoxische Belastung von Stichlingen aus einem weiteren kleinen, anthropogen stark beeinflussten Fließgewässer untersucht. Als Kontrolltiere dienen hierbei Tiere aus dem gleichen Gewässer, die für mindestens 4 Wochen im Labor gehalten werden

## 2.6 Comet-Assay

### 2.6.1 Testprotokoll

Die einzelnen Schritte des Comet-Assays sind in Abb. 16 dargestellt. Die Haftung der Gele auf den Objektträgern ist von entscheidender Bedeutung für den Comet-Assay; daher werden die angerauhten Objektträger mit einem Glasschneider beschriftet und in Ethanol (99 %) entfettet. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen mit puderfreien Latexhandschuhen, da Puderreste die Auswertung beeinträchtigen können.

Die Objektträger werden aus dem Alkohol entnommen und auf Zellstoff getrocknet. Inzwischen wird 1 % NMA (Normal temperature Melting Agarose, Seakem Gold™, FMC Bioproducts, Rockland, USA) in PBS (9,55 g/L Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Sigma, Deisenhofen) auf einer Heizplatte bei 300 °C aufgeköcht und auf einer weiteren bei 150 °C schwach siedend gehalten. Auf jeden Objektträger werden 700 µL NMA aufgebracht, durch ein Deckglas (Sondergröße 24 x 70 mm, Langenbrink, Emmendingen) gleichmäßig verteilt und für ca. 10 min in einem Trockenschrank bei 37 °C angetrocknet. Dann wird diese Gelschicht mit Hilfe eines weiteren Objektträgers wieder abgestreift und die Objektträger im Wärmeschrank ganz getrocknet. Dieser Schritt verbessert die Haftung der folgenden drei Gelschichten, die auf dem Objektträger verbleiben. Die erste bleibende Gelschicht besteht aus 0,5 % NMA, der wie oben beschrieben aufgeköcht und siedend gehalten wird. 200 µL NMA werden auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas blasenfrei verteilt. Direkt anschließend wird der Objektträger für 3 min auf eine eisgekühlte Metallplatte eben aufgelegt, um das Gel zu härten. Die Objektträger werden nun in einer Färbox auf PBS-getränktem Tuch im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, bis die zweite Gelschicht, welche die Zellen enthält, aufgetragen werden kann.

Anschließend wird der 0,7 % LMA (Low temperature Melting Agarose, Seakem Gold™, FMC Bioproducts) in PBS (9,55 g/L Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Sigma) aufgeköcht und in einem geschlossenen Wasserbad, das vor Verdunstung und damit Konzentrationsänderung des Agars schützt, bei 37 °C flüssig gehalten. Die nach den Angaben in den Abschnitten 2.6.2 und 2.6.3 erhaltenen Zellsuspensionen werden nun in Eppendorf-Tubes zu je 30 µL portioniert und die Objektträger mit der vorbereiteten ersten Gelschicht im Trockenschrank bei 37 °C erwärmt, um ein gleichmäßiges Verteilen der zweiten Gelschicht zu ermöglichen. Das Deckglas eines Objektträgers wird nun abgezogen,

und 90  $\mu\text{L}$  LMA werden mit den in Reaktionsgefäßen portionierten 30  $\mu\text{L}$  Zellsuspension durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt, um davon wiederum 90  $\mu\text{L}$  auf dem Objektträger mit einem Deckglas blasenfrei zu verteilen. Dann wird das Gel für 3 min auf Eis gehärtet und wieder für 5 min in den Wärmeschrank (37°C) gelegt.

Die dritte Gelschicht besteht ebenfalls aus 0,7 % LMA. Wiederum werden nach dem Abziehen des Deckglases 90  $\mu\text{L}$  LMA aufgetragen, blasenfrei mit einem neuen Deckglas verteilt, wie oben auf Eis gehärtet und im Trockenschrank wieder auf 37°C angewärmt. Die Zellen sind nun in einer Gelschicht eingeschlossen, die sandwichartig von zwei anderen bedeckt wird. Die erste Gelschicht stellt dabei die Verbindung zum Objektträger her und schafft durch ihre Dicke Abstand von diesem, was die Schärfebene bei der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop vom rauhen, unruhigen Untergrund abhebt. Die dritte Gelschicht sorgt für mechanischen Schutz der zweiten in den weiteren Bearbeitungsschritten und verhindert, daß die DNA eventuell nicht ganz eingeschlossener Zellen während der Lyse aus dem Gel diffundiert.

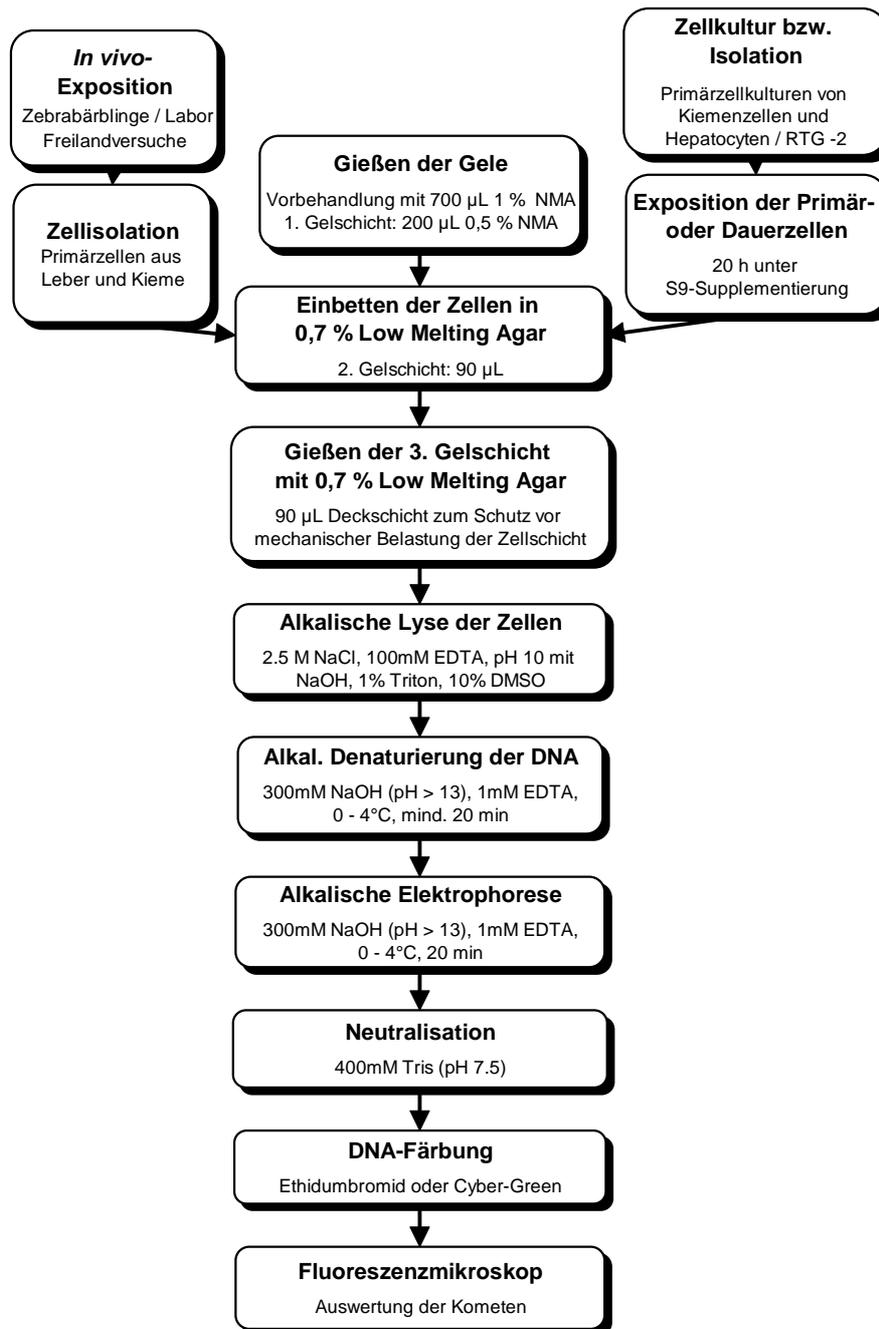
Die Deckgläser werden nun abgezogen und die Objektträger in 4 °C kalter Lyselösung für mindestens 1,5 Stunden (oder über Nacht) im Kühlschrank inkubiert. Die Lyse der Zellen erfolgt mit starken Detergentien (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, pH 10, vor Versuchsbeginn mit 1 % Triton X-100 und 10 % DMSO komplettiert) unter stark alkalischen Bedingungen zur Zerstörung der Membranen sowie zur Extraktion der Kernproteine. Kälte und Dunkelheit schützen die DNA vor Autolyse und UV-Schäden. Nach der Lyse ist die DNA völlig ungeschützt, weshalb alle weiteren Versuchsschritte in der Dunkelkammer durchgeführt werden.

Im Anschluß an die Lyse folgen Denaturierung und Elektrophorese der DNA. Dazu werden die Objektträger in der Elektrophoresekammer, die waagrecht auf Eis ausgerichtet ist, nebeneinander angeordnet, mit auf 4 °C gekühltem Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH < 13) überschichtet und für 20 min inkubiert. Dann erfolgt die Elektrophorese bei 25 V und 300 mA für 20 Minuten (Power Supply Model 200/2.0, Bio-Rad, München). Hierbei wird durch Schadstoffeinfluß fragmentierte DNA zu Kometen (Schweiften) auseinandergezogen, die mit steigendem Fragmentierungsgrad der Moleküle länger und dichter werden (Singh et al., 1988; Tice et al., 1990).

Nach der Elektrophorese werden die Objektträger für 2 min in Tris-Puffer (0,4 M, pH 7,5) getaucht; im neutralen Umfeld spiralisiert sich die DNA wieder und kann so mit Ethidiumbromid (Interkalation) angefärbt werden. Die Gele können ab diesem Zeitpunkt bis zu zwei Wochen auf PBS-getränktem Tuch im Kühlschrank gelagert werden.

### **2.6.2 Variationen im Testprotokoll des Comet-Assays**

Zur Optimierung des Nachweises von DNA-Strangbrüchen mit dem Comet Assay und Fischzellen wurden in Vorversuchen mit der Modellsubstanz *4-Nitroquinolin-N-oxid* unterschiedliche Denaturierungs- (10, 20, 30, 60 min) und Elektrophoresezeiten (10, 20, 30, 45, 60 min) getestet, um den Einfluß dieser Parameter auf die DNA-Fragmentierung zu überprüfen. Hierfür wurde die permanente Zelllinie RTG-2 verwendet, um die unterschiedlichen Testansätze mit stets gleichem Zellmaterial durchführen zu können.



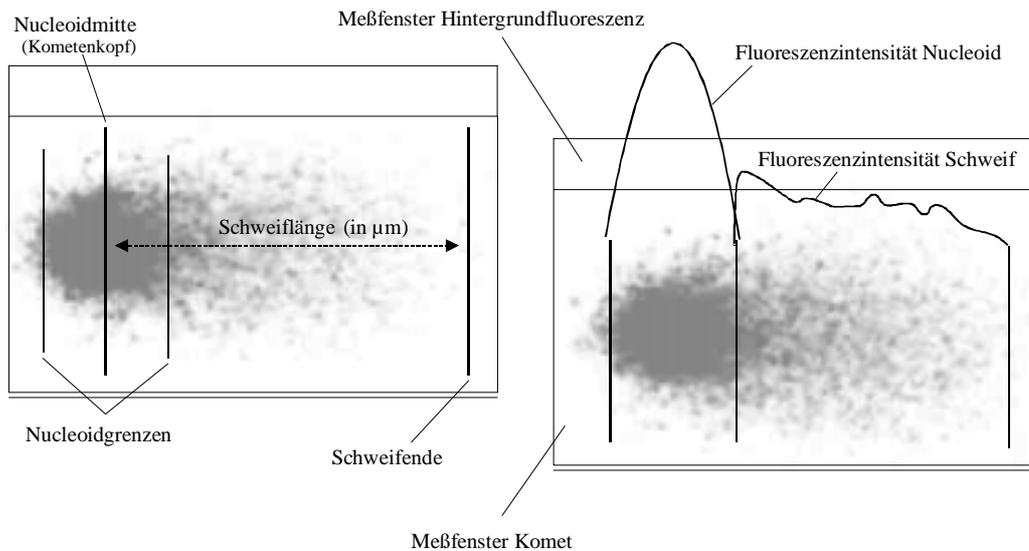
**Abb. 16:** Schematischer Ablauf des Comet-Assays für den *In vivo*- und *In vitro*-Ansatz mit Fischen und Fischzellen.

### 2.6.3 Auswertung des Comet-Assays

Zur Auswertung wird die DNA mit Ethidumbromidlösung (2 µM in Aqua demin.) angefärbt, indem pro Gel 75 µL der Färbelösung aufgetragen und mit einem Deckglas blasenfrei verteilt werden. Die Objektträger werden bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Leitz Aristoplan) in einer Metallbox auf PBS-getränktem Tuch lichtgeschützt aufbewahrt; die Auswertung erfolgt dann auf jeden Fall im Laufe des folgenden Tages. Bei 340-facher Vergrößerung und einer Anregungswellenlänge von 518 nm werden die Kometen mit einem Bildanalysesystem der Firma Optilas (München), bestehend aus einer Graustufen-CCD-Kamera (Pulnix TM-765E Kinetic), einem angeschlossenen PC mit

zwei Monitoren und der Auswertungssoftware Comet 3.0™ (Kinetic Images, Liverpool, UK), vermessen (Abb. 17). Es werden unter anderem folgende Parameter erhoben:

1. Länge des Kometenschweifes (*Tail Length*),
2. Verteilung der Fluoreszenzintensität auf Kopf und Schweif,
3. das *Tail Moment* als Produkt von *Tail Length* und Fluoreszenzintensität im Schweif und Kopf.



**Abb.17:** Darstellung der Vermessung von Kometen mittels des digitalen Auswertesystems von Kinetic Images Ltd. Das Meßfenster ist zweigeteilt, im unteren Bereich wird der „Komet“ vermessen, im oberen Teil die Hintergrundfluoreszenz, die zur Bestimmung der Kometengrenzen herangezogen wird. Links: Messung der reinen Schweiflänge, beginnend vom Nucleoid-Mittelpunkt; rechts: Vermessung der Fluoreszenzintensität in den Bereichen Nucleoid und Schweif.

Pro Konzentration werden 100 Zellen auf 2 Gelen vermessen (50 zufällig ausgewählte Kometen je Gel). Die Darstellung der nachfolgenden Befunde erfolgt entweder als *Tail Length* (Grundlagenuntersuchungen), als *Tail Moment* (standardmäßig) oder vergleichend als *Tail DNA* (Prozentsatz DNA im Schweif).

$$\begin{aligned}
 \textit{Tail Length} &= \textit{Strecke Nucleoidmitte bis Schweifende in } \mu\text{m} \\
 \textit{Tail Moment} &= \frac{\textit{Schweiflänge} * \textit{Schweif DNA}}{100}
 \end{aligned}$$

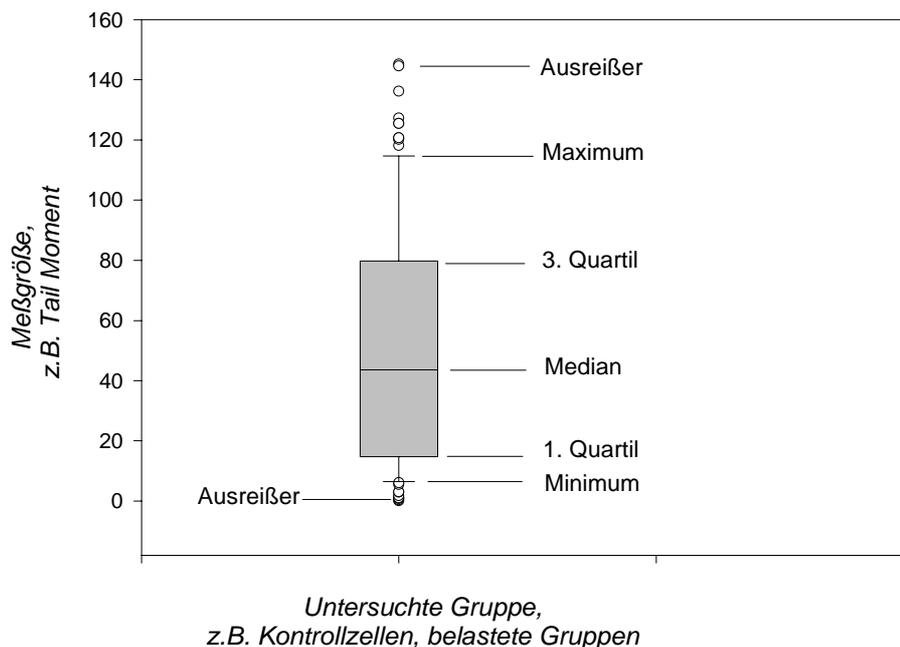
#### 2.6.4 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Meßparameter werden von der Software Comet 3.0™ automatisch gespeichert. Ein von Kinetic Images beigefügtes Excel™-Makro für Excel™ 5.0 (Microsoft Corporation, USA) greift auf diese Rohdaten zu und berechnet das *Tail Moment*. Dies ist eine häufig verwendete Methode

(Ashby et al., 1995; Olive und Banáth, 1993), da sie die beiden wichtigsten Variablen, nämlich Länge des Schweifes und Anteil der DNA im Schweif zu einem Vergleichswert umrechnet. Zusätzlich erstellt das Programm ein 3D-Diagramm der Auswertung.

Die *Tail Moment*-Daten werden aus der Excel-Datei herauskopiert und mit Sigma Stat™ 2.03 (SPSS-Jandel Scientific, Erkrath) statistisch ausgewertet. Dabei vergleicht der Test *ONE WAY ANOVA ON RANKS* (nach Kruskal-Wallis) Gruppen nicht numerisch verteilter Zahlen unter Zuhilfenahme der Medianwerte. Sind statistisch signifikante Unterschiede feststellbar ( $p < 0,05$ ), werden die Gruppen nach der *Dunnnett*-Methode mit der Kontrolle verglichen und nach dem Grad ihrer Abweichung geordnet. Diese Methode beschreibt nicht, ob die *Tail Moments* größer oder kleiner waren als die der Kontrolle, so daß zusätzlich die 25 %- und 75 %-Percentilen zur Beurteilung der Ergebnisse herangezogen werden.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als *Box- and Whisker-Plot* in Sigma Plot 4.0 (SPSS, Erkrath). Die in Abb. 18 grau eingefärbte Box zwischen der 25 % Perzentile (1. Quartil) und der 75 % Perzentile (3. Quartil) enthält 50 % der erhobenen Daten; der Median ist als Linie innerhalb der Box dargestellt. Die je 25% unterhalb bzw. oberhalb der Box liegenden Werte sind durch Whisker gekennzeichnet und werden durch Minimum bzw. Maximum begrenzt. Die Ausreißer der erhobenen Daten sind als Kreise dargestellt.



**Abb. 18:** Box- and Whisker-Plot nach Sigma Plot 4.0 (SPSS, Erkrath)

## 2.7 Cytotoxizitätsuntersuchungen

### 2.7.1 Der Fluoresceindiacetat (FDA)-Assay

Die simultane Zweifach-Färbung von Zellen in Suspension mit Fluorescein-Diacetat (FDA) und Ethidiumbromid ist eine schnelle Methode zur Bestimmung der Vitalität von Zellen (Jones und Senft,

1985; Strauss, 1991)) und wird bei den Untersuchungen zur Genotoxizität von Einzelsubstanzen und Umweltproben auf Dauer- und Primärzellen als Cytotoxizitätstest eingesetzt. Induziert eine auf Genotoxizität zu prüfende Probe Cytotoxizität, so daß die Vitalität der belasteten Zellen im Vergleich zur Kontrolle um mehr als 20 % abnimmt, kann diese Probe nur verdünnt auf Genotoxizität getestet werden. Bei einer Reduktion der Vitalität des Zellpools > 20 % lassen cytotoxische Effekte keine eindeutige Bestimmung von Genotoxizität im Comet Assay zu.

FDA ist ein unpolarer Ester, der die Zellmembran passiert und von cytosolischen Esterasen in Fluorescein und zwei Säuren gespalten wird. Da Fluorescein, ein polares Molekül, aktive Zellmembranen nur langsam passieren kann, akkumuliert es in vitalen Zellen und läßt diese bei einer Wellenlänge von 435 nm leuchtend grün erscheinen (Abbildung, siehe Bildtafel 1, 1.9). Die gleichzeitige Färbung mit Ethidiumbromid macht im selben Ansatz Zellen mit geschädigter Membran sichtbar, da Ethidiumbromid nur geschädigte Zellmembranen durchdringen kann und in diesen Zellen in die DNA interkaliert, so daß nicht-vitale Zellen an einem rot leuchtenden Kern zu erkennen sind (Abbildung, siehe Bildtafel 1, 1.10).

Für den Ansatz der Färbelösung werden 960 µL PBS mit 6 µL Fluoresceindiacetat-Stammlösung (5 mg/mL, Fa. Sigma) und 40 µL Ethidiumbromid-Stammlösung (200 µg/mL) versetzt; 25 µL der Färbelösung werden mit 25 µL der Zellsuspension aus den einzelnen Konzentrationen aus dem Comet-Assay gemischt, für 30 sec inkubiert und auf einen Objektträger aufgetragen. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop mit 340-facher Vergrößerung bei einer Anregungswellenlänge von 435 nm. Ausgewertet werden mindestens 250 Zellen, woraus die relative Überlebensrate (Kontrolle = 100 %) berechnet wird.

## 2.8 Der Mikronukleus-Test

Als vergleichender Genotoxizitätstest wurde der Mikronukleus Test mit RTG-2 Zellen durchgeführt. Hierfür werden RTG-2 Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen /mL in Petrischälchen ( $\varnothing$  3,5 cm, Nunc) auf alkoholsterilisierten 22 mm x 22 mm Deckgläschen ausgesät. Die Zellen werden direkt nach der Einsaat mit den unter Abschnitt 2.1 beschriebenen Monosubstanzen für 20 h belastet. Nach Ende der Exposition wird das Schadstoffmedium gegen frisches Medium ausgetauscht und die Zellen für weitere 72 h inkubiert. Nun werden die Zellen für 10 min in einer 1:1 Mischung PBS / (Methanol/Essigsäure 4:1) und dann zweimal für 10 min in einem Methanol/Essigsäure-Gemisch (4:1) entsprechend dem Protokoll von Gauthier et al. (1999) fixiert. Nach Lufttrocknung werden die Zellen für 1 min in GIEMSA-Lösung (Gurr, BDH Laboratory Supplies, Poole, UK) gefärbt und dann in destilliertem Wasser gespült. Nach Eindeckeln in DePeX (Serva, Heidelberg) werden die Präparate bei einer Vergrößerung von 1220 x unter Öl ausgewertet. Pro Probe werden 2000 Zellen untersucht und die Anzahl von Zellen mit Mikrokernen bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgt dann mit Sigma Stat 2.03 (SPSS-Jandel, Erkrath).

Weiterhin werden auch Blutproben der Fische aus dem Freiland getestet, die im Comet-Assay als Spendertiere für Primärzellen aus Leber, Kieme und Darm eingesetzt werden. Aufgrund ihrer großen Anzahl auch in kleinen Blutvolumina sowie ihrer guten Anfärbbarkeit werden für die folgenden Untersuchungen reife Erythrocyten verwendet, die bei Fischen noch einen Kern enthalten. Dafür wird den Fischen vor der Perfusion (vgl. Abschnitt 2.4.1) nach Freilegen des Herzens und Schnitt in das Atrium das austretende Blut mit Hilfe einer heparinisierten Glaskapillare (Hawksley & Sons Limited, Lancing, UK) entnommen und auf einem in 99 % Ethanol entfetteten und luftgetrockneten Objektträger aufgetragen und verteilt. Dieser Schritt sollte schnell durchgeführt werden, da Fischblut sehr schnell koaguliert. Die Blutausstriche werden nun für 5 min an der Luft getrocknet und für weitere 5 min in Methanol fixiert. Die Färbung erfolgt nach der Lufttrocknung mit GIEMSA für 30 sec. Nach

gründlichem Spülen der Objektträger mit Aqua bidest werden die gefärbten Blutaustriebe getrocknet und mit DePeX eingedeckelt.

Da mit der GIEMSA-Färbung der Kern wesentlich stärker als das umgebende Cytoplasma angefärbt wird, sind Mikronuklei im Cytoplasma neben dem regulären Kern einfach auszumachen. Die Proben werden mit einem Zeiss Aristoplan bei einer Vergrößerung von 1220 x ausgewertet. Pro Tier werden 2000 Erythrocyten untersucht, und der relative Anteil an Zellen mit Mikronuklei wird bestimmt.

Als Kriterien für einen Mikronukleus gelten bei den Untersuchungen mit Dauerzellen und Erythrocyten völlige Trennung vom Hauptkern, gleiche Anfärbung und übereinstimmende Struktur wie der Hauptkern sowie gleiche Schärfeebene. Ist einer der genannten Punkte nicht gegeben, so wird dieses Ereignis als nicht zweifelsfrei bestimmter Mikronukleus nicht mitgezählt. Mehrere Mikrokerne pro Zelle werden als ein Ereignis gewertet.

### 2.9 Elektronenmikroskopie

Die Zebrabärblinge für die Untersuchung zu cytopathologischen und ultrastrukturellen Veränderungen in den Organen Leber und Kieme unter dem Einfluß genotoxischer Belastung stammten aus einem Life Cycle-Experiment, welches von M. Diekmann, AG Nagel an der Hydrobiologie der TU Dresden durchgeführt wurde. Die Tiere wurden vom befruchteten Ei ab mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,3, 0,9, 2,7, 8,1 und 24,3 µg/L) von *4-Nitroquinolin-N-oxid* belastet. Von der höchsten Belastungskonzentration konnten keine Tiere untersucht werden, da in den beiden Belastungsgruppen nur 12 % bzw. 22 % der Tiere überlebt hatten. Für die übrigen Konzentrationen konnten jeweils nur ein Weibchen und ein Männchen untersucht werden; obwohl damit das Erstellen von Dosis-Wirkungsbeziehungen nicht möglich war, ist dieses ein vielversprechender Ansatz zur Validierung des genotoxischen Indikatortests Comet Assay.

#### 2.9.1 Perfusion

Die Zebrabärblinge werden, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, perfundiert; im Unterschied zur Methode bei der Gewinnung von Primärzellkulturen wird hierbei als Perfusionsmittel das Perfusionsfixans I (1,5 % Glutardialdehyd und 1,5 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer mit 2,5 % PVP, pH 7,6) verwendet. Die Dauer der Perfusion richtet sich nach der Größe des Tieres und kann über die fortschreitende Fixierungsstarre des Tieres kontrolliert werden. Es werden nun Leber und Kiemenbögen herauspräpariert und in Würfel mit ca. 2-3 mm Kantenlänge bzw. in Stücken zu je mehreren Primärlamellen in Perfusionsfixans I bei 4°C inkubiert.

#### 2.9.2 Einbettung von Organen

Die Proben (Leber und Kieme) werden für 2 x 10 Minuten in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,6 bei 4°C gespült und über Nacht in 4°C kaltem Fixans II (2,5 % Glutardialdehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer mit 4 % Polyvinylpyrrolidon (PVP, Serva, Heidelberg) und 0,05 % CaCl<sub>2</sub>, pH 7,6) inkubiert. Darauf folgend werden die Proben nach dreimaligen Spülen in 0,1 M Cacodylatpuffer 90 Minuten in reduziertem Osmium (1:1 Gemisch aus 2 % OsO<sub>4</sub> und K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>) = Osmiumferrocyanid, Karnovsky 1971 (Karnovsky, 1971)) zur besseren Darstellung von Membranen und Glykogen nachfixiert. Im Anschluß daran folgt je ein dreimaliges Spülen mit 0,1 M Cacodylat- und 0,05 M Maleatpuffer (pH 5,2, 4°C) und über Nacht eine *En Bloc* Kontrastierung bei 4°C in 1 % Uranylacetat in 0,05 M Maleatpuffer. Nach Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe mit 75, 85, 95 (auf 4°C gekühlt) und 100 % Ethanol (ungekühlt) werden die Proben für 24 Stunden in ein 1:1 Gemisch aus Ethanol und Spurr

(Spurr, 1969) gegeben. Im Anschluß daran werden die Proben für 6 h in ein 1:3 Gemisch aus Ethanol und Spurr überführt, bevor sie wieder über Nacht in reinem Spurr inkubiert werden. Durch das schrittweise Ersetzen des Ethanols durch Spurr wird die Durchdringung des Gewebes mit dem Kunstharz verbessert. Nun können die Proben am folgenden Tag in Beemkapseln eingebettet werden. Die Polymerisation des Kunstharzes erfolgt bei 70 °C für 48 h im Wärmeschrank. Von den auf diese Weise eingebetteten Proben werden anschließend mit Hilfe eines Reichert OM-U 2 Ultramikrotoms Semidünnschnitte für die Orientierung mit dem Lichtmikroskop sowie Ultradünnschnitte von 40 nm Dicke für das Elektronenmikroskop angefertigt. Die Ultradünnschnitte werden zur Verstärkung des Kontrasts für 2 min mit Bleicitrat kontrastiert (Reynolds, 1963).

### **2.9.3 Einbettung von Zellen**

Die zu untersuchenden Zellen der Dauerzelllinie RTG-2 sowie die Hepatocyten von Zebraquarienfisch und Rotaugen (Kultur-/ Isolationsbedingungen siehe Abschnitt 2.4) werden in den Wells einer 24-Well-Platte in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen / mL auf Thermanoxplättchen (Nunc<sup>TM</sup>, Wiesbaden) ausgesät und entsprechend Abschnitt 2.5.1 belastet. Nach Abschluß der Belastung wird das Medium gegen 1 mL 4°C kaltem Fixans II (2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer mit 4 % PVP und 0,05 % CaCl<sub>2</sub>, pH 7,6) ausgetauscht und die Zellen damit für mindestens 1 h fixiert. Die weiteren Schritte werden bis zur Inkubation in reinem Spurr wie im obigen Abschnitt beschrieben durchgeführt. Zur Einbettung werden die Thermanoxplättchen aus den Wells entnommen, in bis zu 4 Teile geteilt und diese dann mit dem Zellrasen nach unten auf die mit Spurr gefüllten Beemkapsel gelegt. Nach Auspolymerisation der Proben befinden sich die Zellen im Spurr. Durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff wird die Verbindung Thermanoxplättchen - Spurrblöckchen aufgebrochen. Von den Proben werden mit Hilfe eines Diamantmessers auf dem Reichert OM-U-2 Mikrotom Ultradünnschnitte angefertigt.

### **2.9.4 Histochemie**

Zum Nachweis der Leberperoxisomen inkubiert man die Proben nach der Glutaraldehydfixierung in alkalischem 3,3'-Diaminobenzidinmedium (DAB) nach LE HIR et al. (1979) (Le Hir et al., 1979). Hierzu werden die Proben in 10 mM Theorell-Stenhagen-Puffer bei pH 10 mit 5 mM DAB und 0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 90 Minuten bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Danach wird mit der weiteren Probenaufbereitung wie oben beschrieben verfahren.

### **2.9.5 Semidünnschnitte für die Lichtmikroskopie**

Die etwa 200 nm dicken Semidünnschnitte werden auf Objektträger übertragen und über Nacht auf einer Heizplatte bei 70°C belassen. Als Orientierungshilfen für die Elektronenmikroskopie werden sie nach Richardson (1971) gefärbt. Weiterhin wird zur Feststellung des Glykogengehaltes die Versilberung nach Singh (1964) durchgeführt. Diese Methode färbt das Glykogen braun, die restlichen Zellbestandteile gelblich. Bei kurzem Gegenfärben mit Richardson-Blau (1:10 verdünnt) nach weiteren 24 h auf der Heizplatte erscheinen basophile Substanzen grünlich-bläulich.

#### **2.9.5.1 Vorgehen**

1. Zur Herstellung einer 10 % Silberdiaminlösung werden 1,3 g AgNO<sub>3</sub> in 13 mL Aqua bidest. gelöst; etwa 1,5 mL werden als Stammlösung in ein sauberes Becherglas gegeben.

2. Die restliche Silberdiaminlösung wird mit konzentriertem Ammoniak tropfenweise versetzt; dabei fällt Silber als braunschwarzer Niederschlag aus. Die Zugabe von Ammoniak wird nun solange fortgesetzt bis die Lösung wieder klar ist.
3. Mit der Stammlösung wird gegentitriert, bis die Lösung opaleszierend erscheint.
4. 10 mL der Lösung werden filtriert und auf ein Volumen von 100 mL mit Aqua bidest aufgefüllt.
5. Die Objektträger mit den Semidünnschnitten werden in ein 100 mL Färbebecken gestellt und die Lösung vorsichtig dazu gegossen.
6. Die Semidünnschnitte werden nun bei 60°C mindestens 60 min im Dunklen inkubiert, hierbei färben sich die Schnitte braun.
7. Nach der Inkubation wird die Färbelösung abgegossen und zweimal mit Aqua bidest. vorsichtig gespült (die Schnitte schwimmen sehr leicht auf).
8. Die Objektträger werden nun auf der Wärmebank getrocknet.
9. Mit stark verdünnter Richardson-Lösung kann kurz gegengefärbt werden.
10. Weiterhin ist eine Glykogendifferenzierung und ein Spülen der Schnitte mit 5 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  möglich.

#### 2.9.5.2 Richardson-Blau

1 % Azurblau in Aqua bidest; 1 % Methylenblau in 1 % Borax (Natrium-Tetraborat). Beide Komponenten 1:1 mischen.

#### 2.9.6 Kontrastierung für die Elektronenmikroskopie

Zur Hervorhebung von Membranen wurden die Ultradünnschnitte für ca. 1 Minute mit Bleicitrat kontrastiert. Die Auswertung erfolgte dann mit einem Zeiss EM 10.

### 2.10 Untersuchungen zur teratogenen Wirkung gentoxischer Substanzen

#### 2.10.1 Embryotoxizitäts- und Early-Life-Stage Tests mit dem Zebraärbling nach Nagel

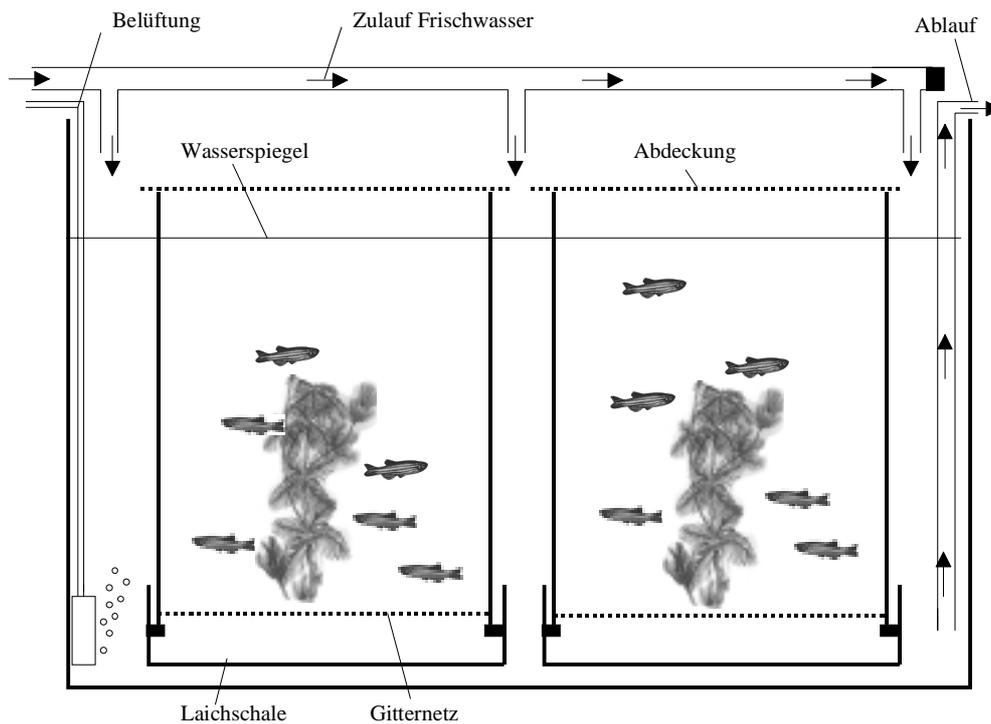
Zum Nachweis teratogener Effekte werden die im Comet Assay untersuchten Gentoxine 2-Acetylaminofluoren, Benzo[a]pyren, Dimethylnitrosamin, Nitrofurantoin, N-Methyl-N'-Nitroso-N-Nitroguanidin, 4-Nitroquinolin-N-oxid sowie UV C im Embryotoxizitäts- sowie Early-Life-Stage-Test nach Nagel untersucht. Als Prüforganismen dienen hierbei Embryonen von *Danio rerio*. Mit diesen Tests lassen sich letale sowie subletale Effekte auf unterschiedlichen Entwicklungsstufen bis 48 h (Embryotoxizität-Test) und 96 h (Early-Life-Stage-Test) erfassen.

Hierfür werden einen Tag vor Testbeginn Zuchtgruppen bestehend aus 2 weiblichen und 4 männlichen Zebraärblingen, die vorher mehrmals täglich mit Artemien *ad libitum* gefüttert wurden, in die Ab- laichanlage (siehe Abb. ) überführt (für Wasserwerte siehe Abschnitt 2.3.2). Zu Beginn der Lichtphase am nächsten Morgen werden nach Beendigung von Balz und Eiablage die Laichschalen mit den Eiern entnommen und die Befruchtungsrates bestimmt. Ein Test wird nur bei einer Befruchtungsrates > 50 % angesetzt.

Für die Untersuchungen werden die im Comet Assay verwendeten DMSO-Stammlösungen der gentoxischen Substanzen eingesetzt, hierbei wird eine maximale DMSO-Konzentration von 0,1 % nicht überschritten. Die Verdünnungsreihen werden mit rekonstituiertem Wasser gemäß ISO-Standard 7346/3 angesetzt. Die benötigten Salze zum Ansatz dieses Verdünnungswassers werden als Stammlö-

sungen angesetzt ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 11,76 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 4,93 g/L;  $\text{NaHCO}_3$ : 2,59 g/L; KCL: 0,23 g/L). 25 mL jeder Stammlösung werden in 1L aqua bidest. überführt. Das Wasser wird vor Erstellung der Verdünnungsreihen mit den Testsubstanzen bis zur Sauerstoffsättigung und bis zum Einstellen eines stabilen pH-Werts von  $7,8 \pm 0,2$  belüftet und auf  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  temperiert.

Bei befruchteten Eiern des Zebraäbrblings kann bei  $26^\circ\text{C}$  schon nach etwa 15 min die erste Zellteilung beobachtet werden; die nun beginnende Entwicklung folgt dem discoidalen Furchungstyp, hierbei wird die Keimscheibe synchron in 4, 8, 16 und 32 Blastomeren geteilt. Ab dem 4-Zellstadium sind die befruchteten Eier eindeutig von den unbefruchteten zu unterscheiden. Letztere koagulierten nach etwa 8 – 10 h. Nur die befruchteten Eier werden in den Versuch überführt. Um die sich entwickelnden Eier möglichst frühzeitig zu exponieren, werden pro Konzentration ca. 40 Eier sofort nach der Entnahme, aus den Laichkästen in flachen Glas-Petrischalen den Testsubstanzen ausgesetzt. Aus diesen Petrischalen werden dann mit Hilfe eines Binokulars 20 Eier in die Wells einer 24-Wellplatte überführt. Je Konzentrationsstufe werden somit 20 befruchtete Eier einzeln in je 2 mL Testlösung exponiert. In die verbleibenden 4 Wells der Platte wird jeweils 1 Ei in 2 mL reines Verdünnungswasser überführt. Bei einem Ansatz mit 5 Konzentrationen werden somit auch 20 Kontrolleier, verteilt auf die 5 Platten im Test untersucht. Die 24-Well-Platten werden nun mit Folie verschlossen und bei  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  in einem Brutschrank mit einem 12h / 12h Hell-Dunkelrhythmus inkubiert. Nach 24h und 48 h erfolgt die Untersuchung der Embryonen im Rahmen des Embryotoxizitätstest sowie nach 72 h und 96 h im Rahmen des Early-Life-Stage Test. Hierbei werden die in Tabelle 4 zusammengefaßten Parameter untersucht.



**Abb.19:** Ablaichanlage bestehend aus Aquarium, 6 Laichschalen (abgebildet sind 2 Einheiten), in die passend 6 Plastikaquarien mit Gitternetzböden und undurchsichtigen Seitenscheiben eingesetzt werden, Belüftung und Außenfilter. Pro Plastikaquarium wurde eine Zuchtgruppe bestehend aus 2 Weibchen und 4 Männchen eingesetzt. Zur Laichstimulation wurden Plastikpflanzen eingesetzt. Anlage konstruiert und gebaut von E. Leist.

**Tabelle 4:** Zum jeweiligen Testzeitpunkt untersuchte Parameter während der Entwicklung der Embryonen des Zebrafisches unter dem Einfluß unterschiedlicher Schadstoffe

	24 h	48 h	72 h	96 h
Normal entwickelter Keim	+	+	+	+
Koagulierter Keim	+	+	+	+
Keine Somiten	+	+	+	+
Keine Schwanzablösung	+	+	+	+
Keine Spontanbewegung	+	+	+	+
Keine Augenanlagen	+	+	+	+
Ödembildung	+	+	+	+
Kein Blutkreislauf		+	+	+
Pigmentierung		+	+	+
Schlupf			+	+
Seitenlage			+	+
Entwicklungsstand			+	+
Mißbildungen			+	+
Verkrümmungen				+



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Voruntersuchungen zum Comet Assay mit Fischzellen

Die Methode der Einzelzell-Gelelektrophorese oder Comet Assay wurde in der hier angewandten Form von Singh et al. 1988 mit menschlichen Lymphocyten etabliert und verstärkt in der medizinischen Forschung mit menschlichen Zellen oder zumindest Säugerzellen angewendet (Abt et al., 1997; Müller et al., 1994; Nocentini, 1995; Olive et al., 1993 a, 1994, 1997). Um den Assay zum Nachweis genotoxischer Belastungen in der aquatischen Umwelt mit Fischen und Fischzellen zu nutzen und die dort erarbeiteten Ergebnisse im Vergleich mit schon vorhandenen Studien (Belpaeme et al., 1997, 1998; Deventer, 1996; Mitchelmore und Chipman, 1998 a,b; Monod et al., 1998; Pandrangi et al., 1995; Villarini, 1998) besser interpretieren zu können wurden, verschiedene Grundlagenuntersuchungen zur Optimierung und Validierung des Systems mit Fischzellen durchgeführt:

- ◆ Veränderungen verschiedener Versuchsparameter zur Optimierung des Assays mit Fischzellen
- ◆ Optimierung der Isolation und Kultur von Primärzellen aus dem Zebraärbliing
- ◆ Untersuchungen zum Einfluß des Geschlechts der Spendertiere auf die Reaktion der Primärzellen gegenüber genotoxischen Belastungen
- ◆ Untersuchungen zum Einfluß unterschiedlicher Expositionszeiten auf das Ergebnis im Comet Assay mit Fischzellen
- ◆ Exposition der Fischzellen mit direkt und indirekt wirkenden genotoxischen Substanzen
- ◆ Vergleich verschiedener Primärzellen in ihrer Reaktionsbreite auf genotoxische Belastungen
- ◆ Vergleich der Befunde aus den *In vitro*-Untersuchungen mit Primärzellen aus Fischen nach *In vivo*-Belastung
- ◆ Vergleich der Primärzellen verschiedener Arten in ihrer Reaktion auf genotoxische Substanzen
- ◆ Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Umweltproben und Freilandtieren
- ◆ Vergleich der Comet Assay-Daten mit Ergebnissen aus Untersuchungen mit anderen Endpunkten

##### 3.1.1 Expositionsschemata für Zelllinien und Primärkulturen

Basierend auf der Arbeit von Neumüller (1995) wurden mit RTG-2 Zellen sowie isolierten Primärzellen ein einfaches Expositionsschema entwickelt.

Die RTG-2 Zellen wurden am Vortag in Petrischälchen (Nunc<sup>TM</sup>, Ø 3,5 cm) in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen /mL in 2mL ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit der zu testenden Substanz bzw. Umweltprobe belastet. Hierfür wurde das alte Medium aus den Petrischälchen abdekantiert, die angehefteten Zellen kurz mit PBS gespült (nicht angeheftete Zellen werden dadurch entfernt) und dann mit 2 mL neuem Medium versetzt. Dieses Medium wurde direkt vor Gebrauch für die entsprechende Zellgruppe mit der jeweiligen Schadstoffkonzentration versetzt (*DMSO-Stammlösungen lösen sich nicht ausreichend in der flachen Petrischale, sondern bilden einen dünnen Film über dem Boden*).

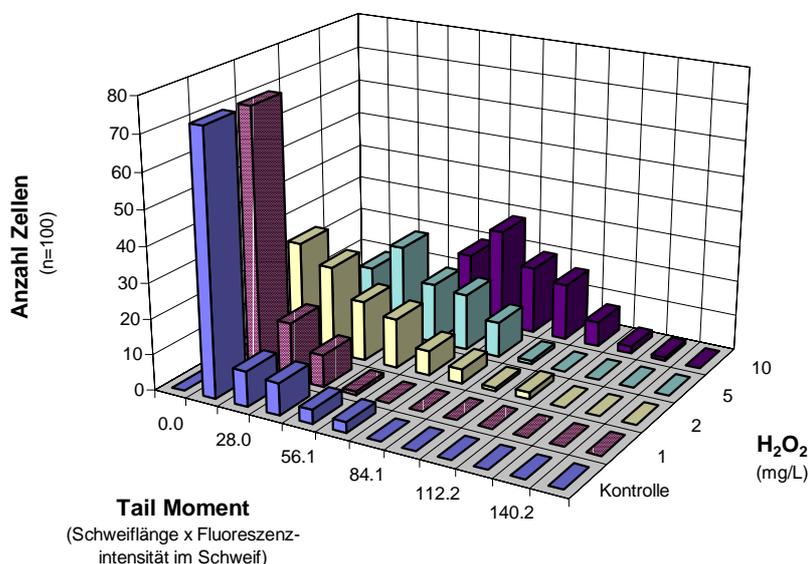
Primärzellkulturen wurden in den Wells einer 24-Wellplatte in einer Dichte von maximal  $1 \times 10^5$  Zellen /mL in 2 mL eingesät. *Da die Adhäsion der Primärzellen an den Well-Boden deutlich schwächer ist als die der RTG-2 Zellen, konnte die Schadstoffexposition nicht über einen kompletten Mediumwechsel erfolgen:* entweder erfolgte der vorsichtige Austausch von nur 1 mL Medium gegen ein in der doppelten Konzentrierung angesetztes Schadstoff-Medium oder bei direkter Inkubation nach Isolierung

rung erfolgte die Aufnahme der Zellen nach dem letzten Zentrifugationsschritt in entsprechend vorbereitetem Schadstoff-Medium.

→ Diese Form der Schadstoffexposition für die beiden Zellgruppen wurde bei Belastung mit Schadstoffen oder Umweltkonzentrationen in Stammlösungen (Lösungsvermittler z.B. DMSO) angewendet. Entsprechend dem Rezept (siehe Abschnitt 2.5.2) wurde dem vorbereiteten Schadstoffmedium auch noch S9-Mix und zum osmotischen Ausgleich eine entsprechende Menge mehrfach konzentriertem Medium zu gesetzt.

→ Bei Exposition gegenüber Wasserproben erfolgte der Ansatz für die beiden Zellgruppen wie für die Stammlösungen. Im Unterschied wurde nun fünffach konzentriertes Medium mit der Wasserprobe und S9 Mix auf die normale Mediumkonzentration verdünnt und erst dann noch mit den entsprechenden Mediumzusätzen (FKS, Antibiotika) versetzt (Wasserprobenanteil etwa 70%). Bei Direktinkubation mit primären Zebrafischzellen erfolgte der Ansatz dieser Schadstoffmedien mit Beginn der letzten Zentrifugationsschritte.

Wie aus Abbildung 20 ersichtlich reagierten RTG-2 Zellen nach Belastung mit verschiedenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid, durchgeführt nach dem oben beschriebenen Expositionsschema, mit einem dosisabhängigen Anstieg der DNA-Fragmentierung. Cytotoxizität war in den verwendeten Konzentrationen nicht nachweisbar. Aus der Verteilung der Tail Moment-Werte in den höheren Konzentrationen (2 - 10 mg/L) wird ersichtlich, daß auch ein sehr homogener Zellpool mit deutlich unterschiedlichen Antworten auf dem Niveau der einzelnen Zelle reagiert. Die Fähigkeit, den durch die Wasserstoffperoxid-Belastung induzierten oxidativen Stress abzufangen und die zelluläre DNA vor radikalischen Angriffen zu schützen scheint in dem Fibrocyten-Pool unterschiedlich ausgeprägt zu sein, möglicherweise abhängig vom Zellzyklus der betroffenen Zellen.



**Abb. 20:** DNA-Fragmentierung in RTG-2 Zellen nach 2 h Exposition mit verschiedenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ausgewertet wurden 50 Zellen von je 2 Gelen pro Konzentration.

### 3.1.2 Die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)

Die auf DNA-Schäden zu untersuchenden Zellen wurden wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben in ein Gel eingegossen. Nach der Lyse der Zellen wurde die nun frei im Gel vorliegende und entspiralisierte DNA im alkalischen Elektrophoresepuffer in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen. Hierbei nahm sie den von der Zelle im Gel hinterlassenen Hohlraum gleichmäßig ein. Durch Anlegen einer Spannung

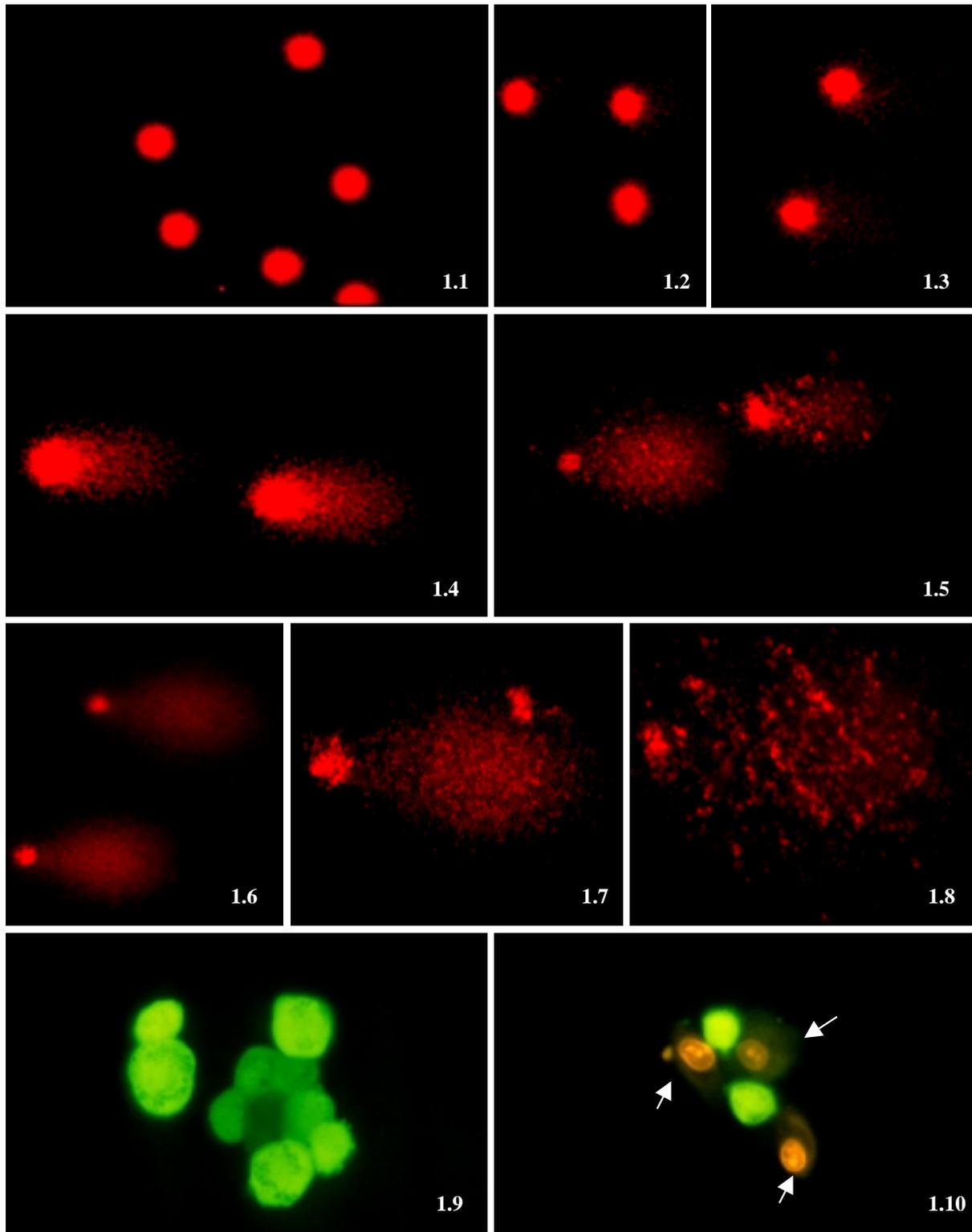
von 300 mA bei 25 V wurde die DNA in Richtung der Anode gezogen. Durch Strangbrüche relaxiert konnten DNA-Fragmente oder freiliegende Enden in das Gel einwandern. Hierdurch entstand nach Anfärbung mit einem DNA-Farbstoff das Bild eines Kometen.

Abb. 1.1 auf Bildtafel 1 zeigt für den gewählten Versuchsansatz typische Kontrollzellen ohne DNA-Migration, durch Veränderungen der Denaturierungs- und Elektrophoresezeiten kann dieses Bild verändert werden. Zum Nachweis beispielsweise DNA-vernetzender Substanzen werden die angesprochenen Zeiten verlängert, was zu versuchsinduzierten Strangbrüchen führt. Die Kontrollzellen zeigen dann ebenfalls eine deutliche Schweifbildung und ein Rückgang der Schweifbildung in den belasteten Gruppen kann auf eine verringerte Migration vernetzter DNA-Fragmente zurückgeführt werden.

Die Abb. 1.2-1.8 zeigen eine mit steigender genotoxischer Belastung ansteigende DNA-Fragmentierung, als Endpunkte können dann die Schweiflänge, das Tail Moment (Schweiflänge x Fluoreszenzintensität im Schweif) sowie weitere Parameter wie die prozentuale DNA-Verteilung zwischen ‚Kopf‘ und ‚Schweif‘ vermessen werden.

Hierbei werden die in den Abb. 1.6 und 1.7 gezeigten Kometenformen nach Belastung mit 1.9 mg/L *4-Nitroquinolin-N-oxid* von verschiedenen Autoren als Indiz für eine Induktion der Apoptose (Fairbairn et al., 1995; Gopalakrishna und Khar, 1995; Olive et al., 1993b) angesehen.

Um eine DNA-Fragmentierung über cytotoxische Effekte der untersuchten Substanzen ausschließen zu können, wurde der Fluoresceindiacetat-Assay nach Strauss (1991) durchgeführt (Abb. 1.9 u. 1.10). Das im Ansatz vorhandene Fluoresceindiacetat ist membrangängig und wird in den Zellen durch zelluläre Esterasen gespalten; lebende Zellen leuchten grün. Das ebenfalls in der Testlösung vorhandene Ethidiumbromid ist nicht membrangängig, gefärbte Kerne und nicht grün-fluoreszierendes Cytoplasma deuten auf tote Zellen hin.



**Bildtafel 1:** Comet Assay mit primären Fischzellen. **1.1:** Kontrollzellen, denaturierte DNA füllt das ehemalige Zellareal im Gel aus; keine DNA-Migration (Original 340 x). **1.2:** Geringe DNA-Fragmentierung nach Belastung mit 1.9 µg/L 4-NQO (Original 340 x). **1.3:** Mäßige DNA-Fragmentierung (Original 340 x). **1.4:** Starke DNA-Migration nach Belastung mit 190 µg/L 4-NQO (Original 540 x). **1.5:** Sehr starke DNA-Fragmentierung, Kometen-Kopf nimmt deutlich ab; 1.9 mg/L 4-NQO (Original 340 x). **1.6** und **1.7:** Kometenform, von verschiedenen Autoren mit Apoptose in Verbindung gebracht; bei 1.9 mg/L 4-NQO (Original 540 x). **1.8:** DNA-Wolke, nicht mehr vermessbar mit digitalem Auswertesystem (Original 540 x). Färbung 20 µg/mL Ethidiumbromid. **1.9:** Cytotoxizitäts-Untersuchungen mit dem Fluoresceindiacetat-Assay, grün = lebende Zellen; **1.10:** Cytoplasma ungefärbt, Kern Ethidiumbromid-gefärbt = tote Zellen (*Pfeile*), Originale 540 x.

### 3.1.3 Voruntersuchungen zur Optimierung des Testprotokolls mit Fischzellen

Zur Überprüfung des Standardprotokolls für den Comet-Assay, welches ursprünglich für Säugerzellen erarbeitet wurde, wurden mit der permanenten Fischzelllinie RTG-2 aus der Gonade der Regenbogenforelle unterschiedliche Denaturierungs- und Elektrophoresezeiten getestet. Für diese Untersuchungen wurde die permanente Zelllinie verwendet, um in den Ansätzen ausreichend Zellmaterial in vergleichbarem physiologischen Zustand zur Verfügung zu haben. Bei der Verwendung von Primärzellen aus dem Zebraquariabläbling wären sowohl interindividuelle Unterschiede als auch Isolationsartefakte nicht auszuschließen gewesen. Als genotoxisches Agens wurde *4-Nitroquinolin-N-oxid*, ein bekanntes, direkt wirkendes Carcinogen in einem Konzentrationsbereich zwischen 1.9 µg/L – 0.95 mg/L gewählt. Diese Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Frau A. Tischmeyer durchgeführt.

Hierbei konnten im unteren Konzentrationsbereich (1.9 µg/L, 19 µg/L) bei einer gleichbleibenden Elektrophoresezeit von 20 min mit den *Denaturierungszeiten* 10, 20, 30 und 60 min keine signifikanten Unterschiede im Grad der DNA-Fragmentierung nach *4-Nitroquinolin-N-oxid*-Belastung festgestellt werden (Tab. 5, Abb. 21). In der höchsten Konzentration (0.95 mg/L) kam es bei längerer Denaturierungszeit zu einer deutlichen Erhöhung der *Tail Moment*-Werte, aber auch zu einer größeren Streuung (Abb. 21). Da in den unteren Konzentrationen (*nur geringe Schadenshäufigkeit*) keine Unterschiede im Grad der DNA-Fragmentierung auftraten, ist nach 10 und 20 min Denaturierung die DNA soweit aufgeschmolzen, daß sich die gesetzten DNA-Schäden ohne behindernde sterische Effekte oder verbliebene Doppelstränge in sich frei bewegende DNA-Fragmente übersetzen ließen. Der deutliche Anstieg der DNA-Fragmentierung bei langen Denaturierungszeiten und hohen Schadstoffkonzentrationen liegt wahrscheinlich in einer Sekundärschädigung bereits stark vorgeschädigter DNA-Stränge begründet.

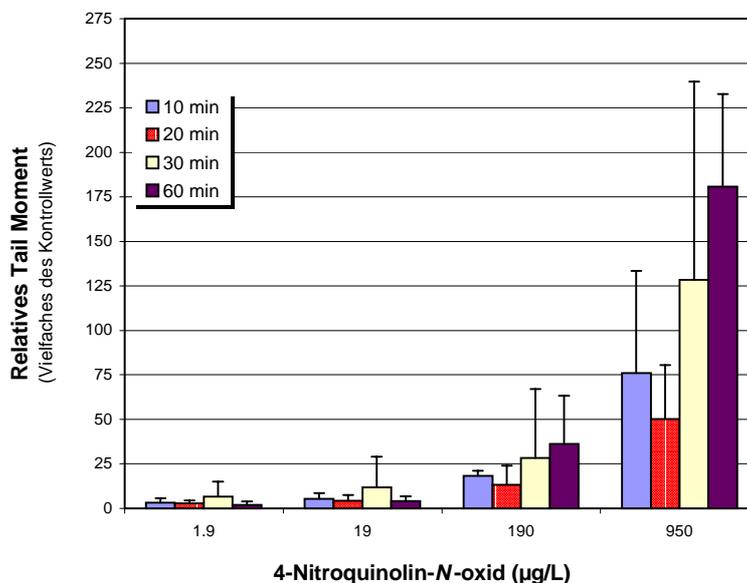
Tab. 5: Auswirkungen unterschiedlicher Denaturierungs- und Elektrophoresezeiten auf das Tail Moment von RTG-2 Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von *4-Nitroquinolin-N-oxid* belastet wurden

	Kontrolle	0.0019 mg/L	0,019 mg/L	0.19 mg/L	0.95 mg/L
Denaturierungszeiten (Elektrophoresezeit 20 min)					
10 min	0.30	0.81	2.42	4.01	16.59
20 min	0.34	0.93	1.59	3.26	14.50
30 min	0.25	0.80	1.28	2.86	25.44
60 min	0.22	0.80	1.51	7.19	41.89
Elektrophoresezeiten (Denaturierungszeit 20 min)					
10 min	0.34	0.63	2.01	4.16	18.00
20 min	0.16	2.10	8.78	15.04	33.16
30 min	0.26	2.69	15.06	19.32	55.52
45 min	7.90	16.07	25.83	40.21	80.63
60 min	6.88	10.46	40.71	57.55	145.87

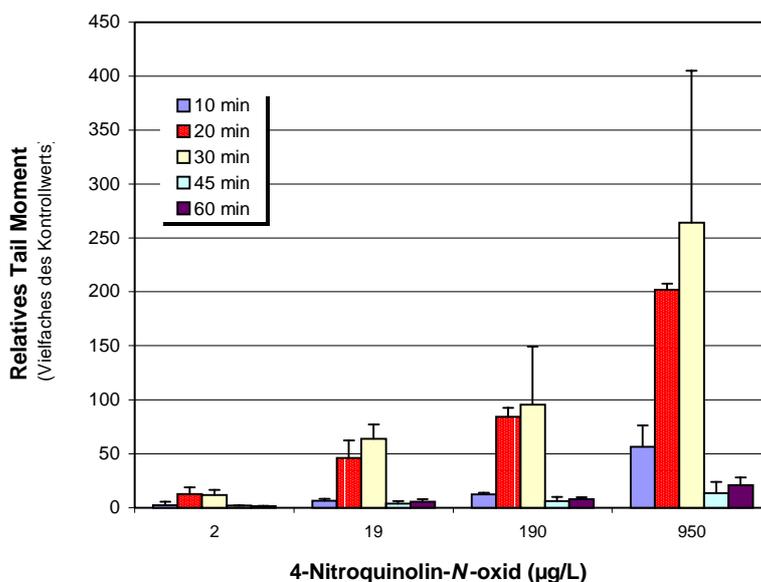
Tail Moment-Werte als Median aus 3 Experimenten (n = 300)

Die Verlängerung der Elektrophoresezeit (10, 20, 30, 45, 60 min) führte, besonders in den höheren Konzentrationen, zu einer deutlich stärkeren Schweifbildung in allen Testansätzen. Da die Streuung der Werte ebenfalls stark zunahm, konnte jedoch keine statistisch faßbare Sensitivitätssteigerung des Assays aufgezeigt werden (Tab. 5). Wie aus Abb. 22 zu entnehmen konnte, mit der Elektrophoresezeit von 20 min der deutlichste Unterschied im Grad der DNA-Fragmentierung zwischen Kontrolle und der geringsten Belastungskonzentration von 1.9 µg/L aufgezeigt werden. Die steigenden Elektrophoresezeiten führten also zur einer deutlichen Erhöhung der Tail Moment-Werte (Tab. 5), also zu einem

Anstieg der DNA-Fragmentierung. Da aber auch die Kontrollwerte stark anstiegen (um Faktor 20 – 30 über den Kontrollwerten der kurzen Elektrophoresezeiten [10, 20, 30 min]) verringerten sich die relativen Tail Moment-Werte (die Faktoren, um den die Belastungsgruppenwerte den Kontrollwert übersteigen) im Vergleich zu den 10 min-, 20 min- und 30 min-Ansätzen (Abb. 22), ein möglicher Hinweis auf einen stark angestiegenen Anteil Assay-induzierter DNA-Strangbrüche. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde an dem für Säugerzellen etablierten Testprotokoll festgehalten (20 min Denaturierung und 20 min Elektrophorese).



**Abb. 21:** Einfluß verschiedener Denaturierungszeiten auf den Endpunkt Tail Moment im Comet Assay mit RTG-2 Zellen, belastet mit 4-Nitroquinolin-N-oxid. Dargestellt ist der Faktor, um den der Median des Tail Moments der belasteten Konzentrationen den Median der Kontrollen übersteigt. Daten aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.



**Abb. 22:** Einfluß unterschiedlicher Elektrophoresezeiten auf den Endpunkt Tail Moment im Comet Assay mit RTG-2 Zellen, belastet mit 4-Nitroquinolin-N-oxid. Dargestellt ist der Faktor, um den der Median des Tail Moments der belasteten Konzentrationen den Median der Kontrollen übersteigt. Daten aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

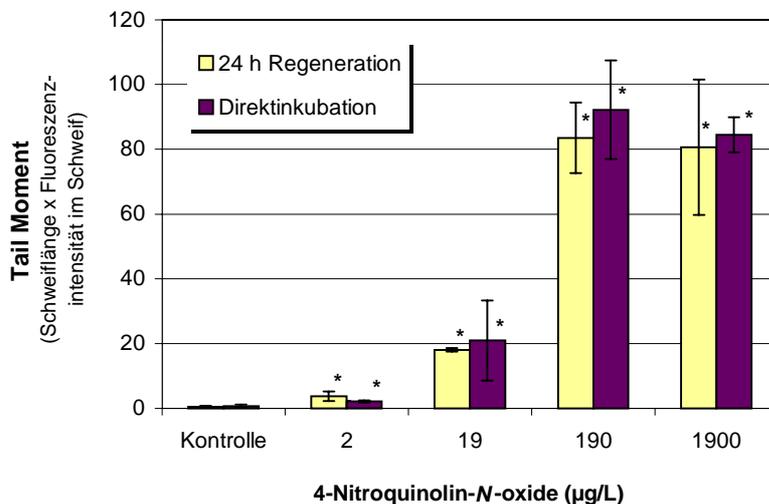
### 3.1.4 Optimierung der Isolations- und Kulturbedingungen von primären Hepatocyten und Kiemenzellen aus dem Zebraärbling

Basierend auf den Isolationsmethoden von Deventer (1996), Pärt (1993) und Rahman (1996) wurden die bestehenden Protokolle für den Einsatz der Primärkulturen in Genotoxizitätsuntersuchungen optimiert.

Für ein Comet Assay-Experiment mit isolierten Hepatocyten und Kiemenzellen aus dem Zebraärbling, bestehend aus 20 Gelen (entspricht Kontrolle, Positivkontrolle sowie 4 Konzentrationen), wurden 5 Fische (2 Weibchen, 3 Männchen) benötigt. Hierbei waren die schwierig und nur in geringerer Zahl zu gewinnenden Kiemenzellen der begrenzende Faktor. Aus diesen Tieren wurde jeweils ein Zellpool von Hepatocyten und Kiemenzellen gewonnen. Vorgreifend auf den Abschnitt 3.1.5 konnte diese Mischung der beiden Geschlechter problemlos durchgeführt werden, da deutliche geschlechtsbedingte Unterschiede der Primärzellen auf Belastung mit genotoxischen Substanzen in Kultur nicht nachzuweisen waren. Sowohl die Perfusion der Tiere als auch die Erythrocyten-Lyse-Inkubation dienten der Entfernung der Erythrocyten aus der Zellkultur. Fisch-Erythrocyten verfügen auch im reifen Zustand noch über einen Kern, sind also prinzipiell für Untersuchungen mit dem Comet Assay geeignet, aber aufgrund ihrer hochkondensierten DNA im Kern ist mit einem deutlich unterschiedlichen Ergebnis im Comet Assay zu rechnen.

Die Vereinzelnung der Zielzellen wurde über enzymatischen Verdau (Trypsin/EDTA-Inkubation) mit anschließender mechanischer Vereinzelnung durch ein 70 µm GazeNetz erreicht. Hierbei konnten auch sehr viele Zelltrümmer beobachtet werden. Zur Reinigung der Kultur waren deshalb mehrere Reinigungsschritte (*Zentrifugation mit anschließender Resuspendierung*) notwendig. Mit jedem Waschschritt verminderte sich allerdings auch die Zellausbeute, so daß mit 2 derartigen Schritten ein praktikabler Kompromiß gefunden wurde. Weiterhin zeigte sich eine Trennung der Zentrifugation für Hepatocyten und Kiemenzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe als einen für die Isolationsqualität wichtigen Schritt. Die erhaltenen Zellen wurden dann in Medium M199 aufgenommen und in den Wells einer 24-Well-Platte (Nunclon™, Nunc, Wiesbaden) in 2mL pro Well ausgesät.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluß einer Regenerationszeit auf das Ergebnis im Comet Assay überprüft. Hierfür wurden primäre Hepatocyten einer Isolation auf 2 Ansätze aufgeteilt: Belastung direkt nach Isolation und Belastung nach 24 h Regeneration. Wie aus Abbildung 23 zu entnehmen konnte zwischen den beiden Ansätzen im Grad der DNA-Fragmentierung als Reaktion auf die genotoxische Belastung kein Unterschied festgestellt werden.



**Abb. 23:** Belastung von primären Hepatocyten aus dem Zebraärbling mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* direkt nach der Isolation (*dunkler Balken*) oder nach 24h Regeneration (*heller Balken*). \*) Signifikant verschieden von der Kontrolle nach ANOVA ON RANKS (Sigma Stat 2.03).

### 3.1.5 Untersuchungen zum Einfluß des Geschlechts auf die Ergebnisse im Comet-Assay

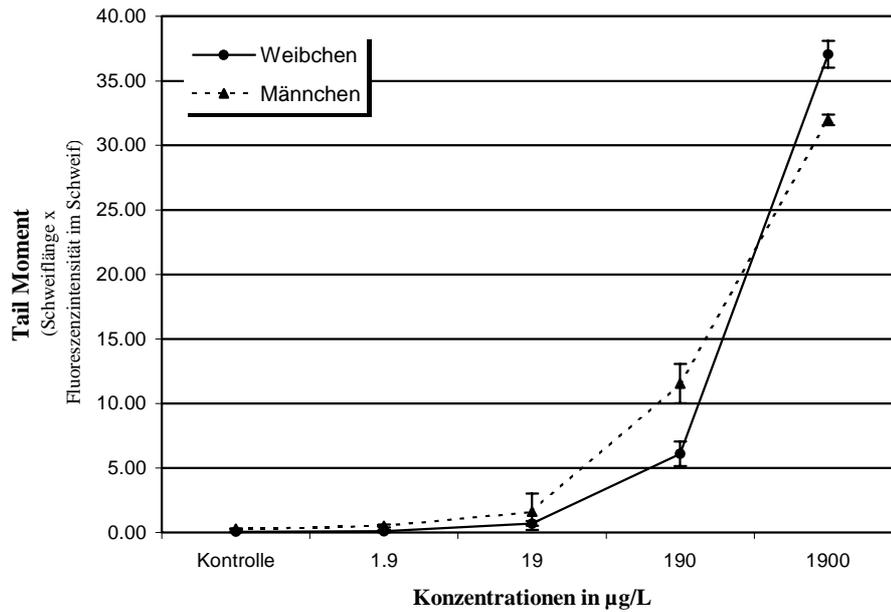
Genotoxizitätsuntersuchungen mit Primärzellen aus Kleinfischen wie dem Zebraquarienfisch bieten die Möglichkeit des *In vitro-In vivo*-Vergleichs, da diese Tiere auch in recht kleinen Wasservolumina gehalten werden können. Aufgrund ihrer geringen Größe sind aber für die Gewinnung von Primärzellen eines Versuchsansatzes mehrere Tiere notwendig. Während es bei den Kiemen bezüglich der Ausbeute keine geschlechtsspezifischen Unterschiede gibt, ist die Leber eines adulten Weibchens aufgrund geschlechtsspezifischer Aufgaben wie der Synthese des Dottervorläuferproteins Vitellogenin ein Vielfaches größer als die eines Männchens. Somit wäre, auch unter dem Aspekt der Verfügbarkeit adulter Tiere, der Versuchsansatz mit einer Mischung aus beiden Geschlechtern wünschenswert.

Ob für ein zu erstellendes Standardprotokoll für Untersuchungen mit dem Comet Assay und primären Fischzellen die Mischung beider Geschlechter sinnvoll ist, wurde in Untersuchungen zur Reaktion getrennt isolierter weiblicher und männlicher Primärzellen auf Belastung mit einem direkt wirkenden (*4-Nitroquinolin-N-oxid*) und einem indirekt wirkenden Genotoxin (*Benzo[a]pyren*) näher beleuchtet. Diese Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Frau A. Tischmeyer durchgeführt.

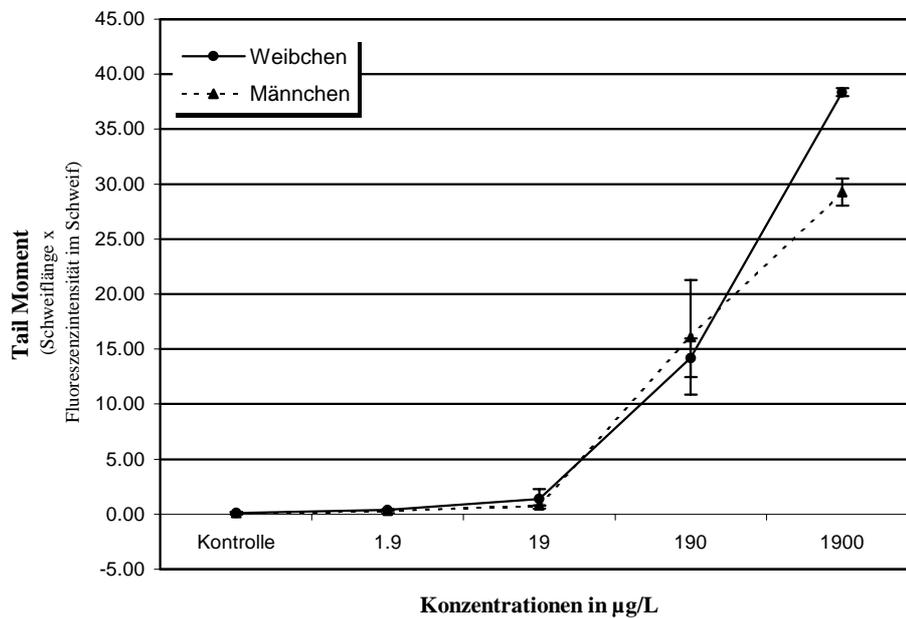
Die Wirkung von *4-Nitroquinolin-N-Oxid* auf isolierte Hepatocyten und Kiemenzellen von weiblichen und männlichen Zebraquarienfischen zeigte eine vergleichsweise einheitliche Effektausprägung. Die *Tail Moment*-Werte folgten in allen unabhängigen Versuchen einer deutlichen Dosis-Wirkungs-Beziehung, deren Verlauf, wie aus Abb. 24 und 25 zu ersehen, keine deutlichen Unterschiede aufweist. In der mit 190 µg/L zweithöchsten Konzentration war die Reaktion in den weiblichen Hepatocyten etwas schwächer, dafür war der Grad der DNA-Fragmentierung in der höchsten Konzentration mit 1900 µg/L höher als bei den Hepatocyten von männlichen Spendertieren. Ein ähnlicher Verlauf kann auch für die Kiemenzellen aufgezeigt werden (Abb. 25).

Einen etwas deutlicheren Unterschied wiesen die Hepatocyten der beiden Geschlechter nach Belastung mit dem indirekt wirkenden Mutagen *Benzo[a]pyren* auf. Obwohl in den beiden niedrigen Konzentrationen sehr ähnliche *Tail Moment*-Werte gemessen wurden, zeigten die beiden höchsten Konzentrationen das schon für *4-Nitroquinolin-N-oxid* beschriebene Bild, allerdings mit deutlicher ausgeprägten Unterschieden (Abb. 26). Da die Reaktion in den beiden niedrigsten Konzentrationen vergleichbar ausfiel und die Unterschiede im hohen Konzentrationsbereich zwar deutlich waren, aber keine einheitliche Richtung vorgaben, kann hier nicht von einem anderen Verhalten gegenüber dem Schadstoff ausgegangen werden. Außerdem muß auch auf die sehr hohe Standardabweichung in der höchsten Beladungskonzentration der weiblichen Primärzellen hingewiesen werden.

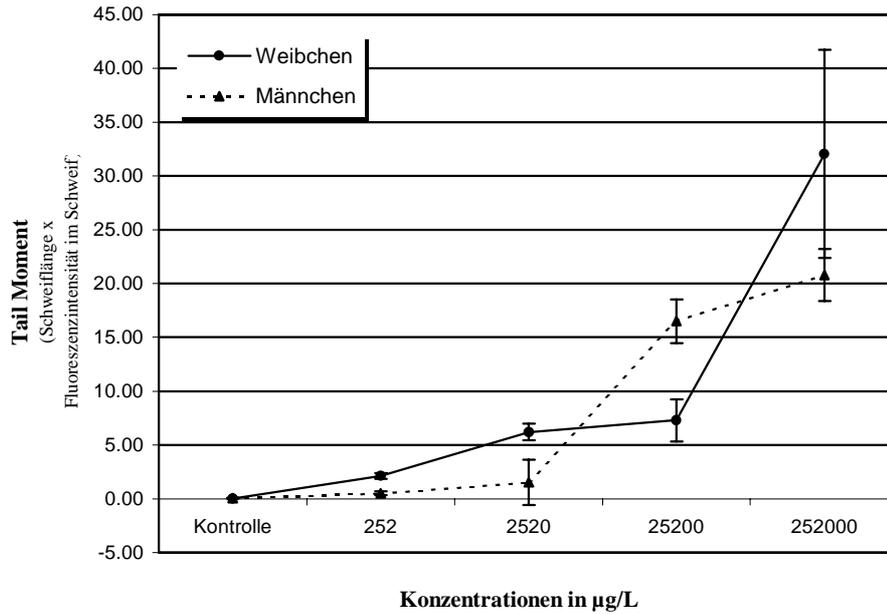
Im Gegensatz dazu zeigten die Kiemenzellen beider Geschlechter eine sehr ähnliche Antwort auf die *Benzo[a]pyren*-Belastung (Abb. 27).



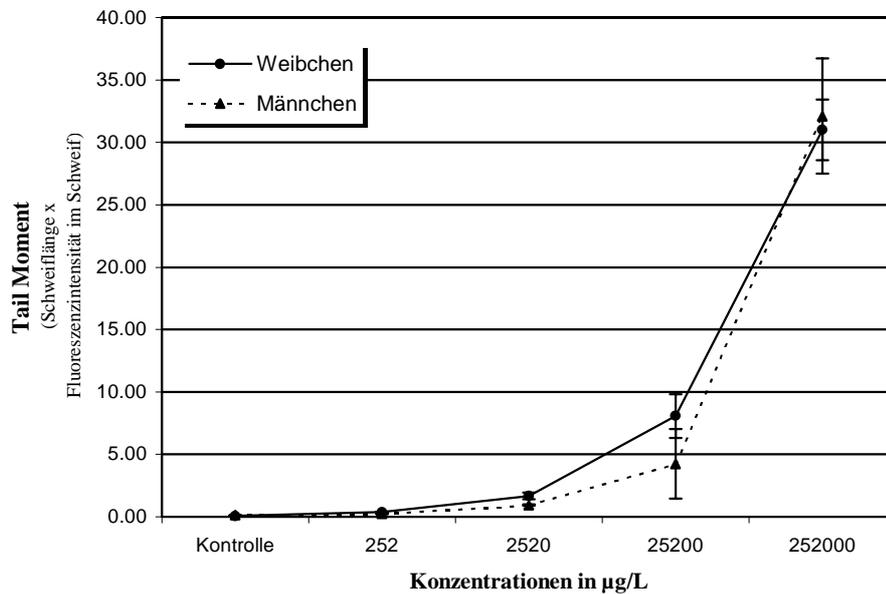
**Abb. 24:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus weiblichen und männlichen Spendertieren mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* für 20 h. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 Gelen pro Konzentration.



**Abb. 25:** Belastung von isolierten Kiemenzellen aus weiblichen und männlichen Spendertieren mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* für 20 h. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 Gelen pro Konzentration.



**Abb. 26:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus weiblichen und männlichen Spendertieren mit *Benz[a]pyren* für 20 h. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 Gelen pro Konzentration.



**Abb. 27:** Belastung von isolierten Kiemenzellen aus weiblichen und männlichen Spendertieren mit *Benz[a]pyren* für 20 h. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 Gelen pro Konzentration.

### 3.1.6 Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung ausgewählter Monosubstanzen auf isolierte Hepatocyten und Kiemenzellen aus dem Zebraärbling

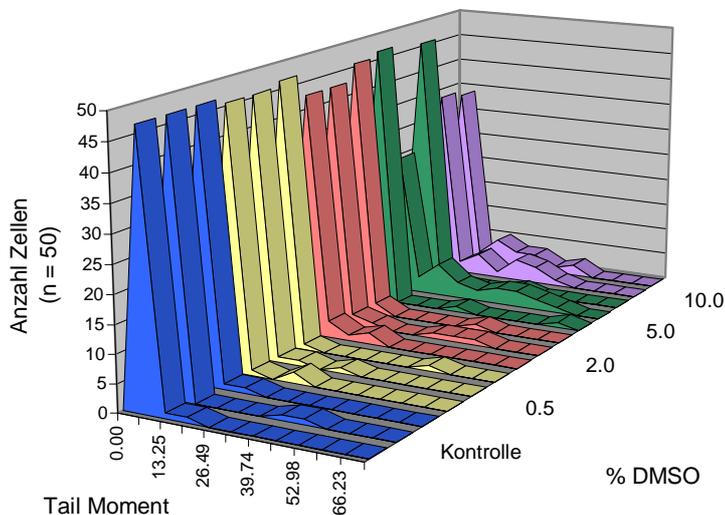
#### 3.1.6.1 Untersuchungen mit 2 h-Exposition

Untersuchungen mit Fischen in der Genotoxikologie mit dem Endpunkt DNA-Strangbruch waren zu Beginn dieser Arbeit rar (Deventer, 1996; Pandrangi et al., 1995), und auch bis zum heutigen Tag besteht noch keine ausreichend große Datenbasis (Belpaeme et al., 1998; Devaux, 1998, Mitchelmore und Chipman, 1998b; Monod et al., 1998; Villarini, 1998). Deswegen wurden bekannte, gut untersuchte cancerogene Stoffe ausgewählt, um das System Comet Assay mit Fischzellen zu optimieren und die Ergebnisse in Relation zu Ergebnissen mit besser untersuchten Zielorganismen/-zellen setzen zu können.

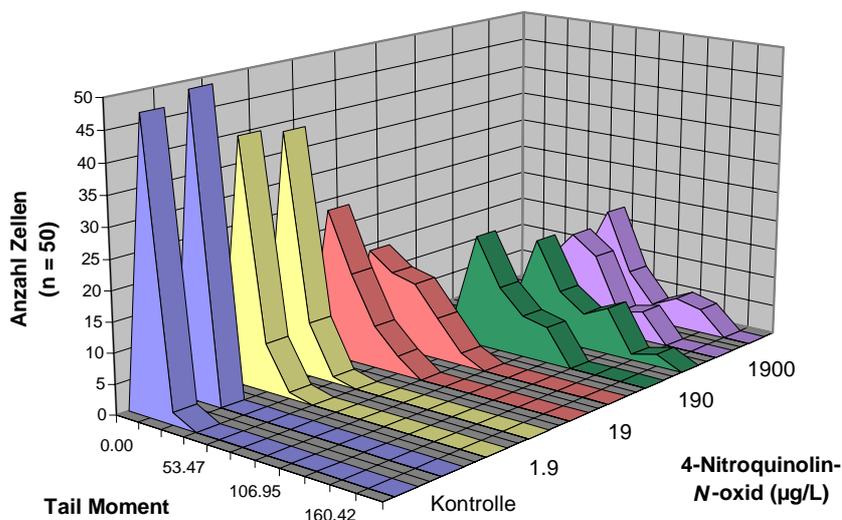
Erste Versuchsreihen mit den Referenzsubstanzen *2-Acetylaminofluoren*, *Benz[a]pyren*, *Dimethylnitrosamin*, *Nitrofurantoin*, *4-Nitroquinolin-N-oxid* und *Wasserstoffperoxid* wurden mit einer auf Säugerzellen adaptierten Expositionsdauer von 2 h durchgeführt. Für die isolierten Primärzellen aus dem Zebraärbling wurde in Vorversuchen geklärt, ab welchen Konzentrationen im Comet Assay erfassbare Effekte mit dem Lösungsvermittler DMSO auftreten (siehe Abb. 28). Cytotoxische Effekte konnten in den untersuchten Konzentrationen (Tab. 6) für keine Testsubstanz mit dem FDA Assay nachgewiesen werden. Die über Cytochrom P450 metabolisierten Gentoxine *2-Acetylaminofluoren*, *Benz[a]pyren* sowie *Dimethylnitrosamin* zeigten bis zur höchsten getesteten Konzentration selbst mit exogener Aktivierung über S9-Präparate von mit Aroclor-induzierten Ratten keine genotoxischen Effekte in beiden Zellsystemen (*Daten nicht graphisch dargestellt*); *Nitrofurantoin*, *4-Nitroquinolin-N-oxid* (Abb. 29) sowie *Wasserstoffperoxid* führten (Abb. 30) dagegen sowohl in Hepatocyten wie auch in Kiemenzellen zu einer deutlichen dosisabhängigen DNA-Fragmentierung.

**Tab. 6:** Konzentrationsbereiche der Referenzsubstanzen mit 2 h-Exposition im Comet Assay (mg/L)

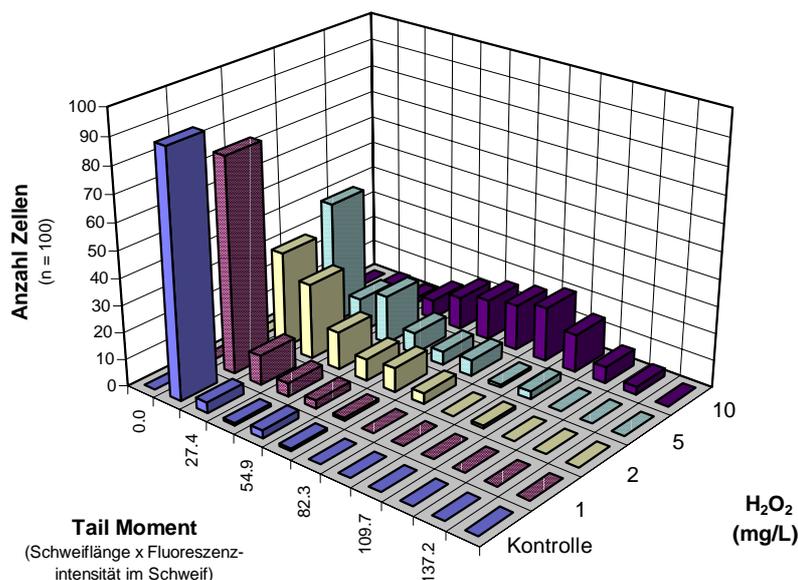
	2-Acetylaminofluoren	Benz[a]-pyren	Dimethylnitrosamin	Nitrofurantoin	4-Nitroquinolin-N-oxid	Wasserstoffperoxid
Getesteter Konzentrationsbereich	0,24 – 240	0,25 – 252	0,074 – 74	2,38 – 238	0,0019 – 1,9	1 – 10



**Abb. 28:** DNA-Fragmentierung bei isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling als Reaktion auf eine 2-stündige Belastung mit Dimethylsulfoxid (DMSO). Ausgewertet wurden 3 Gele pro Konzentration, auf jedem Gel wurden 50 Zellen vermessen.



**Abb. 29:** DNA-Fragmentierung bei isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling als Reaktion auf eine 2-stündige Belastung mit 4-Nitroquinolin-N-oxid. Ausgewertet wurden 2 Gele pro Konzentration, auf jedem Gel wurden 50 Zellen vermessen.



**Abb. 30:** DNA-Fragmentierung bei isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling als Reaktion auf eine 2-stündige Belastung mit Wasserstoffperoxid. Ausgewertet wurden 2 Gele pro Konzentration, auf jedem Gel wurden 50 Zellen vermessen.

### 3.1.6.2 Untersuchungen mit 20 h-Exposition

Da sich die indirekt wirkenden Carcinogene 2-Acetylaminofluoren, Benzo[a]pyren und Dimethylnitrosamin bis zur Löslichkeitsgrenze (für 2-AAF und BP) im Comet Assay mit Fischzellen im 2 h Ansatz nicht nachweisen ließen, wurde die Expositionszeit auf 20 h verlängert und alle Referenzsubstanzen mit dem veränderten Testprotokoll in 3 Wiederholungen auf Geno- und Cytotoxizität getestet (Abb. 31 und 32 zeigen die Unterschiede der beiden Expositionszeiten am Beispiel von Benzo[a]pyren). Die

Testansätze mit den indirekt wirkenden Carcinogenen *2-Acetylaminofluoren*, *Benzo[a]pyren* sowie *Dimethylnitrosamin* wurden mit exogener Aktivierung durch einen S9-Mix (CCR, Roßdorf) aus Arochlor-stimulierten Ratten, die Ansätze mit *Nitrofurantoin* und *4-Nitroquinolin-N-oxid* ohne exogene Aktivierung durchgeführt. Die Befunde sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

Zusätzlich wurden als direkt wirkendes, alkylierendes Gentoxin *N-Methyl-N-Nitro-Nitrosoguanidin* sowie die Wirkung von UV C-Strahlen auf primäre Hepatocyten des Zebrafärbings untersucht. Die Daten werden als Tail Moment angegeben; ein signifikanter Unterschied liegt vor, wenn nach dem ANOVA ON RANKS nach Kruskal-Wallis in Kombination mit dem Dunnett's Test ein p-Wert < 0,05 erreicht wird.

In den getesteten Konzentrationsbereichen konnte im Fluoresceindiacetat-Assay für keine der getesteten Monosubstanzen Cytotoxizität nachgewiesen werden (Tab. 7 und 8).

**Tab. 7:** Cytotoxizitätsbestimmung mit dem Fluoresceindiacetat-Assay: Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebrafärbing

	<i>2-Acetylaminofluoren</i>	<i>Benz[a]pyren</i>	<i>Dimethylnitrosamin</i>	<i>Nitrofurantoin</i>	<i>4-Nitroquinolin-N-oxid</i>	<i>N-Methyl-N-Nitro-Nitrosoguanidin</i>	UV C 254 nm
Kontrolle	100	100	100	100	100	100	100
Konz. 1	96.4 ± 5.2	94.2 ± 4.3	98.8 ± 6.3	92.1 ± 1.7	94.4 ± 3.2	95.1 ± 5.1	95.6 ± 4.9
Konz. 2	96.0 ± 2.3	93.6 ± 1.8	97.1 ± 2.5	91.4 ± 4.5	96.6 ± 2.8	95.9 ± 1.7	94.6 ± 6.0
Konz. 3	102.2 ± 6.4	92.7 ± 4.2	94.9 ± 5.7	90.5 ± 2.9	92.0 ± 5.7	90.5 ± 4.7	94.8 ± 6.7
Konz. 4	100.9 ± 2.8	90.3 ± 5.1	98.0 ± 3.1	93.5 ± 6.1	87.8 ± 4.8	91.2 ± 4.2	94.5 ± 3.7

Ausgewertet wurden 250 Zellen pro Konzentration, die Anzahl lebender Zellen in der Kontrolle wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Angabe lebender Zellen in den einzelnen Konzentrationen in Prozent relativ zur Kontrolle. Daten als Mittelwerte aus 3 Experimenten.

**Tab. 8:** Cytotoxizitätsbestimmung mit dem Fluoresceindiacetat-Assay: Belastung von isolierten Kiemenzellen aus dem Zebrafärbing

	<i>2-Acetylaminofluoren</i>	<i>Benzo[a]pyren</i>	<i>Dimethylnitrosamin</i>	<i>Nitrofurantoin</i>	<i>4-Nitroquinolin-N-oxid</i>
Kontrolle	100	100	100	100	100
Konz. 1	94.7 ± 4.3	94.5 ± 4.4	95.4 ± 5.6	93.7 ± 6.8	95.1 ± 4.9
Konz. 2	97.2 ± 4.6	94.4 ± 4.8	94.9 ± 9.9	92.2 ± 4.5	94.7 ± 1.4
Konz. 3	99.8 ± 4.8	97.1 ± 4.0	89.3 ± 3.2	91.6 ± 6.9	90.8 ± 7.4
Konz. 4	98.7 ± 5.9	90.2 ± 4.6	93.3 ± 4.3	91.5 ± 6.0	86.7 ± 2.9

Ausgewertet wurden 250 Zellen pro Konzentration, die Anzahl lebender Zellen in der Kontrolle wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Angabe lebender Zellen in den einzelnen Konzentrationen in Prozent relativ zur Kontrolle. Daten als Mittelwerte aus 3 Experimenten.

**Tab. 9:** LOEC-Werte für Genotoxizität der Referenzsubstanzen im *In vitro*-Ansatz mit dem Comet-Assay nach 20 h-Exposition

	<i>2-Acetyl- amino- fluoren</i>	<i>Benzo- [a]pyren</i>	<i>Dimethyl- nitros- amin</i>	<i>Nitro- furan- toin</i>	<i>4-Nitro- quinolin- N-oxid</i>	<i>N-Methyl-N'- Nitro-N-Nitroso- guanidin</i>	<i>UV C 254 nm</i>
Höchste Konz. im Test [mg/L]	223,3	252,2	74,08	238,2	1,9	1	16 min
Genotoxizität							
Hepatocyten	k.E.	k.E.	k.E.	2,38	0,0019	0,1	1 min
Hepatocyten + S9	2,23	0,252	0,074	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Kiemenzellen	n.g.	n.g.	n.g.	2,38	0,0019	n.g.	n.g.
Kiemenzellen + S9	k.E.	0,252	k.E.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.

Daten als niedrigste Konzentration in mg/L, ab der nach ANOVA ON RANKS (Kruskal-Wallis in Kombination mit dem Dunett's Test) ein signifikanter Unterschied des Tail Moments ( $p < 0,05$ ) gegenüber der unbelasteten Kontrolle erreicht wird.

k.E. kein Effekt (kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle)

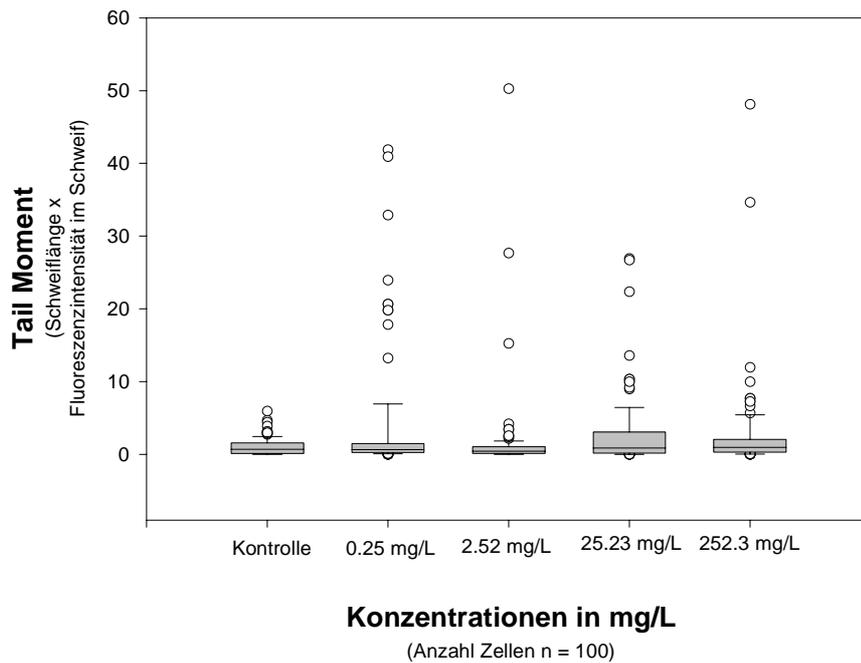
n.g. nicht getestet, da eine Aktivierung dieser Substanzen über P450 nicht zu erwarten ist.

Aus der Gruppe der indirekt wirkenden Gentoxine wies *2-Acetylaminofluoren* nur in Hepatocyten eine dosisabhängige Wirkung (Abb. 33) auf; die Kiemenzellen zeigten bis zur höchsten getesteten Konzentration keinen signifikanten Unterschied in den Tail Moment-Werten zur Kontrolle (Abb. 34). Im Gegensatz dazu konnten genotoxische Effekte durch Exposition mit *Benzo[a]pyren* in beiden Zellsystemen aufgezeigt werden, wobei die Kiemenzellen eine stärkere Reaktion als die Hepatocyten zeigten (Abb. 35, 36); dieses trat erst bei höheren Konzentrationen auf, so daß die unterschiedliche Reaktion der beiden Zelltypen keinen Einfluß auf den LOEC-Wert hatte, der für beide Systeme bei 0.252 mg/L lag. Auch *Dimethylnitrosamin* zeigte genotoxische Effekte nur bei Hepatocyten (Abb. 37), die allerdings nur schwach ausgeprägt waren und keine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigten, während in Kiemenzellen keine Reaktion detektiert werden konnte (Abb. 38).

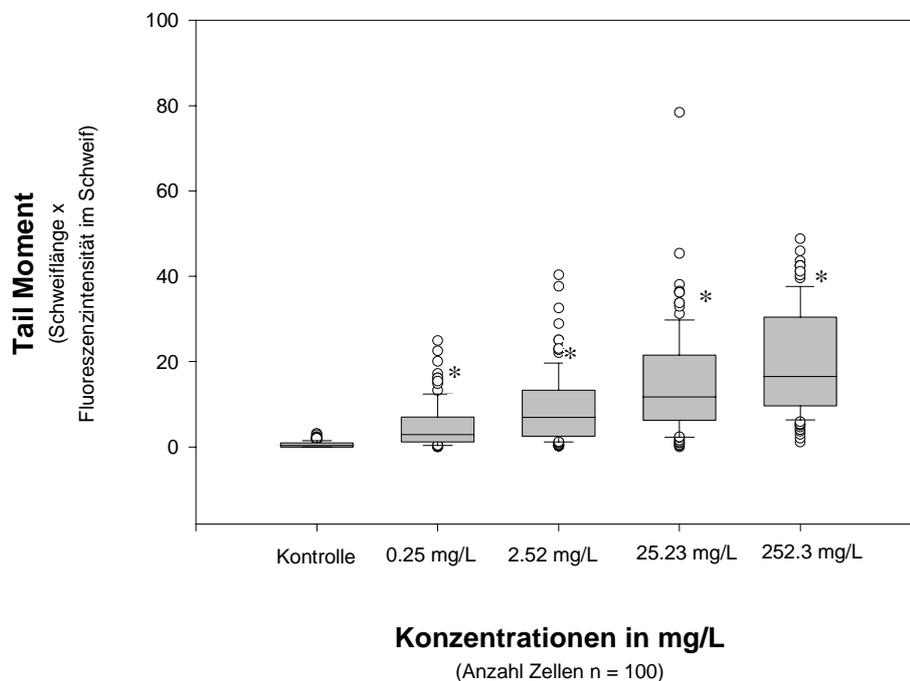
Nach Belastung mit  $H_2O_2$  für 20 h konnte keine DNA-Fragmentierung mehr beobachtet werden, da es sich bei der Untersuchungssubstanz aber um eine sehr instabile Verbindung handelt, die für längere Expositionszeiten nicht geeignet ist, wurden keine weiteren Versuche durchgeführt.

Die direkt wirkenden Carcinogene *N-Methyl-N'-Nitro-Nitrosoguanidin*, *Nitrofurantoin* und *4-Nitroquinolin-N-oxid* zeigten einen deutlichen, dosisabhängigen genotoxischen Effekt. Ein Vergleich der Daten zum Ausmaß der DNA-Fragmentierung bei Hepatocyten und Kiemenzellen zeigte, daß die Belastung sowohl mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* (Abb. 41, 42), als auch mit *Nitrofurantoin* (Abb. 39, 40) bei niedrigen Konzentrationen eine geringfügig stärkere Reaktion in den Kiemenzellen auslöste, die sich jedoch nicht auf die LOEC auswirkte (Tab. 9). *N-Methyl-N'-Nitro-Nitrosoguanidin* wurde nur mit Hepatocyten getestet und zeigte hier eine deutliche dosis-abhängige DNA-Fragmentierung (Abb. 43), dieses jedoch erst bei deutlich höheren Konzentrationen als *4-Nitroquinolin-N-oxid*.

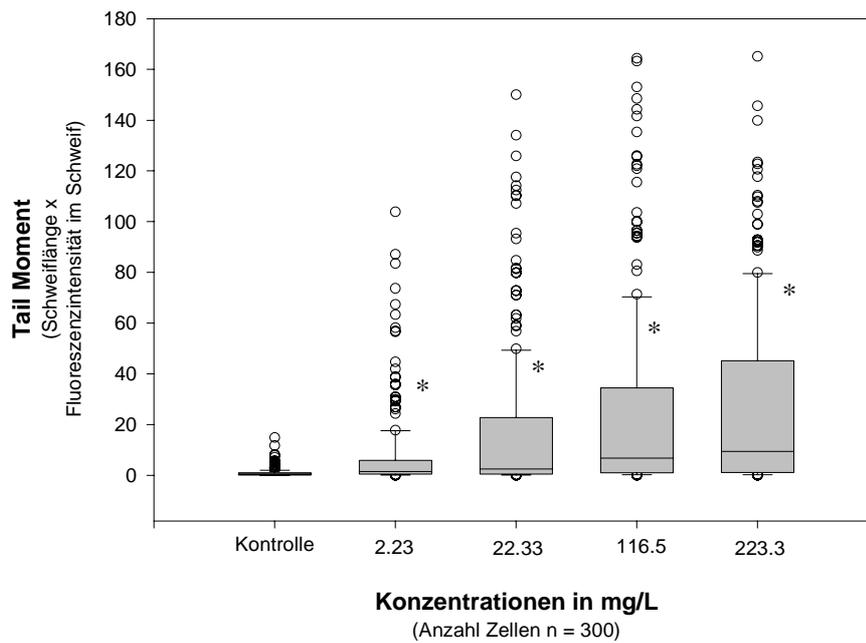
Auch mit verschiedenen Zeiten einer UV C-Belastung primärer Hepatocyten aus dem Zebraäbrbling konnte eine Dosis-Wirkungsbeziehung bezüglich des Endpunkts DNA-Fragmentierung beobachtet werden (Abb. 44).



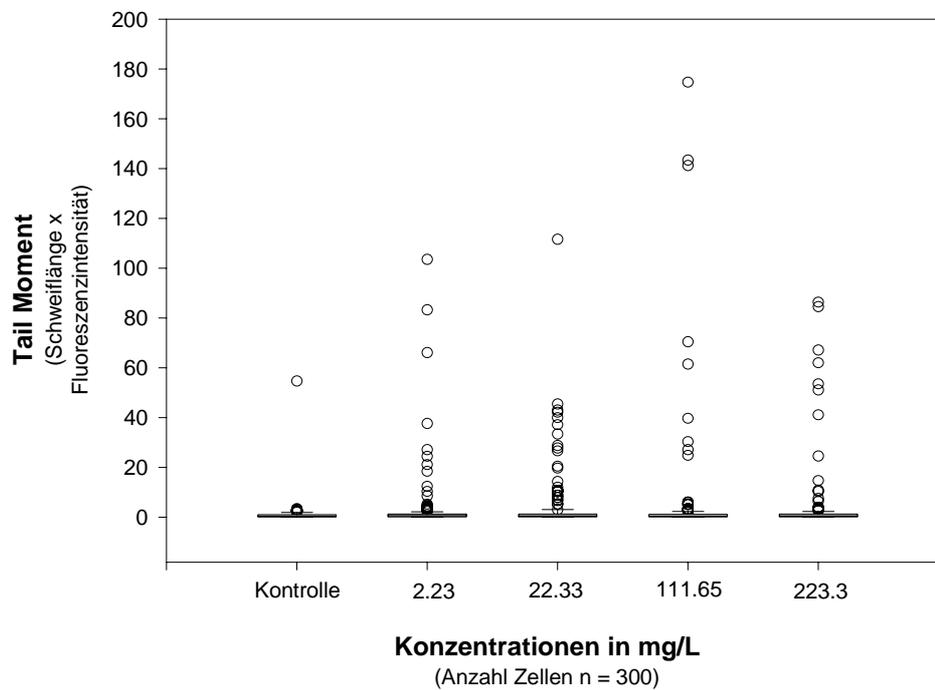
**Abb. 31:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebrafärblich mit *Benzo[a]pyren* für 2 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus einem Testansatz. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 Gelen pro Konzentration.



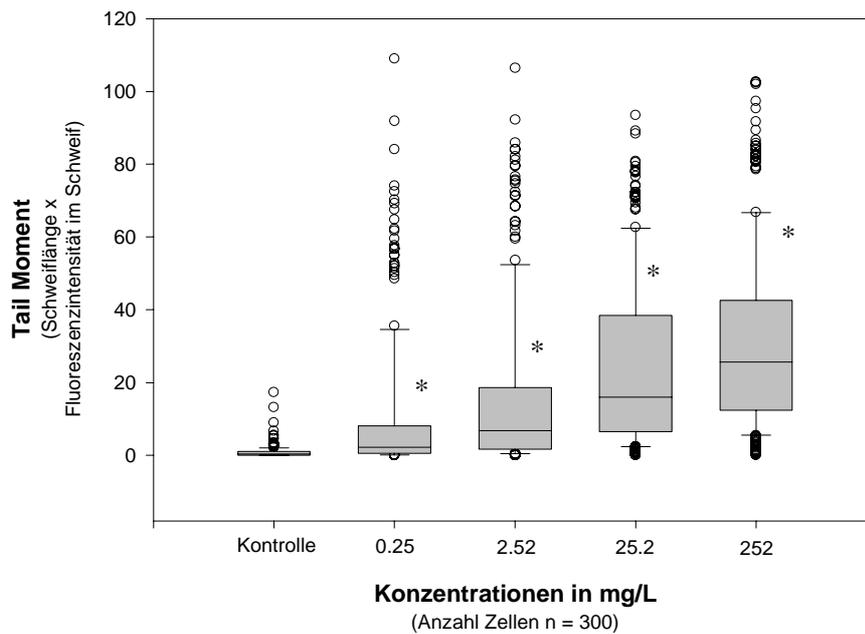
**Abb. 32:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebrafärblich mit *Benzo[a]pyren* für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus einem Testansatz. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 Gelen pro Konzentration. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett*-Methode ( $p < 0,05$ ).



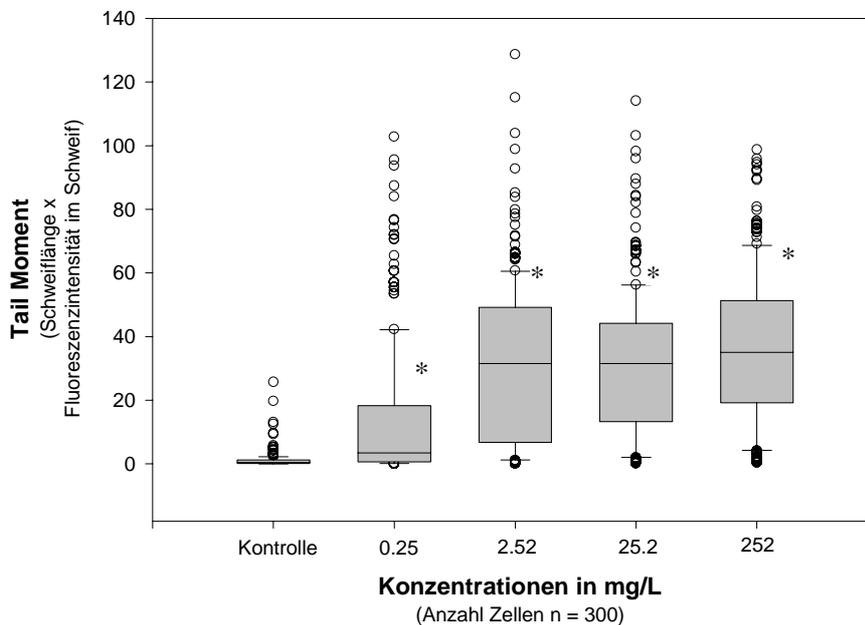
**Abb. 33:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebrafisch mit 2-Acetylaminofluorene für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 3 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett*-Methode ( $p < 0,05$ ).



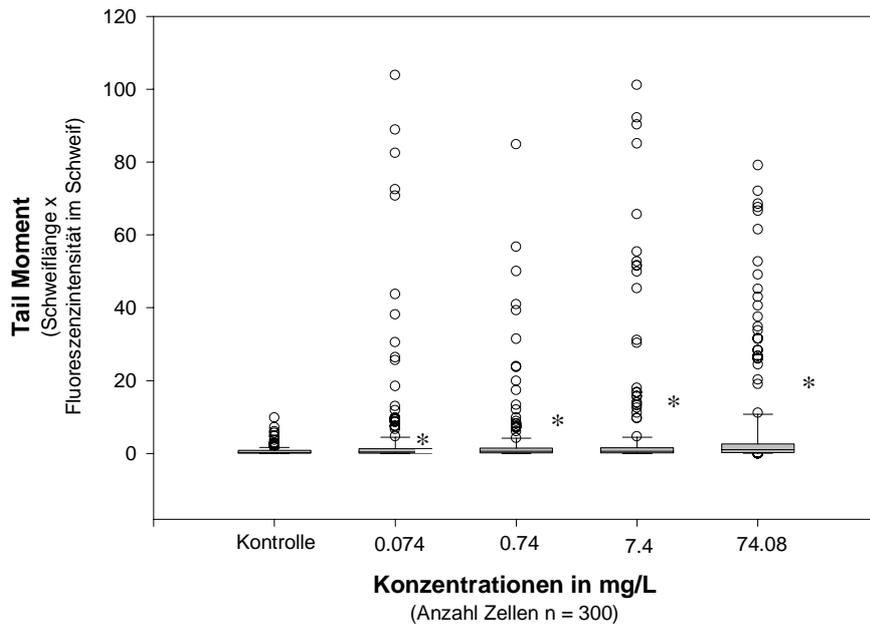
**Abb. 34:** Belastung von isolierten Kiemenzellen aus dem Zebrafisch mit 2-Acetylaminofluorene für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 3 Testansätzen



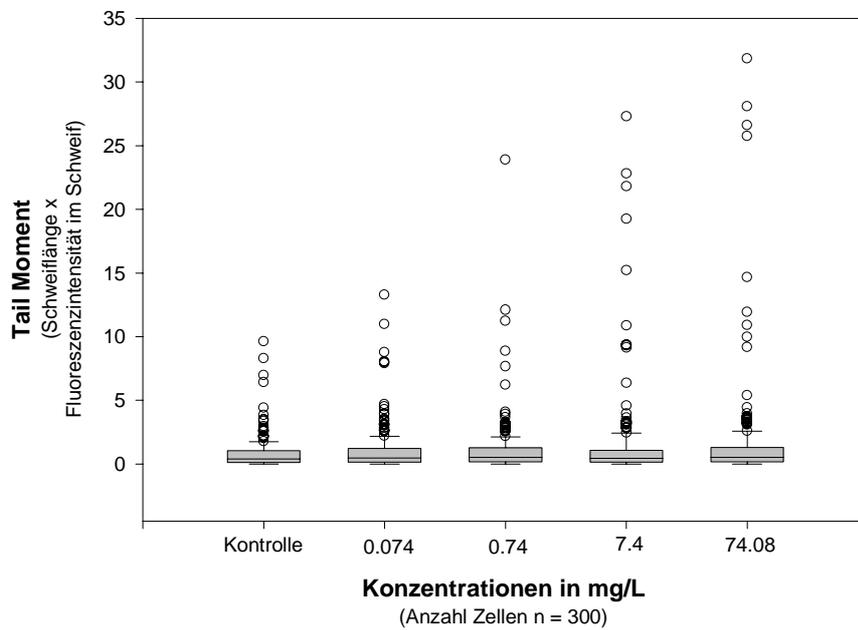
**Abb. 35:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebrafärbling mit *Benzo[a]pyren* für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 3 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett*-Methode ( $p < 0,05$ ).



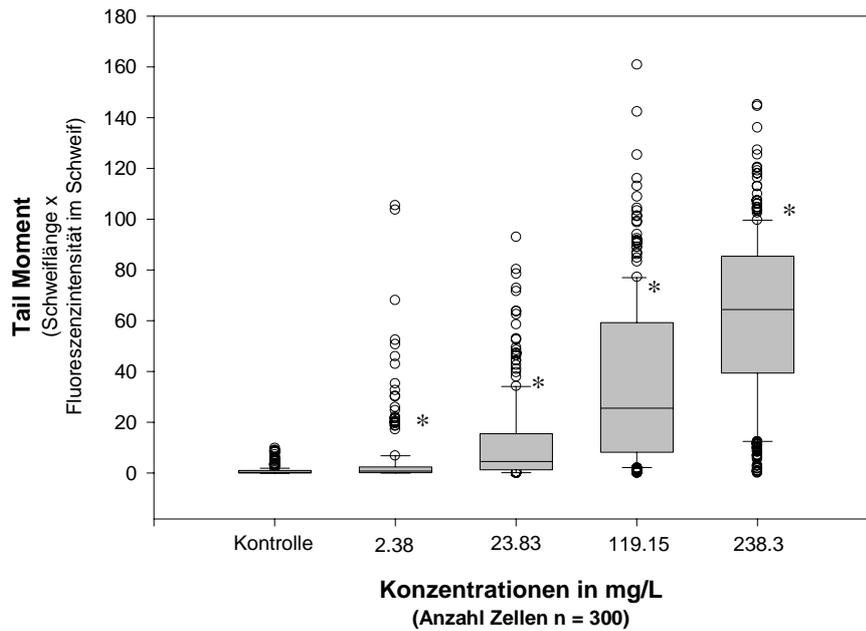
**Abb. 36:** Belastung von isolierten Kiemenzellen aus dem Zebrafärbling mit *Benzo[a]pyren* für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 3 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett*-Methode ( $p < 0,05$ ).



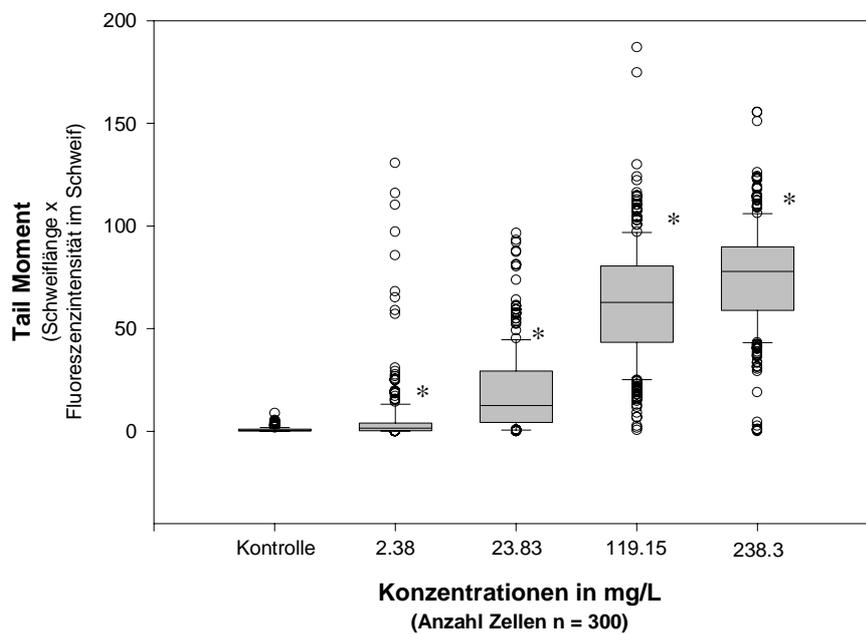
**Abb. 37:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling mit *Dimethylnitrosamin* für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 3 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett-Methode* ( $p < 0,05$ ).



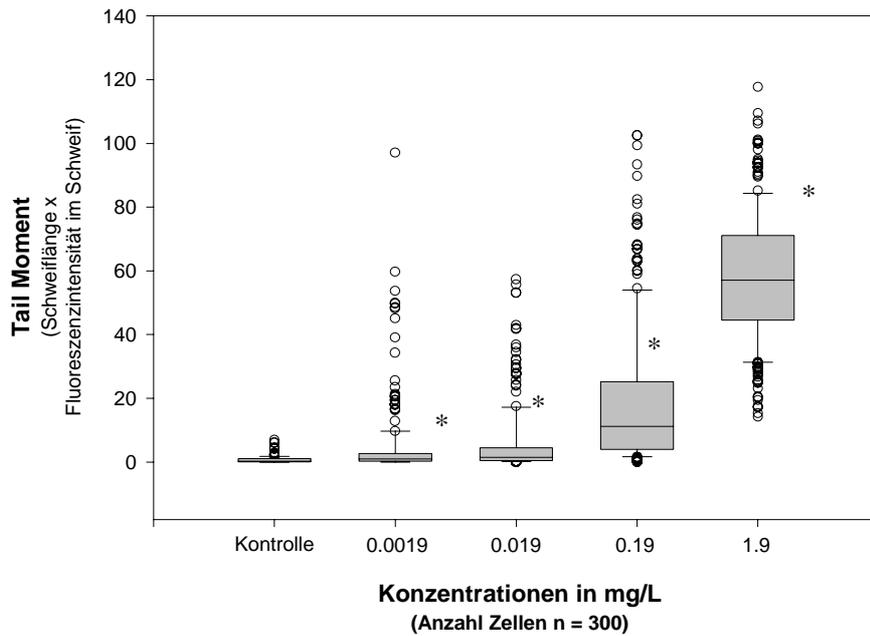
**Abb. 38:** Belastung von isolierten Kiemenzellen aus dem Zebraärbling mit *Dimethylnitrosamin* für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 3 Testansätzen



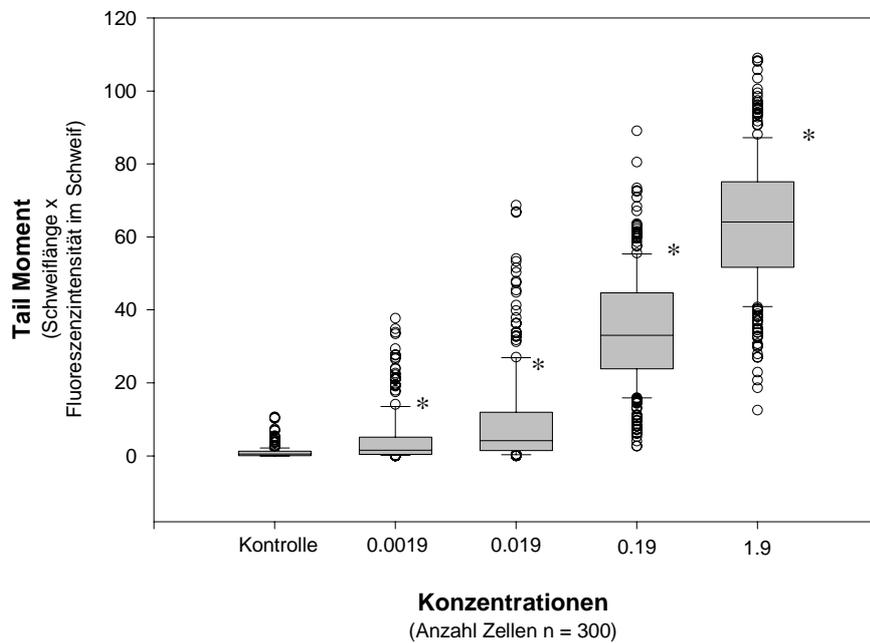
**Abb. 39:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebraabärbling mit *Nitrofurantoin* für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 3 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett-Methode* ( $p < 0,05$ ).



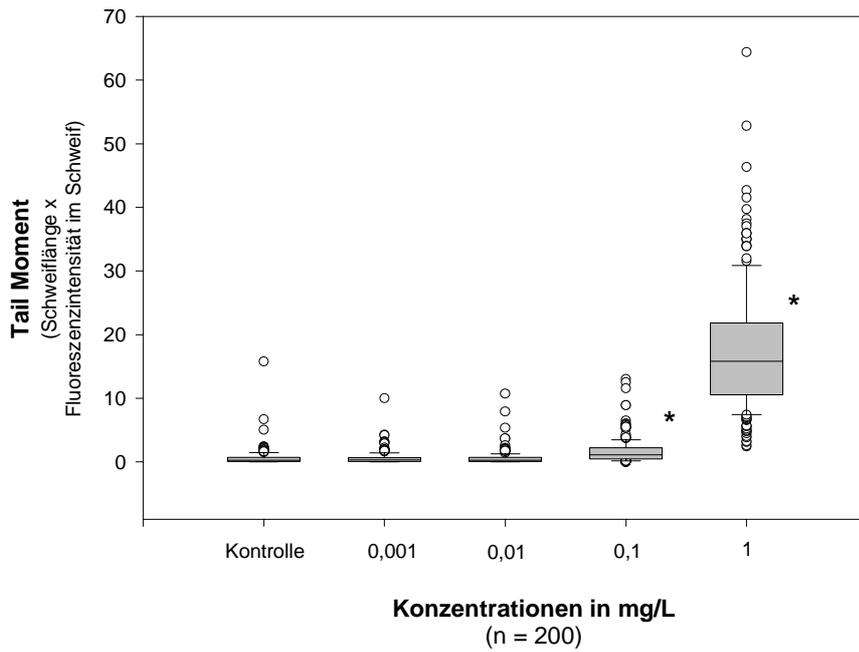
**Abb. 40:** Belastung von isolierten Kiemenzellen aus dem Zebraabärbling mit *Nitrofurantoin* für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 3 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett-Methode* ( $p < 0,05$ ).



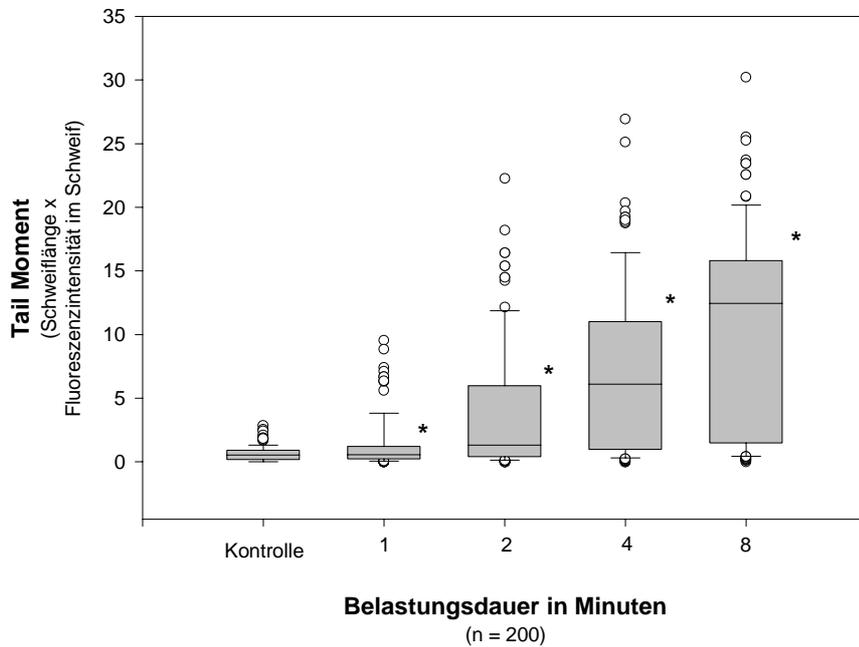
**Abb. 41:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebrafärbling mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 3 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett*-Methode ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 42:** Belastung von isolierten Kiemenzellen aus dem Zebrafärbling mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 3 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett*-Methode ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 43:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling mit *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* für 20 h; graphische Darstellung umfaßt Daten aus 2 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnett-Methode* ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 44:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling mit *UV C* (Wellenlänge 254 nm); graphische Darstellung umfaßt Daten aus 2 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnett-Methode* ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.7 *In vivo*-Untersuchungen am Zebraärbling (*Danio rerio*)

#### 3.1.7.1 Optimierung des Testprotokolls

Die folgenden Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn A. Froschauer durchgeführt. Nach der Filtration und mechanischen Vereinzeln der Zellen (vgl. 3.1.4) enthielten die Zellsuspensionen viele Zelltrümmer, die durch Zentrifugation möglichst quantitativ von den Zellen getrennt werden sollten. Der FDA Assay (vgl. 2.7.1) machte an diesem Punkt der Isolation viele Zellen mit zerstörter, aufgerissener Membran und frei in der Suspension flottierende Zellkerne sichtbar, so daß der Zentrifugation große Bedeutung beizumessen ist. Experimente mit unterschiedlichen Zentrifugationszeiten und g-Zahlen lieferten für Leber- und Kiemenzellen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich ihrer optimalen Behandlung:

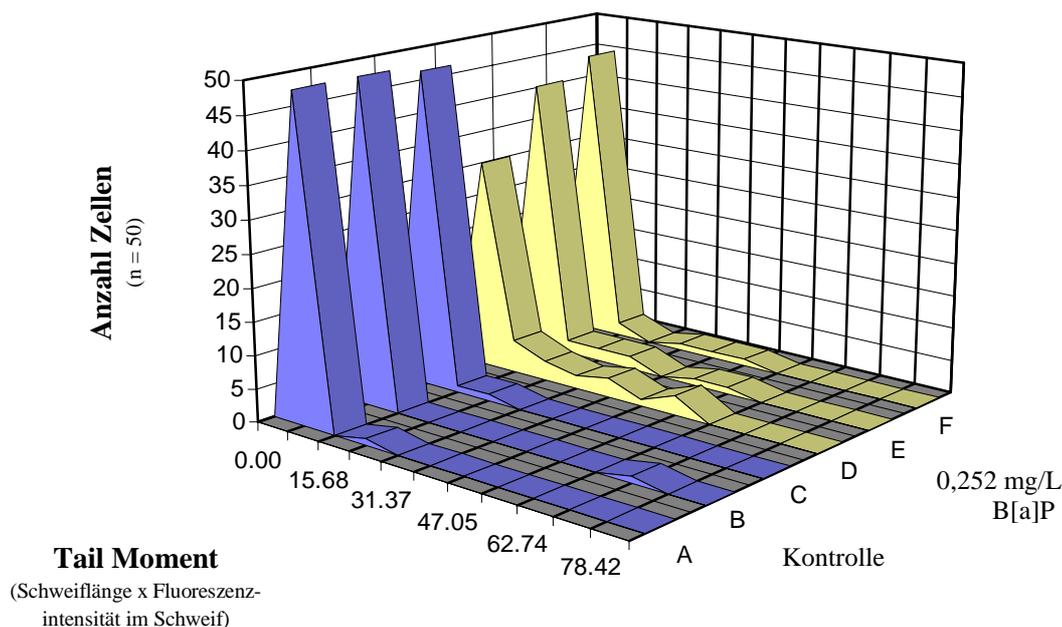
Die Leberzellen bildeten während der Zentrifugation kompaktere Pellets als die Kiemenzellen und waren somit leichter zu verarbeiten. Die Zentrifugationsparameter wurden von 200 g über 10 min schrittweise auf 110 g über 5 min vermindert, was die Zellausbeute proportional verringerte, aber die Trennung der Zellen von den Zelltrümmern verbesserte. Die Zellausbeute nach zwei Zentrifugationsschritten mit 110 g über 5 min sank zwar um 90 %, lieferte aber noch ausreichend viele Zellen zur Durchführung des Comet Assays (50.000/mL).

Die Kiemenzellen bildeten während der Zentrifugation weniger kompakte Pellets als die Leberzellen und zeigten eine stark verminderte Zellausbeute. Minimal war eine Beschleunigung von 180 g für 8 Minuten notwendig, um die Zellen nicht quantitativ zu verlieren.

Nach diesen Ergebnissen wurden im Standardprotokoll für beide Zellarten Zentrifugationsparameter von 200 g über 10 min im ersten Zentrifugationsschritt (quantitative Erfassung der Zellen) und 180 g über 7 min im zweiten Zentrifugationsschritt (verbesserte Aufreinigung) etabliert. So konnte bei gleichzeitiger Zentrifugation eine ausreichend gute Aufreinigung der Leberzellen und bestmögliche Aufreinigung der Kiemenzellen erreicht werden. Im Gegensatz zum *In vitro*-Ansatz ist die getrennte Zentrifugation der Primärzellen, obwohl auch hier wünschenswert, aus versuchstechnischen Gründen nicht möglich.

#### 3.1.7.2 Vorinduktion der Versuchsfische mit $\beta$ -Naphthoflavon

Sechs Zebraärblinge wurden 5 Tage vor Beginn des Expositionsversuch mit 15 mg/kg Körpergewicht  *$\beta$ -Naphthoflavon* vorinduziert. Keiner der Fische zeigte nach der Injektion mit dem in Fischleberöl gelösten Induktor makroskopisch sichtbare Beeinträchtigungen oder Verhaltensänderungen. Die Auswertung der Comet Assay-Ergebnisse zeigte aber deutliche Schwankungen in der Reaktion der Tiere. Während die Kontrollen mit Ausnahme von Fisch B, der leicht erhöhte Werte zeigte, ein recht einheitliches Bild zeigten und sich von nicht-vorinduzierten Kontrolltieren nicht unterschieden, unterschieden sich die mit *Benzo[a]pyren* belasteten Tiere im Bezug auf die DNA-Fragmentierung in den isolierten Hepatocyten doch erheblich (Abb. 45). Eine leichte Verstärkung des Effekts gegenüber nicht vorinduzierten mit *Benzo[a]pyren* belasteten Tieren konnte festgestellt werden, für Routineuntersuchungen ist diese Technik allerdings nicht zu empfehlen, außerdem sollte gerade bei *In vivo*-Versuchen auch ethischen Gesichtspunkten, wie dem, den Leidensdruck der Versuchstiere soweit nur möglich zu minimieren, Rechnung getragen werden.



**Abb. 45:** DNA-Fragmentierung in isolierten Hepatocysten im Comet-Assay nach *In vivo*-Belastung von mit  $\beta$ -Naphthoflavin vorinduzierten Zebrabärblingen mit 0,252 mg/L *Benzo[a]pyren* für 3 Tage (A-C: Kontrolltiere; D-F: mit *Benzo[a]pyren* belastet)

### 3.1.7.3 Induktion von DNA-Schäden in Hepatocysten und Kiemenzellen durch *In vivo*-Belastung adulter Zebrabärblinge mit Monosubstanzen

Der  $LC_{50}$ -Wert von *2-Acetylaminofluoren* schwankte in vier Experimenten zwischen 4,4 und 11,0 mg/L und zeigte damit eine beträchtliche akute Toxizität an. Nachdem im ersten Experiment bei Konzentrationen von 1,1 bis 11,0 mg/L keine akut toxischen Wirkungen beobachtet worden waren, führte die Exposition gegenüber 44 mg/L innerhalb weniger Stunden zum Tod der Tiere. Die zweite Bestimmung der akuten Toxizität ergab eine konzentrationsabhängige Toxizität von *2-Acetylaminofluoren* auf die Zebrabärblinge schon bei 4,4 mg/L nach zwei Tagen (Tab. 10). Im abschließenden Versuch konnte keine toxische Wirkung im Bereich von 1,1 bis 4,4 mg/L nachgewiesen werden. Genotoxische Effekte waren in den Konzentrationen, die sich unterhalb des akuten Toxizitätsbereich bewegten, nicht feststellbar.

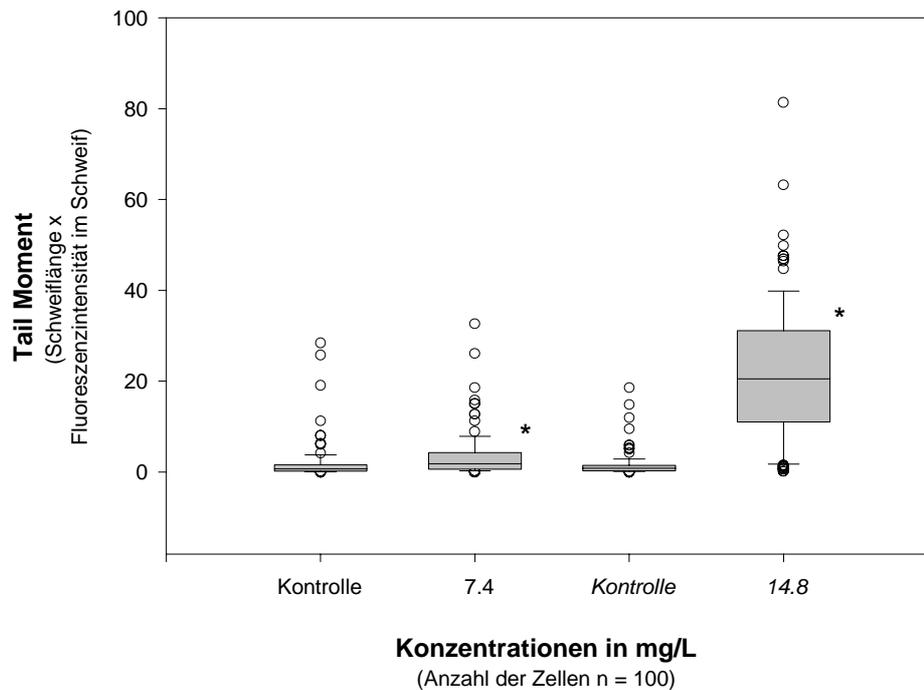
**Tab. 10:** Akute Toxizität von *2-Acetylaminofluoren*; angegeben ist der Zeitpunkt, zu dem mindestens ein Zebrabärbling abnormales Verhalten zeigte (Apathie, Luftschnappen oder Rückenlage)

Konzentration [mg/L]	Toxische Wirkung	Zeitpunkt nach Expositionsbeginn
27,5	ja	1 h
16,5	ja	2h
8,3	ja	24 h
4,4	ja	48 h
2,2	nein	72 h

Daten aus 3 Experimenten, pro Konzentration wurden jeweils 3 Fische eingesetzt.

*Benzo[a]pyren* zeigte in drei unabhängigen Experimenten keine genotoxische Wirkung auf Leber- und Kiemenzellen von *Danio rerio*. Die höchste Konzentration im Test betrug 10.0 mg/L (Tab.11).

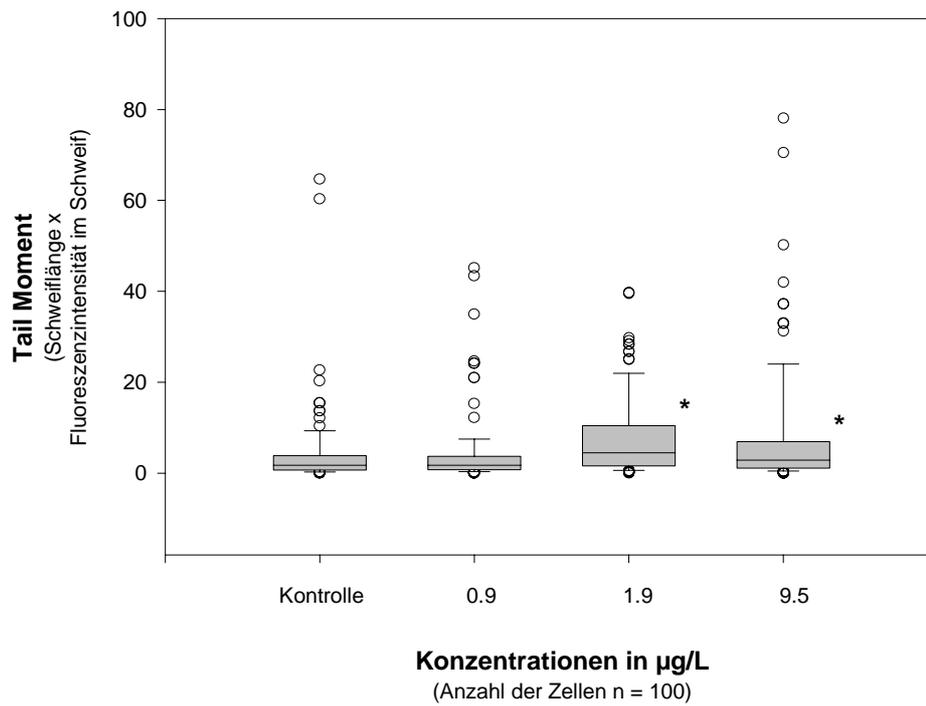
*Dimethylnitrosamin* induzierte in zwei unabhängigen Experimenten ab 7,4 bzw. 14,8 mg/L deutliche DNA-Schäden in Leberzellen von *Danio rerio* (Abb. 46), zeigte aber keine Wirkung auf die Kiemenzellen. Die konzentrationsabhängige Schädigung der DNA der Leberzellen konnte reproduziert werden, während die Kiemenzellen bis 22,3 mg/L keine DNA-Schäden aufwiesen.



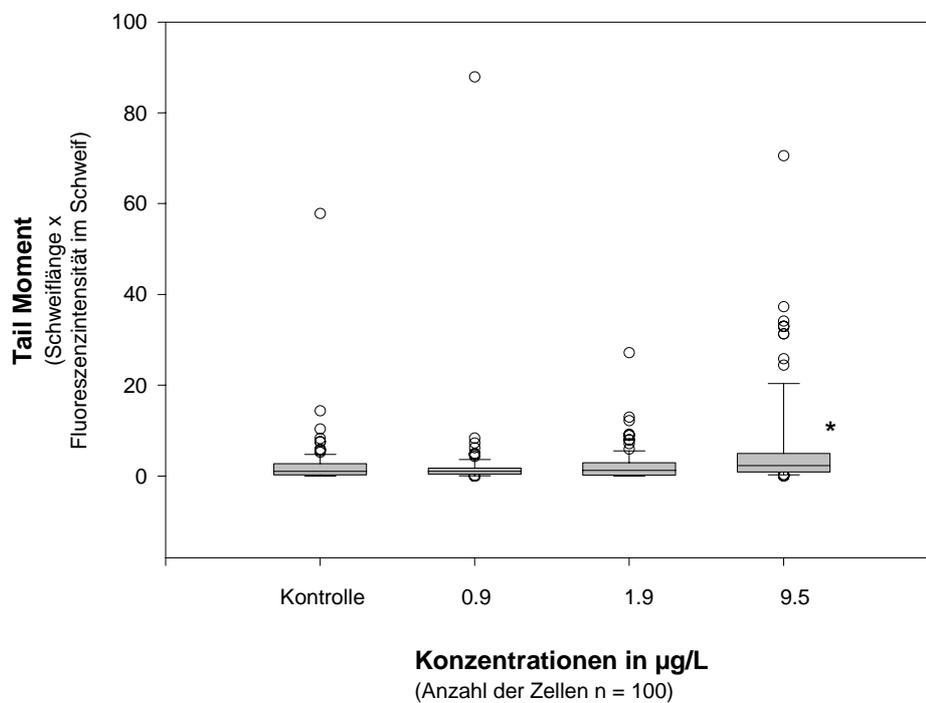
**Abb. 46:** Comet-Assay mit isolierten Hepatocyten von *Danio rerio* nach dreitägiger *In vivo*-Exposition gegenüber *Dimethylnitrosamin*; Daten aus zwei Experimenten. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* ( $p < 0,05$ ) in Kombination mit der *Dunnnett*-Methode des paarweisen Vergleichs.

*Nitrofurantoin* zeigte in zwei unabhängigen Experimenten keine genotoxische Wirkung auf Leber- und Kiemenzellen von *Danio rerio*. Die höchste Konzentration im Test betrug 40.0 mg/L.

*4-Nitroquinolin-N-Oxid* zeigte genotoxische Wirkung auf Leber- und Kiemenzellen ab 9,5  $\mu\text{g/L}$  (Abb. 47, 48). Die Kiemenzellen wiesen im ersten Versuch bei 1,9  $\mu\text{g/L}$  stärkere DNA-Schäden auf als bei 9,5  $\mu\text{g/L}$ , dieses Ergebnis konnte jedoch nicht reproduziert werden; im zweiten Experiment waren die Kiemenzellen bei Konzentrationen zwischen 0,9 und 3,8  $\mu\text{g/L}$  nicht geschädigt. Der Vergleich der Mediane von Leber- und Kiemenzellen bei einer Belastung von 9,5  $\mu\text{g/L}$  im ersten Experiment zeigte, daß das Ausmaß der Schädigung in beiden Organen sehr ähnlich war; in beiden Fällen waren die Median-Werte gegenüber der jeweiligen Kontrolle näherungsweise verdoppelt.



**Abb. 47:** Comet Assay mit isolierten Kiemenzellen von *Danio rerio* nach dreitägiger *In vivo*-Exposition mit 4-Nitroquinolin-N-Oxid; \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett*-Methode des paarweisen Vergleichs.



**Abb. 48:** Comet Assay mit isolierten Hepatocyten von *Danio rerio* nach dreitägiger *In vivo*-Exposition mit 4-Nitroquinolin-N-Oxid; \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett*-Methode des paarweisen Vergleichs.

**Tab. 11:** LOEC-Werte für die Genotoxizität der Monosubstanzen im Comet-Assay und akute Toxizität im *In vivo*-Ansatz mit Zebrafärbliingen

	<i>2-Acetyl-aminofluoren</i>	<i>Benzo[a]pyren</i>	<i>Dimethyl-nitrosamin</i>	<i>Nitro-furantoin</i>	<i>4-Nitroquinolin-N-oxid</i>
Höchste Konzentration im Test [mg/L]	11.0	10.0	22.3	40.0	0.0095
Genotoxizität					
Hepatocyten	k.E.	k.E.	7.4	k.E.	0.0095
Kiemenzellen	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	0.0095
Akute Toxizität	> 4,4	⇐	Keine Toxizität	⇒	0.19

Daten als niedrigste Konzentration in mg/L, ab der nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode) ein signifikanter Unterschied des Tail Moments ( $p < 0,05$ ) gegenüber der unbelasteten Kontrolle erreicht wird. k. E. = kein Effekt.

### 3.1.8 Untersuchungen von Zebrafärbliingen nach Belastung mit genotoxischen Substanzen in Life-Cycle-Experimenten

Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Nagel der TU Dresden durchgeführt. Die 2 Life-Cycle-Experimente wurden von Herrn Dipl.-Biol. Markus Diekmann durchgeführt. Als genotoxische Substanzen wurden *Benzo[a]pyren* und *4-Nitroquinolin-N-oxid* verwendet. Das *Benzo[a]pyren*-Experiment wurde bis auf die Auswertung komplett in Dresden durchgeführt, für die beiden Durchgänge mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* wurden Fische über Nacht per Express nach Heidelberg verschickt.

#### 3.1.8.1 Benzo[a]pyren

In den untersuchten Hepatocyten aus den belasteten Zebrafärbliingen konnte sowohl für die Weibchen als auch für die Männchen kein signifikanter Unterschied in den Tail Moment-Werten zwischen Kontrollen und *Benzo[a]pyren*-Gruppen nachgewiesen werden (Tab. 12). Im Unterschied zu den Hepatocyten zeigten sich bei der Untersuchung der Kiemenzellen signifikante Unterschiede zu den Kontrollen. Hierbei waren die Effekte bei den Weibchen deutlicher ausgeprägt.

#### 3.1.8.2 4-Nitroquinolin-N-oxid

In beiden Experimenten konnte in den höheren Konzentrationen für die untersuchten Hepatocyten ein signifikanter Unterschied im Grad der DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden, im Experiment 1 ab 2,7 µg/L und in der Wiederholung schon ab 0,9 µg/L (Tab. 13, Abb. 49). Das Ausmaß der DNA-Fragmentierung in allen untersuchten Konzentrationen ist aber als gering einzustufen.

Im Vergleich der beiden Versuche differierte das Ausmaß der DNA-Fragmentierung bei den untersuchten Kiemenzellen am deutlichsten. Während im Experiment 1 schon die Konzentration mit 0,3 µg/L *4-Nitroquinolin-N-oxid* nicht nur signifikant verschieden von der Kontrolle war, sondern schon einen deutlichen DNA-Schaden aufzeigte, so waren im Experiment 2 nur die beiden höchsten Konzentrationen signifikant verschieden von der Kontrolle. Sie wiesen einen deutlichen, jedoch im Vergleich zum Experiment 1 geringer ausgeprägten DNA-Schaden auf (Tab. 13, Abb. 50).

Im Vergleich der beiden Zellsysteme reagierten die Kiemenzellen auf die Belastung mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* mit einer deutlicheren DNA-Fragmentierung, obwohl die Hepatocyten im Experiment 2 schon eine Konzentration niedriger signifikante Unterschiede zur Kontrolle zeigen. Die deutlichen Unterschiede in der Reaktion der Kiemenzellen (*die Werte für die Hepatocyten liegen sehr eng beieinander*) zwischen den beiden Experimenten legen die Vermutung nahe, daß die Tiere durch die Versendung einer schwer einzuschätzenden weiteren Variablen, dem Transportstress, ausgesetzt wurden. Dieses manifestierte sich in dem direkt exponierten Organ Kieme deutlich, aber bei zwei Versendungen in unterschiedlichem Ausmaß.

**Tab. 12:** Tail Moment (Produkt aus Schweiflänge x Fluoreszenzintensität im Schweif) als Meßparameter für Schweifbildung (DNA-Fragmentierung) bei Hepatocyten und Kiemenzellen aus mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* belasteten Zebraabärlingen

	Hepatocyten		Kiemenzellen	
	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
Kontrolle	0.725 <sup>2</sup>	0.659	0.27 (**)	0.311
DMSO-Kontrolle	0.429	0.584	0.412*	0.435
3 ng/L <sup>1</sup>	1.08	0.779	0.732*(**)	0.291
18 ng/L	0.69	0.632	0.948*(**)	0.547*(**)
193 ng/L	1.026	0.929	1.086*(**)	0.553*(**)

<sup>1</sup> Ist-Konzentrationen im Life-Cycle-Experiment

<sup>2</sup> Median der *Tail Moment*-Werte von 100 vermessenen Zellen pro Konzentration

\* Median signifikant verschieden ( $p < 0.05$ ) von der Kontrolle (*ANOVA ON RANKS*, Sigma Stat 2.03)

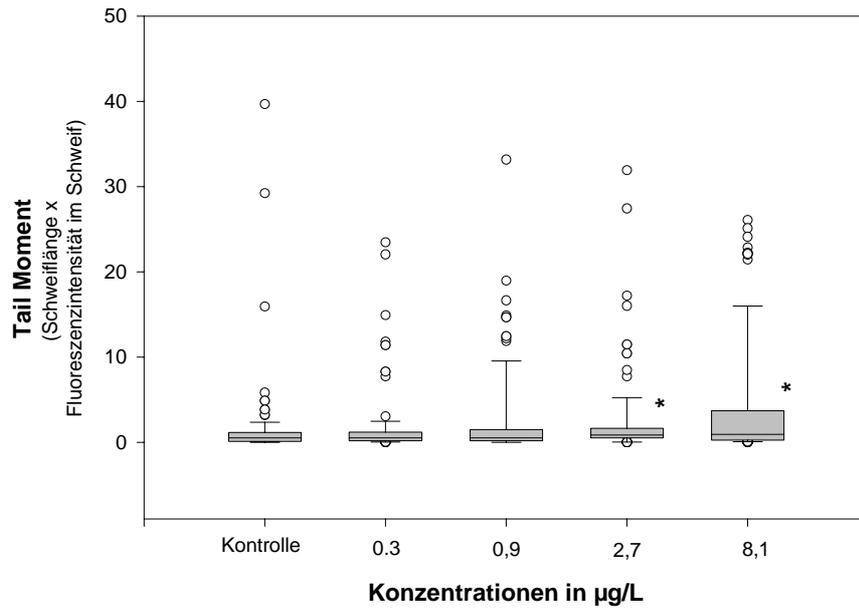
(\*\*) Median signifikant verschieden von der DMSO-Kontrolle

**Tab. 13:** Tail Moment (Produkt aus Schweiflänge x Fluoreszenzintensität im Schweif) als Meßparameter für Schweifbildung (DNA-Fragmentierung) bei Hepatocyten und Kiemenzellen aus mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* belasteten Zebraabärlingen

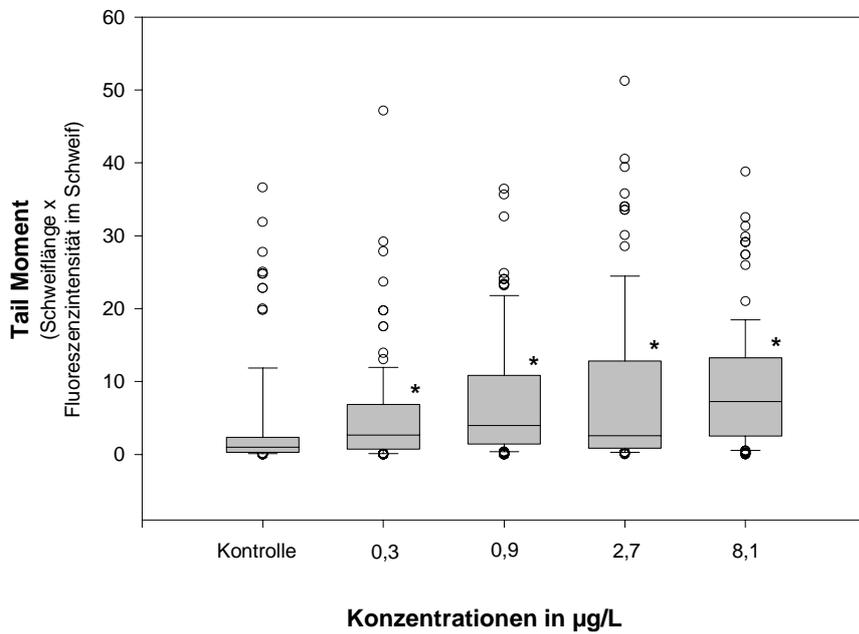
Tail Moment	Hepatocyten		Kiemenzellen	
	<i>Experiment 1</i>	<i>Experiment 2</i>	<i>Experiment 1</i>	<i>Experiment 2</i>
Kontrolle	0,522 <sup>1</sup>	0,25	0,98	0,41
0,3 µg/L	0,52	0,36	2,67*	0,46
0,9 µg/L	0,51	0,55*	3,98*	0,62
2,7 µg/L	0,87*	0,74*	2,57*	0,96*
8,1 µg/L	0,94*	0,92*	7,23*	1,58*

<sup>1</sup> Median der Tail Moment-Werte von 100 vermessenen Zellen pro Kontrolle bzw. Konzentration

\* Median der Tail Moment-Werte signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ) von der Kontrolle nach *ANOVA on ranks* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode (Sigma Stat 2.03))



**Abb. 49:** Experiment 1: Tail Moment isolierter Hepatocyten von Zebraabärblingen aus dem Life-Cycle-Experiment mit *4-Nitroquinolin-N-oxid*. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle mit  $p < 0,05$  nach ANOVA on ranks (Sigma Stat 2.03)



**Abb. 50:** Experiment 1: Tail Moment isolierter Kiemenzellen von Zebraabärblingen aus dem Life-Cycle-Experiment mit *4-Nitroquinolin-N-oxid*. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle mit  $p < 0,05$  nach ANOVA on ranks (Sigma Stat 2.03)

### 3.1.9 Voruntersuchungen zur genotoxischen Belastung von Wasserproben mit dem Comet Assay und primären Fischzellen

#### 3.1.9.1 Untersuchung einer nach EPA-Standard aufdotierten Wasserprobe unbekannter Zusammensetzung und Konzentration im Rahmen einer Ringanalyse

Die bisherigen Untersuchungen wurden mit bekannten genotoxischen Substanzen in definierten Konzentrationen durchgeführt. Zur Vorbereitung auf die Untersuchungen zu Genotoxizität in Freilandproben unbekannter Zusammensetzung wurden kodierte Wasserproben untersucht. Diese Wasserproben waren nach EPA-Standard aufdotiert mit der Leitsubstanz *4-Nitroquinolin-N-oxid* in unterschiedlichen Konzentrationen. Diese Untersuchungen wurden noch mit einer Expositionszeit von 2 h durchgeführt.

**Tab. 14:** Tail Moment-Werte (Median) von mit dotierten Wasserproben belasteten Primärzellen aus dem Zebrafisch

	Kontrolle	H1	H2	H3	H4
Hepatocyten	0.603	3.783*	1.156*	1.125*	0.819*
Kiemenzellen	0.507	4.017*	0.499	0.425	0.602

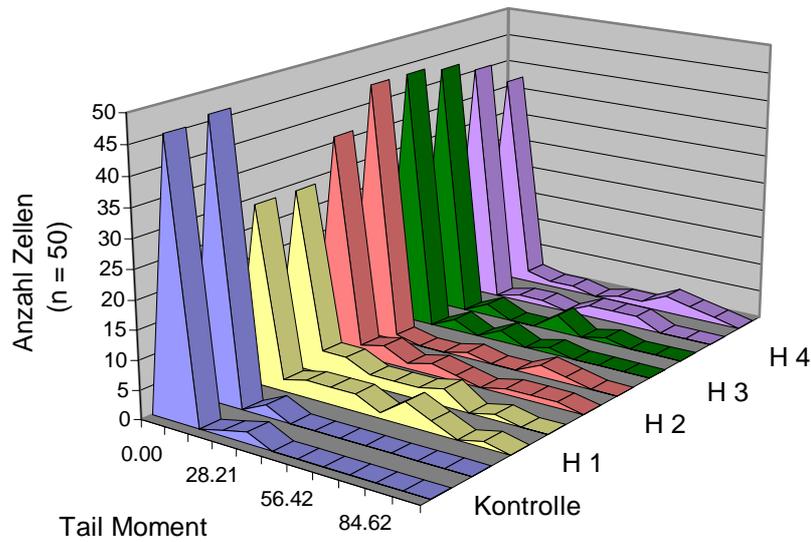
\* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach ANOVA on ranks in Kombination mit der Dunnett's Methode mit  $p < 0,05$  (Sigma Stat 2.03, Jandel Scientific).

Sowohl in Hepatocyten als auch in Kiemenzellen aus dem Zebrafisch zeigte die Wasserprobe H1 die mit Abstand stärkste genotoxische Wirkung im Comet Assay (Tab. 14 und Abb. 51). Nach den vorliegenden Daten wurde folgende Reihung bezüglich des genotoxischen Potentials der Proben vorgenommen:  $H1 > H2 > H3 > H4$ . Somit wurde von H1 eine Verdünnungsreihe hergestellt, um die genotoxische Wirkung verschiedener Verdünnungsstufen testen zu können (Tab. 15). Die tatsächliche Reihenfolge bezüglich der *4-Nitroquinolin-N-oxid*-Konzentrationen lautete  $H1 > H3 > H2 > H4$ . Wie Tabelle 15 zu entnehmen ist lagen die Tail Moment-Werte von H2 und H3 sehr dicht beieinander, die höchste Konzentration und die nicht mit 4-NQO aufdotierte Probe wurden zweifelsfrei erkannt.

**Tab. 15:** Tail Moment-Werte in Primärzellen aus dem Zebrafisch nach Belastung mit einer Verdünnungsreihe aus der Probe H 1, die sich im vorangegangenen Screening (Tab. 14) als die am stärksten genotoxischen Wasserprobe herausgestellt hatte

	Kontrolle	1 : 2	1 : 4	1 : 10	1 : 20
Hepatocyten	0.472	1.314*	0.959*	0.656	0.59
Kiemenzellen	0.416	0.52	0.473	0.649	0.526

Tail Moment-Werte als Median; \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach ANOVA-on-Ranks in Kombination mit der Dunnett's Methode mit  $p < 0,05$  (Sigma Stat 2.03, Jandel Scientific).



**Abb. 51:** Comet-Assay mit isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling, belastet mit aufdotierten Wasserproben für 2 h. Ausgewertet wurden 100 Zellen auf 2 verschiedenen Gelen.

### 3.1.9.2 Induktion von DNA-Schäden in Hepatocyten und Kiemenzellen durch *In vivo*-Belastung adulter Zebraärblinge mit aufdotierten Wasserproben

Die Wasserproben H1-H4 zeigten keine akute Toxizität im Verlauf der dreitägigen Exposition, d.h. die Fische zeigten keine erkennbaren Auswirkungen zusätzlichen Stresses und waren nach Versuchsablauf in einem guten Allgemeinzustand. Somit konnten alle Wasserproben *in vivo* unverdünnt getestet werden.

Auch in diesem Ansatz wurde die im Assay am stärksten ansprechende Wasserprobe ermittelt und in folgenden Tests ermittelt, bis zu welcher Verdünnungsstufe noch ein genotoxisches Potential nachgewiesen werden konnte (Tab. 16, 17). Im *In vivo*-Experiment zeigten die Kiemenzellen eine stärkere Reaktion auf die genotoxische Belastung als die Hepatocyten, die aber in der Verdünnungsreihe mit der Probe H1 nicht reproduziert werden konnte.

**Tab. 16:** Tail Moment-Werte von isolierten Primärzellen aus dem Zebraärbling nach dreitägiger *In vivo*-Belastung mit den aufdotierten Wasserproben H1 – H4

	Kontrolle	H1	H2	H3	H4
Hepatocyten	0.908	1.47*	0.637	1.194*	1.437*
Kiemenzellen	1.021	2.591*	1.223	1.806*	1.37

Tail Moment-Werte als Median; signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der Dunnett's Methode (Sigma Stat 2.03, Jandel Scientific)

**Tab. 17:** Tail Moment-Werte von isolierten Primärzellen aus dem Zebraärbling nach dreitägiger *In vivo*-Belastung mit Verdünnungen der aufdotierten Wasserproben H1

	Kontrolle	1 : 2	1 : 4	1 : 10
Hepatocyten	0.527	1.473*	1.259*	0.707*
Kiemenzellen	0.352	0.589	0.486	0.573

\* Tail Moment-Werte als Median; signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der Dunnett's Methode (Sigma Stat 2.03, Jandel Scientific)

Mit diesen Experimenten konnte die Eignung des Test für die Untersuchung von Wasserproben aufgezeigt werden. Die zu diesem Zeitpunkt parallel laufenden Untersuchungen mit den Referenzsubstanzen führten dann aber zu einer Verlängerung der Expositionszeit auf 20 h.

### 3.2 *In vitro*-Untersuchungen an Primärzellkulturen aus dem Zebraärbling nach Belastung mit Wasserproben aus Rhein, Elbe und Neckar

Beginnend mit dem Februar 1997, wurden jeden Monat im Wechsel entweder 4 Wasserproben von den Entnahmestellen am Rhein (Wahnbach-Talsperre, Karlsruhe, Köln und Düsseldorf) oder von den 3 Beprobungsstellen an der Elbe (Dessau/Mulde, Schmilka und Schnackenburg) auf ein mögliches genotoxisches Potential im Comet Assay mit Primärzellkulturen aus dem Zebraärbling untersucht. Im Anschluß wurden auch noch Wasserproben vom Neckar (Heidelberg, Wieblingen, Edingen, Neckarhausen, Ilvesheim) untersucht.

Die Wasserproben wurden in bis zu 3 Durchgängen hinsichtlich Geno- und Cytotoxizität getestet. Die Befunde zu den Hepatocyten-Untersuchungen sind in Tabelle 18 zusammengestellt, die Befunde aus den exemplarischen Untersuchungen mit den Kiemenzellen sind Tabelle 19 zu entnehmen. Eine Wasserprobe gilt in beiden Testsystemen als (genotoxisch) positiv, wenn sie in 2 unabhängigen Experimenten positiv getestet wurde; ist das Ergebnis der 2 Durchgänge je einmal positiv und negativ, so muß ein 3. Versuch durchgeführt werden. Der den statistischen Berechnungen zugrunde liegende Meßparameter ist das *Tail Moment* (Produkt aus Schweiflänge x Fluoreszenzintensität).

Trotz der Optimierung des Testsystems Comet Assay mit Primärzellkulturen und den bekannt genotoxischen Substanzen wurden mit den Wasserproben verschiedene Testvarianten nochmals überprüft. Weder Variationen in der Expositionsdauer (2 h vs. 20 h) noch unterschiedliche Verdünnungsschemata (Medium zu Wasserprobe) bis hin zum Direktansatz des Mediums mit der zu untersuchenden Wasserprobe führten zu unterschiedlichen Ergebnissen in den so untersuchten Proben. Deshalb wurde am Standardprotokoll mit 20 h Expositionszeit, S9-Supplementierung sowie Verdünnung eines fünf-fach-konzentrierten Mediums mit der entsprechenden Wasserprobe (entspricht ca. 70 % Anteil Wasserprobe) festgehalten. Als Positivkontrolle wurde eine mit 5 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 2 h belastete Zellgruppe mitgeführt. Diese Zellen entstammen der gleichen Isolation vom Vortag und wurden am nächsten Morgen 2 h vor Ende der Wasserproben-Exposition mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> belastet.

Von allen getesteten Wasserproben der Rhein- und Elbeschiene sowie der Wasserproben vom Neckar waren nur die Wasserprobe März Karlsruhe, die Oktoberproben von der Elbeschiene (Abb. 52, 53) und die Dezemberprobe 1998 Neckarhausen (Abb. 56) im Comet-Assay positiv. Während die Karlsruhe-Probe und die Neckarprobe jedoch nur einen leichten, wenn auch statistisch signifikanten Effekt zeigte, erreichten die Oktober-Proben von der Elbe Tail Moment-Werte im Bereich der Positivkontrolle (Abb. 53); hier kann somit von einer starken genotoxischen Wirkung der Umweltprobe gespro-

chen werden. Proben, die nur in einem der 3 Durchgänge positiv waren, konnten über den Testzeitraum einige Male protokolliert werden (z.B. die Dezemberproben von der Elbe), die notwendigen Wiederholungen erwiesen sich allerdings als negativ. Keine der getesteten Wasserproben des Jahresgangs von Rhein und Elbe sowie der getesteten Neckarproben zeigte eine im FDA Assay nachweisbare cytotoxische Wirkung auf die Hepatocyten und Kiemenzellen. Auch der Vergleich von Hepatocyten und Kiemenzellen, die zu Beginn des Wasserproben-Untersuchungen mehrmals mitgetestet wurden, zeigte keinerlei unterschiedliche Reaktionen der beiden Zellsysteme auf die untersuchten Wasserproben (Abb. 54, 55). Aufgrund der schwierigeren Gewinnung ausreichender Zellzahlen sowie der geringeren metabolischen Kompetenz im Vergleich zu den Hepatocyten wurden die Kiemenzellen im weiteren Verlauf des Jahresgangs nicht mehr untersucht.

**Tab. 18:** *In vitro*-Untersuchungen zum genotoxischen Schädigungspotential der Wasserproben von Rhein und Elbe auf isolierte Hepatocyten aus dem Zebrafärblich

	Wahnbach-Talsperre	LFU-Karlsruhe	Köln	Düsseldorf	Dessau/Mulde	Schmilka	Schnackenburg
Feb 97					-	-	
Mrz 97	-	+	-	-			
Apr 97						-	-
Mai 97	-	-	-	-			
Jun 97					-	-	-
Jul 97	-	-	-	-			
Aug 97					-	-	-
Sep 97	-	-	-	-			
Okt 97					+	+	+
Nov 97	-	-	-	-			
Dez 97					-	-	
Jan 97	-	-	-	-			

+, - Wasserprobe in bis zu drei Durchgängen getestet; in mindestens 2 Durchgängen positiv oder negativ

**Tab. 19:** *In vitro*-Untersuchungen zum genotoxischen Schädigungspotential ausgewählter Wasserproben auf isolierte Kiemenzellen aus dem Zebrafärblich

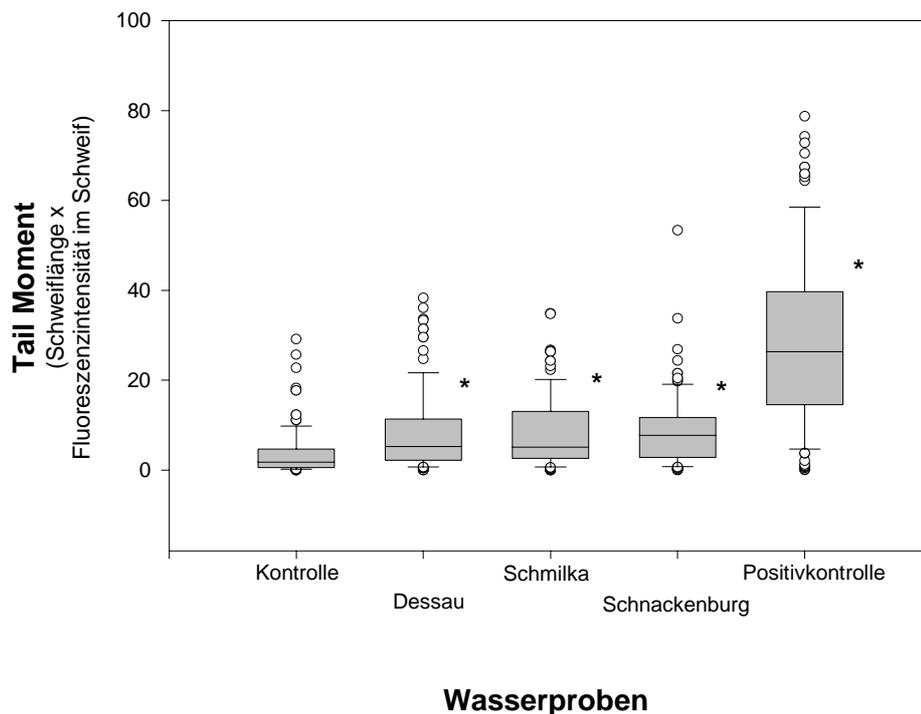
	Wahnbach-Talsperre	LFU-Karlsruhe	Köln	Düsseldorf	Dessau/Mulde	Schmilka	Schnackenburg
Apr 97						-	-
Mai 97	-	-	-	-			
Jun 97						-	-
Jul 97	-	-	-	-			

+, - Wasserprobe in bis zu drei Durchgängen getestet; in mindestens 2 Durchgängen positiv oder negativ

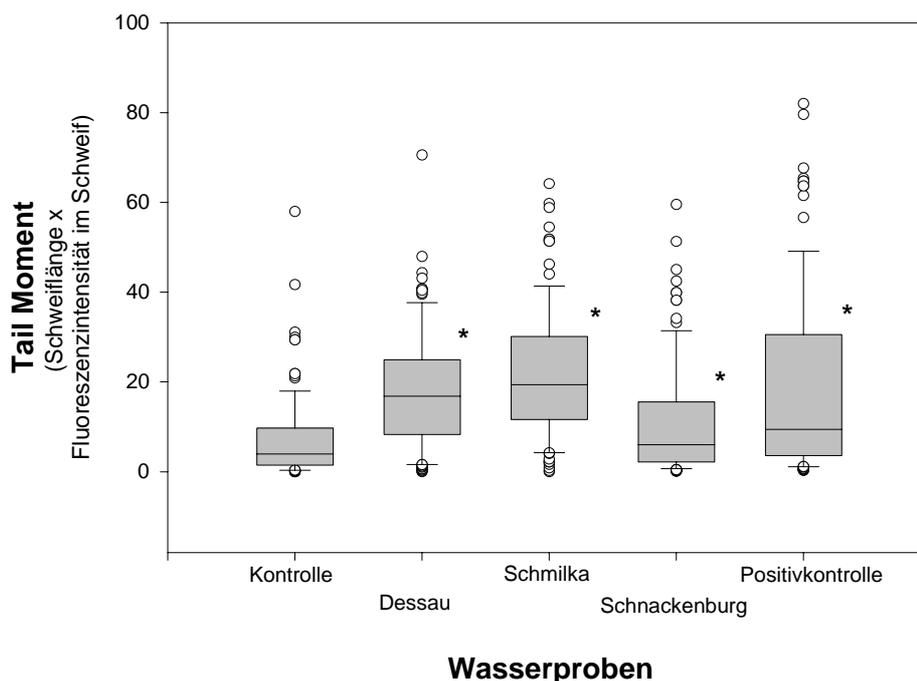
**Tab. 20:** *In vitro*-Untersuchungen zum gentoxischen Schädigungspotential der Wasserproben vom Neckar auf isolierte Hepatocyten aus dem Zebraärbling

	Heidelberg	Wieblingen	Edingen	Neckarhausen	Ilvesheim
Okt 98			-	-	-
Dez 98			-	+	-
Apr 99	-	-	-	-	

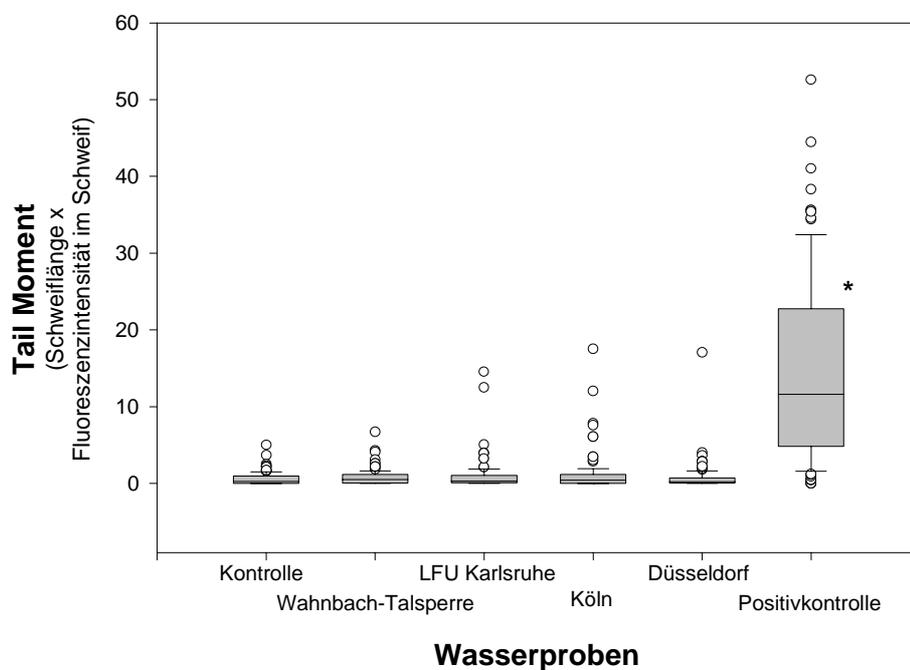
+, - Wasserprobe in 2 Durchgängen positiv oder negativ getestet.



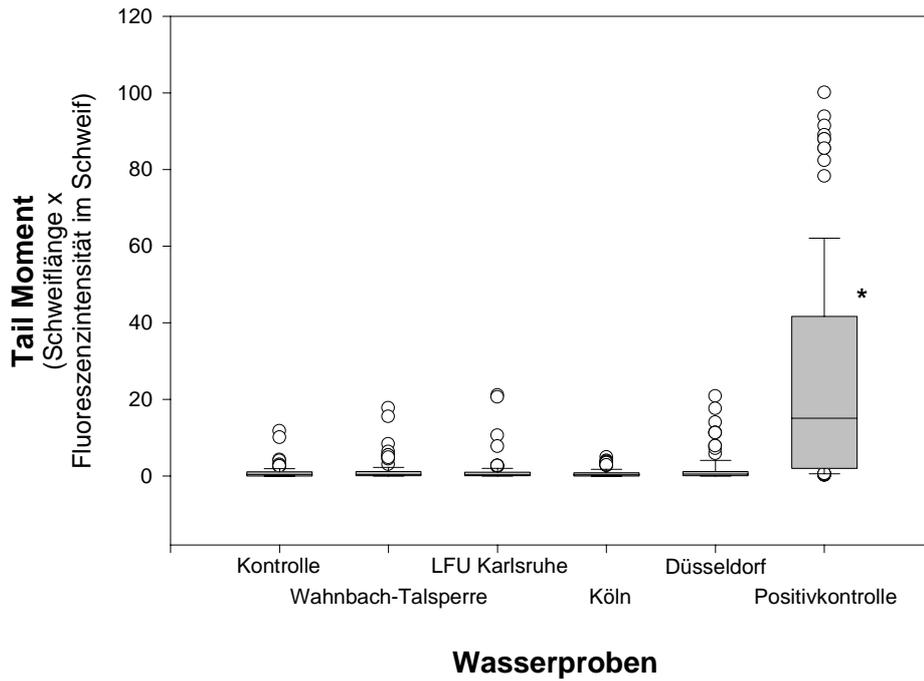
**Abb. 52:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling mit Wasserproben der Probenahme Oktober 1997 von der Elbe: Durchgang 1. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 verschiedenen Gelen. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03)



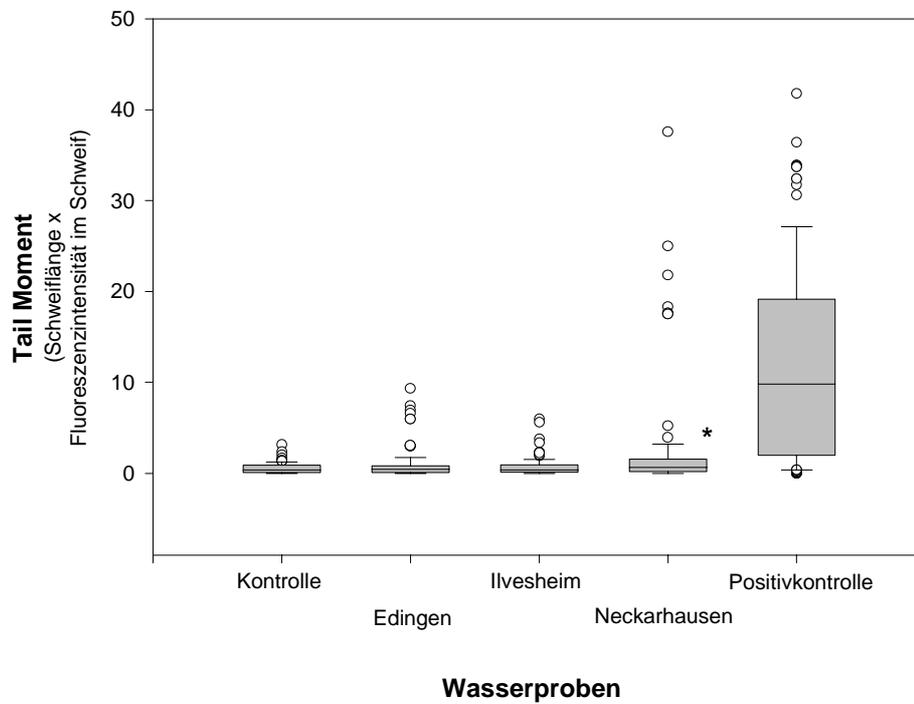
**Abb. 53:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling mit Wasserproben der Probenahme Oktober 1997 von der Elbe: Durchgang 2. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 verschiedenen Gelen. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03)



**Abb. 54:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling mit Wasserproben der Probenahme Mai 1997 vom Rhein. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 verschiedenen Gelen. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03)



**Abb. 55:** Belastung von isolierten Kiemenzellen aus dem Zebraäbrbling mit Wasserproben der Probenahme Mai 1997 vom Rhein. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 verschiedenen Gelen. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03)



**Abb. 56:** Belastung von isolierten Hepatocytan aus dem Zebraäbrbling mit Wasserproben der Probenahme Dezember 1998 vom Neckar. Ausgewertet wurden 100 Zellen von 2 verschiedenen Gelen. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03)

### 3.3 *In vitro*-Untersuchungen zur Überprüfung des genotoxischen Potentials von Umweltproben stärker kontaminierter Standorte

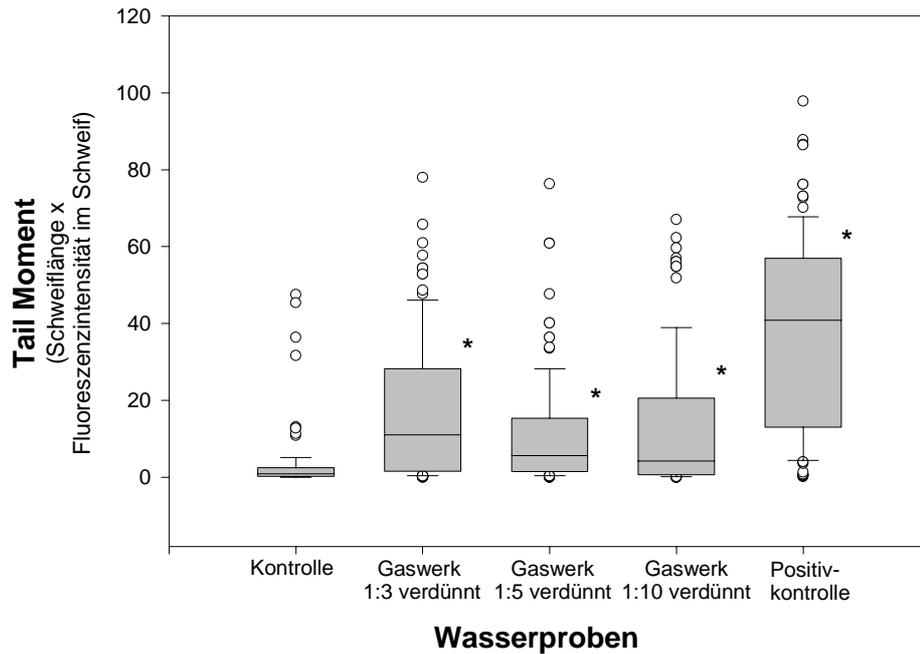
Zusätzlich zu den August- und Oktober-Proben 1997 von der Elbeschiene wurden Wasserproben aus dem Sanierungsgebiet der Gaswerke Düsseldorf auf Genotoxizität untersucht; hier ist das Grundwasser stark mit Polychlorierten Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) verunreinigt. Auffallend bei der Ankunft im Labor war der stark phenolische Geruch der Proben. Die Proben beider Monate konnten aufgrund deutlicher cytotoxischer Effekte nur verdünnt getestet werden. Ab einer 1:3-Verdünnung konnten keine cytotoxischen, aber deutliche genotoxische Effekte dokumentiert werden (Abb. 57, 58). Während die Augustprobe noch in einer 1:10-Verdünnung positiv getestet wurde (Abb. 57), zeigte die Oktoberprobe nur in den Verdünnungen 1:3 und 1:5 deutliche genotoxische Effekte, mit einer 1:10-Verdünnung konnte mit dem Comet Assay und Fischhepatocyten kein genotoxischer Effekt mehr nachgewiesen werden (Abb. 58).

**Tab. 21:** *In vitro*-Untersuchungen zum genotoxischen Schädigungspotential der auf isolierte Hepatocyten aus dem Zebrabärbling

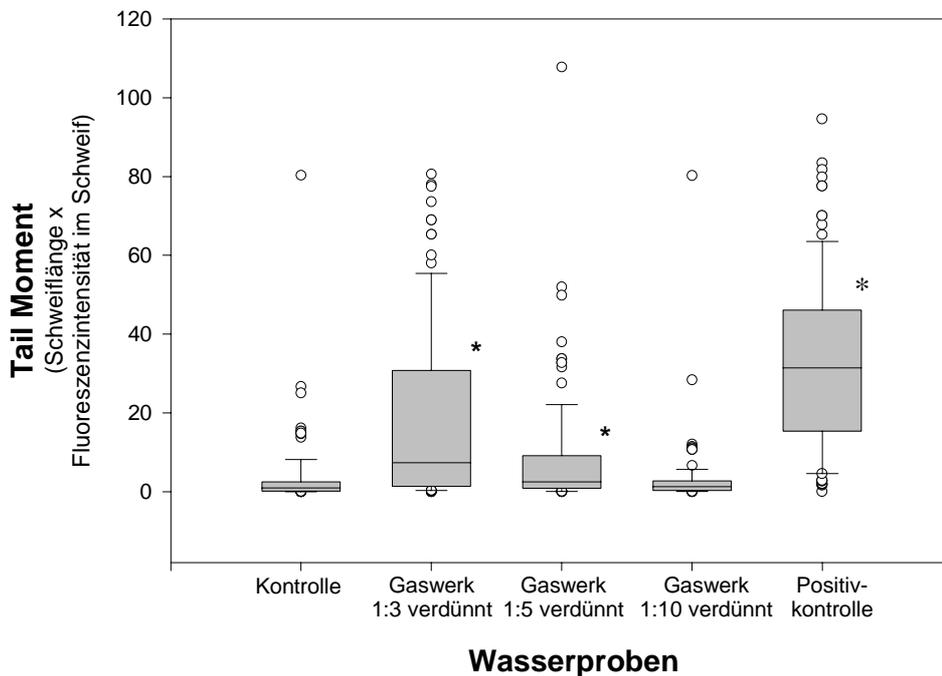
	Gaswerke Düsseldorf	Wupper	Schmilka
August 97	+		
Oktober 97	+		
Februar 98		+	
März 98		-	
April 98			-
Mai 98			-

+, - Wasserprobe in bis zu drei Durchgängen getestet; in mindestens 2 Durchgängen positiv oder negativ

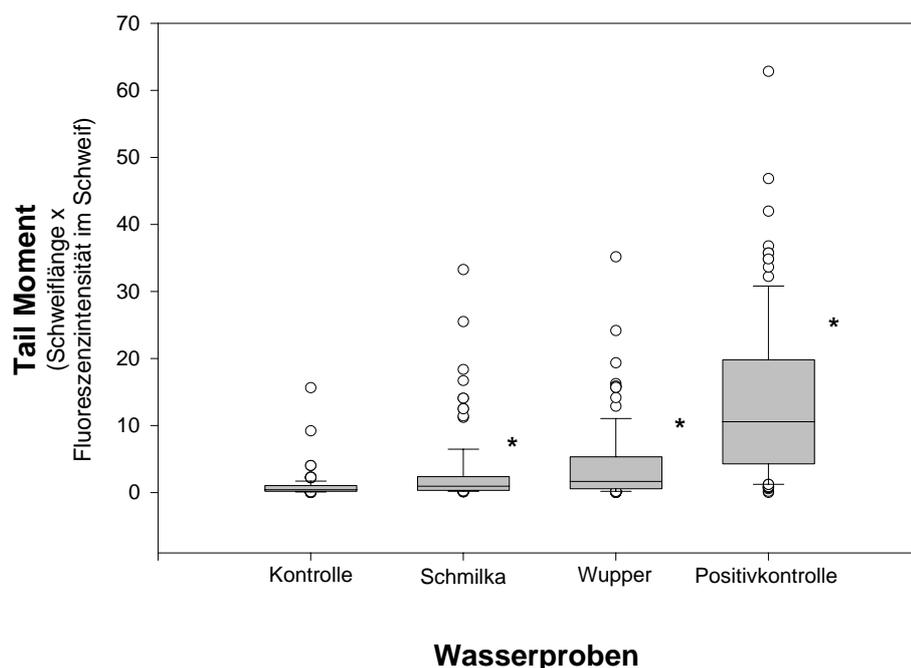
Zwischen Februar und Mai 1998 wurden 4 weitere Zusatzproben aus Oberflächengewässern auf Genotoxizität untersucht; der von den im Verbundprojekt untersuchten Standorten am stärksten kontaminierten Standort Schmilka zweimal, sowie zweimal Wasserproben von der Wupper, die als stark verschmutzt gilt und in früheren Genotoxizitätsprüfungen bereits positiv getestet worden war. Im Rahmen dieser Prüfungen zeigte sich nur die Wupperprobe vom März 1998 als deutlich positiv (Abb. 59), die mit getestete Elbeprobe Schmilka war in diesem Durchgang zwar auch positiv (Abb. 59, siehe auch Tab. 21), bei den 2 folgenden Wiederholungen jedoch negativ.



**Abb. 57:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling mit einer Verdünnungsreihe der Wasserprobe aus dem Sanierungsgebiet Gaswerk Düsseldorf vom August 1997. \*) Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03)



**Abb. 58:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling mit einer Verdünnungsreihe der Wasserprobe aus dem Sanierungsgebiet Gaswerk Düsseldorf vom Oktober 1997. \*) Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03)



**Abb. 59:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebraärbling mit den Zusatzproben 1998: Schmilka Februar 1998, Wupper April 1998. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach ANOVA ON RANKS (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03)

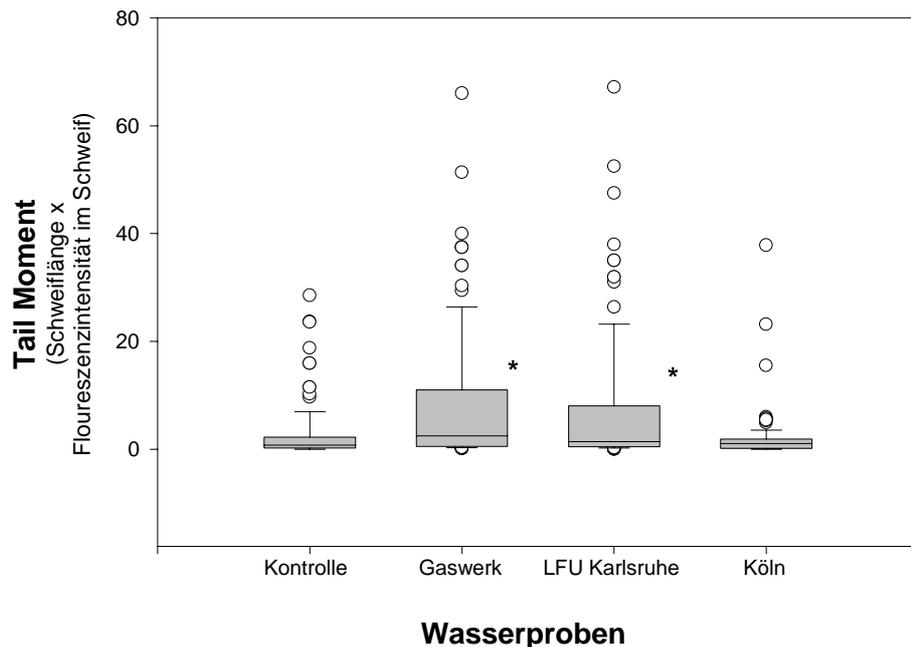
### 3.4 Vergleichende Untersuchungen mit Zebraärblingen zur *In vivo*-Belastung mit Wasserproben

Die *In vivo*-Untersuchungen wurden exemplarisch nur an einigen Wasserproben durchgeführt. Hierbei konnten die positiven Befunde aus der *In vitro*-Prüfung der Oktober-Proben von der Elbe für den *In vivo*-Ansatz nicht bestätigt werden (Tab. 22). Übereinstimmend zeigten jedoch die Fische, die der Gaswerksprobe Oktober 1997 exponiert wurden, ebenfalls einen deutlichen genotoxischen Effekt in den Hepatocyten (Abb. 60). Obwohl direkter exponiert, konnte in den Kiemenzellen keine DNA-Fragmentierung, die statistisch signifikant verschieden von den Kontrolltieren war, nachgewiesen werden (Abb. 61). Im *In vitro*-Ansatz negativ, zeigte eine Rheinprobe (September 1997, Karlsruhe) *in vivo* einen deutlichen genotoxischen Effekt. Das genotoxische Potential der Probe zeigte sich allerdings wiederum nur in den Hepatocyten, die Kiemenzellen zeigten keine erhöhten Tail Moment-Werte.

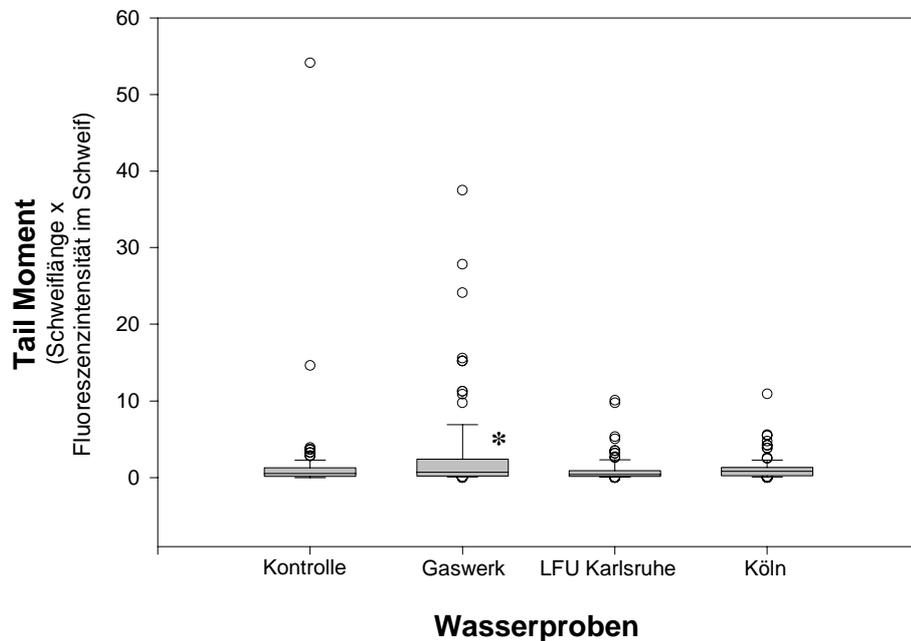
**Tab. 22:** Untersuchung zur *In vivo*-Exposition von Zebraärblingen mit ausgesuchten Wasserproben aus dem Routinemeßprogramm und den Zusatzproben

	Karlsruhe	Köln	Dessau/ Mulde	Schmilka	Schnackenburg	Gaswerke Düsseldorf
Sep 97	+ / -	- / -				
Okt 97			- / -	- / -	- / -	+ / -

+ / - Positive bzw. negative Reaktion von Leber- / Kiemenzellen auf *In vivo*-Exposition adulter Zebraärblinge mit ausgesuchten Wasserproben für 3 Tage



**Abb. 60:** *In vivo*-Untersuchungen zum genotoxischen Potential ausgewählter Wasserproben auf Hepatocyten nach dreitägiger Belastung adulter Zebrafische: Sanierungsgebiet Gaswerke Düsseldorf, August 1997; LFU Karlsruhe September 1997; Köln, September 1997. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03).



**Abb. 61:** *In vivo*-Untersuchungen zum genotoxischen Potential ausgewählter Wasserproben auf Kiemenzellen nach dreitägiger Belastung adulter Zebrafische: Sanierungsgebiet Gaswerke Düsseldorf, August 1997; LFU Karlsruhe September 1997; Köln, September 1997. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03).

### 3.5 Anmerkungen zur Statistik

Die statistische Auswertung von Daten aus dem Comet Assay mit *ANOVA on ranks* (Kruskall-Wallis; Mann Whitney) in Kombination mit der Dunnett`s Methode ist ein häufig angewandtes Verfahren, um signifikante Unterschiede zwischen nicht normalverteilten Datensätzen (siehe hierzu auch Bauer et al. (1998)) zu ermitteln (Anderson et al., 1998; Baltaci et al., 1998; Lehmann et al., 1998; Moller et al., 1998; Moretti et al., 1998; Sasaki et al., 1998; Singh und Stevens, 1998; Steinert et al., 1998; Tice et al., 1997; Udumudi et al., 1998; Villani et al., 1998)).

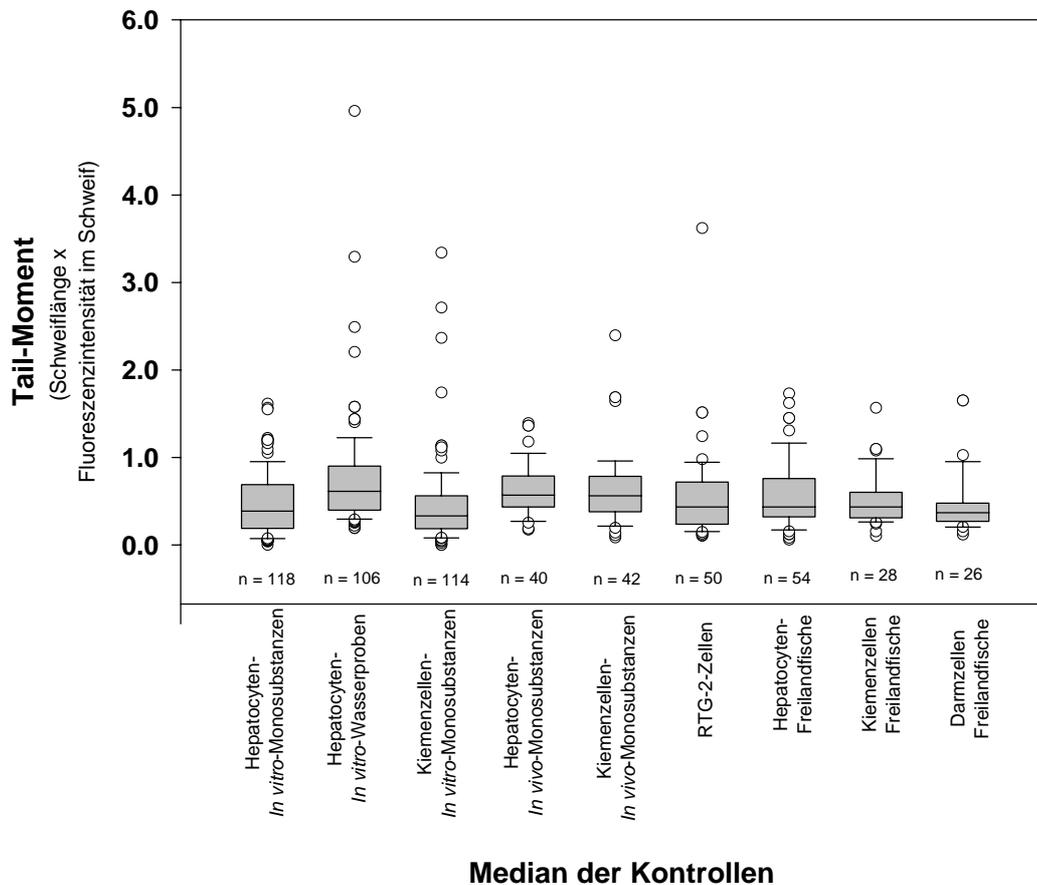
Hierbei wurde, bestätigt auch durch Literaturstudien, der Endpunkt Tail Moment gewählt, der zur Zeit in Veröffentlichungen über Genotoxizitätsstudien mit dem Comet Assay als Standardparameter angegeben wird. Wie aus Tabelle 23 zu entnehmen, gruppieren sich die Mediane der Kontrollen (*Median aus 50 vermessenen Zellen: Werte der Größe nach sortiert, der 26. Wert dieser Reihung entspricht dem Median der Gruppe*) um 0,5, deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Primärzellen, den Primärzellen und der Dauerzelllinie RTG-2 sowie Artunterschiede sind nicht zu erkennen. Dieses vereinfacht die Ergebnisinterpretation aus vergleichenden Untersuchungen. Wie der Tabelle weiterhin zu entnehmen ist, streuen die Werte allerdings deutlich. Dieses zeigen vor allem die hohen Werte für die Standardabweichung.

**Tab.23:** Statistische Kenngrößen der Kontrollen aus den Comet Assay-Experimenten

	n	MW	STABW	STF	MIN	MAX	ME	25%	75%
<i>Zebraäbrbling</i>									
Hepatocyten - <i>In vitro</i>	224	0.61	0.52	0.03	0.00	4.96	0.49	0.28	0.84
Kiemenzellen - <i>In vitro</i>	100	0.47	0.51	0.05	0.00	3.34	0.33	0.19	0.56
Hepatocyten - <i>In vivo</i> -	40	0.63	0.30	0.05	0.18	1.39	0.57	0.44	0.79
Kiemenzellen - <i>In vivo</i>	42	0.64	0.44	0.07	0.09	2.40	0.56	0.38	0.79
RTG-2 Zellen	50	0.56	0.55	0.08	0.10	3.62	0.44	0.24	0.72
<i>Rotaug / Gründling</i>									
Hepatocyten - Freiland	54	0.57	0.39	0.05	0.06	1.73	0.44	0.32	0.76
Kiemenzellen - Freiland	38	0.51	0.30	0.05	0.10	1.57	0.43	0.31	0.60
Darmzellen - Freiland	26	0.46	0.34	0.07	0.12	1.65	0.37	0.27	0.48

n = Anzahl der Kontrollen, MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung, STF = Standardfehler, MIN = Minimum, MAX = Maximum, ME = Median, 25 % = 25 % -Percentile, 75 % = 75 % -Percentile.

Allerdings läßt sich, wie auch aus der Abbildung 62 zu entnehmen ist, ein Kontrollbereich für Fischzellen definieren, da sich die Mediane aller Kontrollwerte aus den Experimenten mit Fischen und Fischzellen im Rahmen dieser Studie (*entspricht 574 Einzelwerten*), bis auf wenige Ausnahmen, zwischen 0 und 1 bewegen. Auch wenn bei der statistischen Auswertung der Tageskontrollwert das wichtige Bezugs-kriterium ist, läßt sich für die Ergebnisinterpretation ein Kontrollbereich als Bezugspunkt im Hinblick auf die Bewertung der Schadensintensität von positiven Proben festlegen.



**Abb. 62:** Medianwerte der Kontrollen aus den Comet Assay-Experimenten mit der Dauerzelle RTG-2 und mit isolierten Fischzellen verschiedener Fischarten (*Danio rerio*, *Rutilus rutilus*, *Gobio gobio*) im *In vitro*- und *In vivo*-Ansatz.

Bei der Auswertung nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode) wird als Bezugspunkt für die statistische Überprüfung eines genotoxischen Ereignisses lediglich die Tageskontrolle herangezogen. Unberücksichtigt bleibt das statistische Verhalten der ‚historischen‘ Kontrollen.

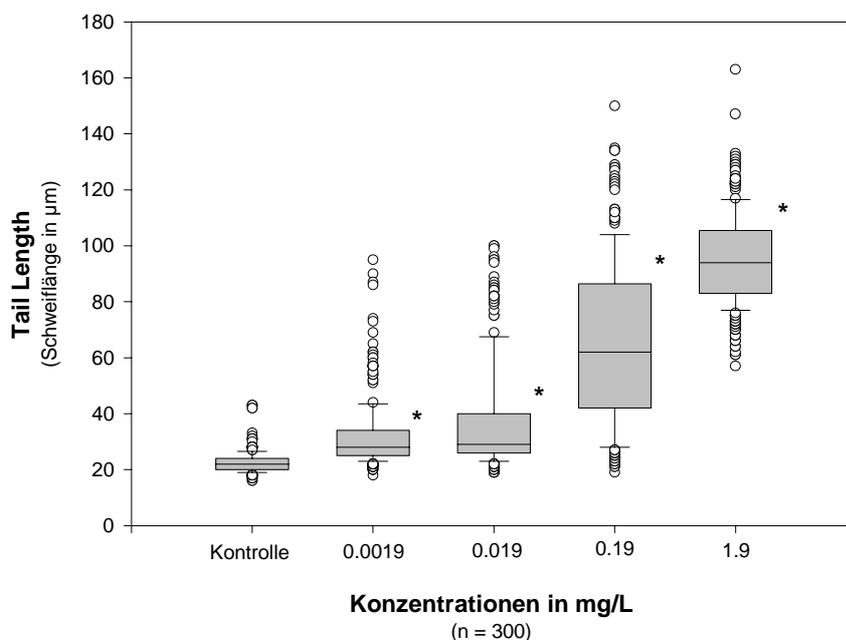
Im Rahmen des BMBF-Projekts wurde durch Prof. Schneider (TH Hannover) und Dr. Moldenhauer (ZEBET, Berlin) ein weiteres Verfahren etabliert. Hierbei werden die Daten durch Logarithmierung in einen normalverteilten Datensatz transformiert, auf dessen Grundlage Mittelwerte, Standardabweichungen, Varianzen sowie geometrische Mittel berechnet werden können. Hieraus kann für jede Probe ein Signifikanzfaktor errechnet werden, der stark durch die statistischen Kenngrößen der historischen Kontrollen beeinflusst ist. Je höher die Streuung aller bisher verwerteten Kontrollen, desto größer der Signifikanzfaktor. Erst wenn der Unterschied zwischen Kontrolle und untersuchter Probe diesen Wert überschreitet, wird von einem statistisch signifikanten genotoxischem Ereignis ausgegangen. Der Vergleich der beiden statistischen Verfahren zeigte allerdings, daß die Ergebnisse im wesentlichen übereinstimmen; nur bei sehr kleinen Unterschieden zwischen den Datensätzen einer Probe und der korrespondierenden Kontrolle kann es zu einer unterschiedlichen Beurteilung kommen. Bei Vergleich der

Bewertung von Referenzsubstanz- und Wasserproben-Untersuchungen wurden insgesamt 3 Experimente unterschiedlich bewertet (*Daten nicht präsentiert*). Hierbei gab es jedoch keinen Trend in eine bestimmte Richtung.

### 3.5.1 Unterschiedliche Bewertung der genotoxischen Untersuchungen durch verschiedene Endpunkte: Tail Moment versus Tail Length

In den letzten Jahren hat sich als Endpunkt der Auswertung das *Tail Moment* (Schweiflänge x Fluoreszenzintensität im Schweif) durchgesetzt, eine Entwicklung, die nur durch die Verbreitung Computer-gestützter digitaler Auswertesysteme möglich wurde. Zu Beginn der Entwicklung des Comet Assays Ende der 80iger Jahre wurde die Schweiflänge (*Tail Length*) gemessen, ein Endpunkt, der sich auch mit Hilfe des Okularmikrometers ohne weitere technische Ausstattung am Fluoreszenzmikroskop bestimmen läßt.

Während der Endpunkt *Tail Length* nur die Ausdehnung des Schweifes erfaßt, geht in den Wert *Tail Moment* über die Fluoreszenzintensität im Schweif auch die Häufigkeit der Interaktion genotoxisches Agens-DNA mit ein. Allerdings besteht die Möglichkeit, daß dieser Endpunkt als Produkt aus 2 Meßwerten eine höhere Variabilität aufweist als die reine Schweiflänge. Für die beiden größten Datensätze (Monosubstanzen *in vitro* und Wasserproben *in vitro*) wurde der Vergleich der beiden Endpunkte durchgeführt. Wie Tabelle 24 zu entnehmen, zeigten die Meßwerte der *Tail Length* eine deutlich geringere Variabilität als die entsprechenden *Tail Moment*-Daten. Während die Standardabweichung für die zufällig ausgewählten Tail Length-Daten nur 21 % des Mittelwerts beträgt, so sind es immerhin deutliche 150 % bei dem aus dem gleichen Datenpool errechneten Tail Moment-Wert. Auch zeigen die Tail Length-Daten eine sehr gute Übereinstimmung von Mittelwert und Median, ein Zeichen für geringe Streuung, während die beiden statistischen Kenngrößen beim Tail Moment weit auseinander liegen.



**Abb. 62:** Belastung von isolierten Hepatocyten aus dem Zebrafärbling mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* für 20 h; graphische Darstellung der *Tail Length*-Werte umfaßt Daten aus 3 Testansätzen. \*) Konzentration signifikant unterschiedlich von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* in Kombination mit der *Dunnnett*-Methode ( $p < 0,05$ ).

**Tab. 24:** Statistische Eckdaten von 5 zufällig ausgewählten Kontrollansätzen isolierter Hepatocyten aus dem Zebrabärbling für die Endpunkte *Tail Moment* und *Tail Length*

	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	Median	25 %- Percentile	75 %- Percentile
Tail Moment	0.644	0.997	0.00	9.071	0.282	0.063	0.891
Tail Length	18.465	3.883	12.00	47.00	18.00	16.00	19.00

Daten basieren auf 500 Meßwerten

Das zeigte sich dann auch in der deutlicheren Ausprägung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung in den niedrigen Konzentrationen bei Belastung mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* (Abb. 62 und vgl. Abb. 41, Abschnitt 3.1.6). Trotzdem wiesen die Daten für die *Tail Length* keine veränderten Nachweisgrenzen in den Untersuchungen mit den Monosubstanzen auf.

Im Gegensatz dazu ergab sich bei den Wasserproben ein anderes Bild (Tab. 25). Durch die Auswertung des Endpunktes *Tail Length* zeigten sich deutlich mehr Wasserproben nach statistischer Auswertung mit *ANOVA ON RANKS* (Kruskall Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode) als positiv. Aufgrund der geringeren Variabilität der Kontrollen wurden auch sehr geringe Unterschiede als signifikant verschieden gewertet.

**Tab. 25:** Vergleichende Auswertung der Wasserproben-Untersuchungen im *In vitro*-Ansatz mit isolierten Hepatocyten aus dem Zebrabärbling mit den Endpunkten *Tail Moment* und *Tail Length*

I. TAIL MOMENT	2.97	3.97	4.97	5.97	6.97	7.97	8.97	9.97	10.97	11.97	12.97	1.98	2.98	3.98	4.98	5.98
Wahnbach		-		-		-		-		-		-				
LFU Karlsruhe		+		-		-		-		-		-				
Köln		-		-		-		-		-		-				
Düsseldorf		-		-		-		-		-		-				
Dessau	-				-		-		+		-					
Schmilka	-		-		-		-		+		-				-	-
Schnackenburg			-		-		-		+		-					
Gaswerke							+		+							
Wupper													+		-	
II. TAIL LENGTH	2.97	3.97	4.97	5.97	6.97	7.97	8.97	9.97	10.97	11.97	12.97	1.98	2.98	3.98	4.98	5.98
Wahnbach		-		-		-		-		-		-				
LFU Karlsruhe		-		-		-		-		-		-				
Köln		+		+		-		-		+/-		+/-				
Düsseldorf		+		-		-		-		+/-		-				
Dessau	+				-		+/-		+		+/-					
Schmilka	+		-		-		+/-		+		+				+	+
Schnackenburg			-		-		-		+/-		-					
Gaswerke							+		+							
Wupper													+		+/-	

- + , - Wasserprobe in 2 Durchgängen positiv oder negativ getestet, Sigma Stat 2.03
- +/- Wasserprobe nach Auswertung *Tail Length* einmal positiv, einmal negativ
- \* Sanierungsprobe Düsseldorf, Aug 97: Gentoxischer Effekt bis Verdünnung 1 : 10.
- \*\* Sanierungsprobe Gaswerke, Okt 97: Gentoxischer Effekt bis Verdünnung 1 : 5.
- \*\*\* Sanierungsprobe Gaswerke, Okt 97: Gentoxischer Effekt nur in Verdünnung 1 : 3.

### 3.6 Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Fischen im Freiland mit dem Comet Assay

Während 3 Probenahmen 1996 und 9 Probenahmen 1998 wurden mit dem Senknetz am Neckar 191 Fische von 13 Arten bzw. 722 Fische von 17 Arten gefangen. Hierbei handelte es sich mit Ausnahme der Kleinfischarten Gründling (*Gobio gobio*) und Ukelei (*Alburnus alburnus*) in aller Regel um Jungfische hauptsächlich der Generationen 0+ und 1+, die sich vom Frühsommer bis in den späten Herbst in gemischten Schwärmen bevorzugt im Flachwasserbereich der Uferzone aufhalten; hier ist die Strömung in der Regel nicht so stark, es findet sich verstärkt Anflugnahrung, und die Flachwasserzone bietet Schutz vor größeren Raubfischen (*eigene Beobachtungen*).

Besonders erwähnenswert, daß sich mit *Pseudorasbora parva*, dem Blaubandbärbling, ein weiterer Neubürger im Neckar festgesetzt hat. Das Probenahmegebiet beschränkte sich hierbei auf den ‚Alten Neckar‘, da die Senknetzmethode für den Hauptstrom mit Steinschüttungsuffern und deutlicher Strömung nur wenig geeignet ist. Bis auf 2 Probenahmen im ‚Alten Neckar‘ bei Wieblingen und einer Probenahme in einer Neckarschlute bei Eberbach wurden die Fische im Fluß unterhalb der Kläranlage Neckarhausen in der sogenannten ‚Ilvesheimer Neckarschleife‘, einem weiträumigen Landschafts- und Naturschutzgebiet, gefangen. Das vorgefundene Artenspektrum (Abb. 63 u. 64) ist ein gutes Indiz für die Lebensraumdiversität der ‚Alten Neckar‘-Abschnitte, in denen sich schnell fließende Bereiche mit strömungsliebenden Fischen wie Barbe (*Barbus barbus*), Nase (*Chondrostoma nasus*) Rapfen (*Aspius aspius*) mit ruhigeren Bereichen und Stillwasserzonen abwechseln, in denen als typische Arten Brassen (*Abramis brama*), Güster (*Blicca björnka*), Rotaugen (*Rutilus rutilus*), Ukelei (*Alburnus alburnus*), Flußbarsch (*Perca fluviatilis*) und selbst der Hecht (*Esox lucius*) angetroffen wurden. Die Uferregionen sind nicht durch den starken Wellenschlag des Schiffsverkehrs beeinflusst und vergleichsweise naturnah belassen. Da es sich wie oben erwähnt in der Mehrzahl der Arten um Jungfische handelt, scheint der Lebensraum den unterschiedlichen Arten auch die benötigten Laichplätze zu bieten.

Die in Abbildung 63 sowie 64 aufgezeigte Artenzusammensetzung kann natürlich nicht als repräsentativ für die Fischfauna des Neckars angesehen werden. Wichtige Arten mit hohen Populationsdichten, wie der Aal (*Anguilla anguilla*, 1 Zufallsexemplar), der sich weiter ausbreitende Wels (*Silurus glanis*), aber auch der Karpfen (*Cyprinus carpio*) konnten mit der Senknetzmethode nicht gefangen werden. Da das Fangen mit dem Senknetz auf die flachen, ruhigen Uferbereiche beschränkt ist, kann über die tatsächliche Artenzusammensetzung in diesem vergleichsweise vielfältig strukturierten Flußabschnitt keine endgültige Aussage getroffen werden.

Bei den Probenahmen wurden nur Individuen der beiden Zielfischarten Rotaugen (*Rutilus rutilus*) und Gründling (*Gobio gobio*) entnommen, die anderen Arten wurden nach Bestimmung und Erfassung zurückgesetzt.

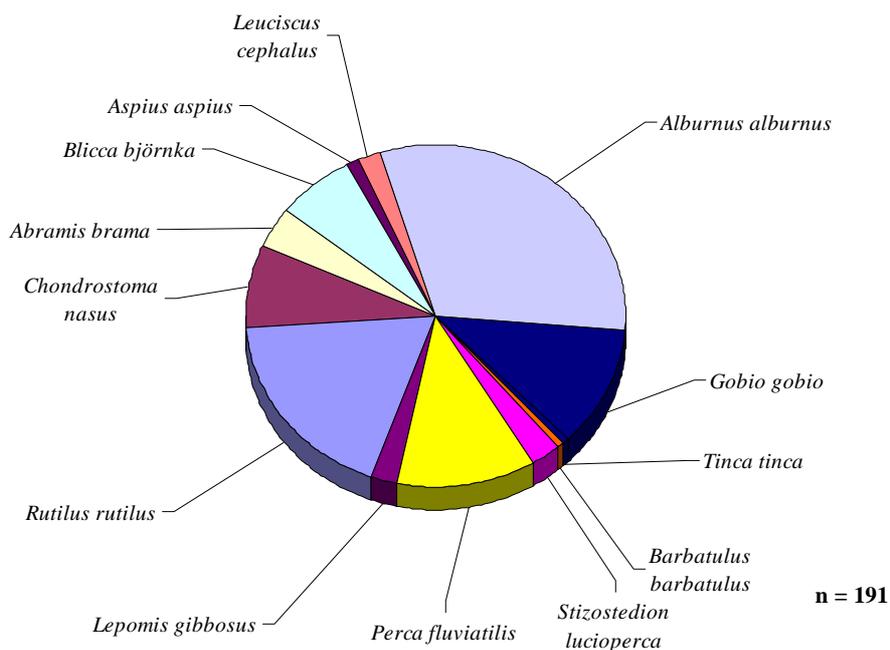


Abb. 63: Artenzusammensetzung der mit dem Senknetz am Neckar gefangenen Fische (1996)

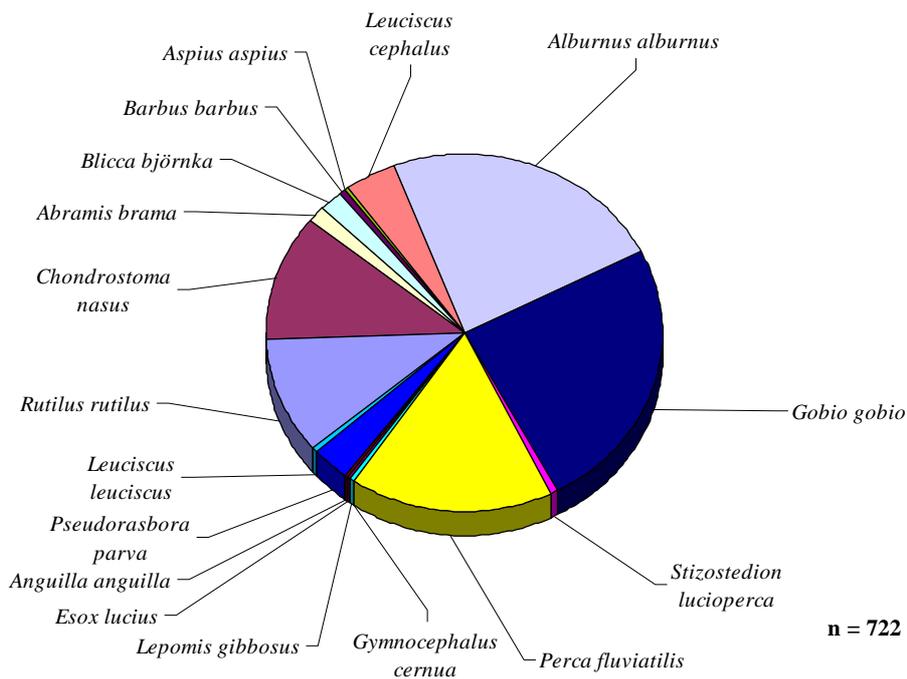
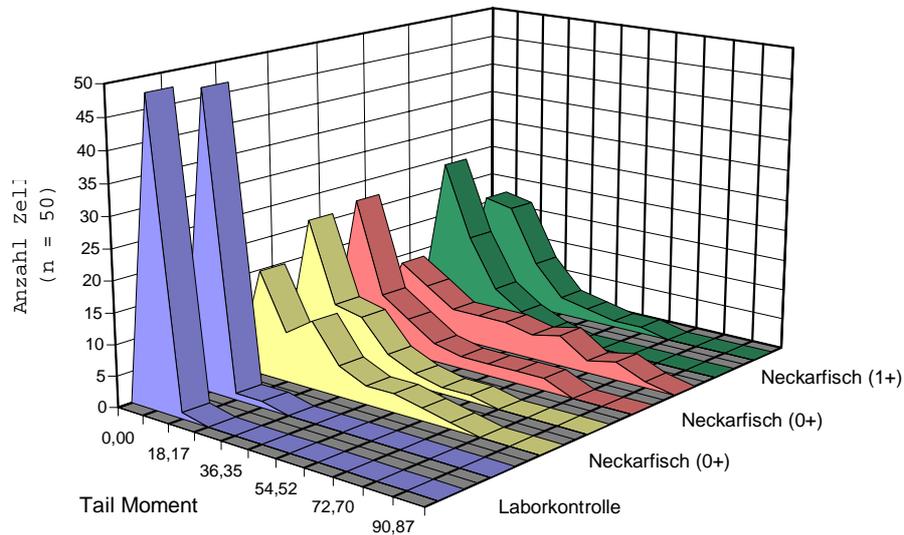


Abb. 64: Artenzusammensetzung der mit dem Senknetz am Neckar gefangenen Fische (1998)

Von den 1996 insgesamt 10 untersuchten Rotaugen aus dem ‚Alten Neckar‘ unterhalb der Kläranlage Neckarhausen zeigten 5 Individuen deutliche DNA-Fragmentierung in den Hepatocyten; in Abb. 65 sind die Ergebnisse der ersten Probenahme dargestellt. Daraufhin wurden 1998 weitere 23 Rotaugen sowie 21 Gründlinge auf DNA-Schäden in primären Leber-, Kiemen- und Darmzellen untersucht. Um diese Ergebnisse mit denen der Untersuchungen mit dem Zebraabärbling besser korrelieren zu können,

bzw. zur Aufdeckung von Unterschieden zwischen verschiedenen Fischarten wurden mit den bekannten Referenzsubstanzen *4-Nitroquinolin-N-oxid* und *Benzo[a]pyren* *In vitro*-Untersuchungen mit Primärkulturen von Leber, Kieme und Darm aus Rotaugen und Gründlingen vorgenommen. Die Spendertiere stammten hierbei aus der Laborhaltung; aus diesem Pool wurden auch die späteren Kontrolltiere entnommen.



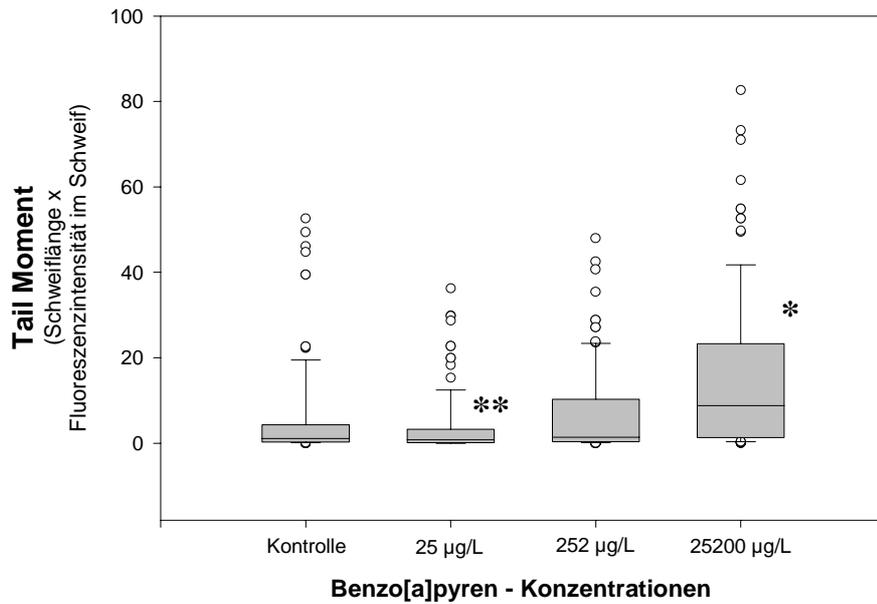
**Abb. 65:** Nachweis von DNA-Schäden in isolierten Hepatocyten aus Rotaugen aus dem Neckar vom 21.8.1996; 0 + = Jungfisch aus diesem Jahr, 1+ = Jungfisch vom letzten Jahr (älter als 1 Jahr).

### 3.6.1 *In vitro*-Untersuchungen mit Primärzellkulturen aus dem Rotauge, *Rutilus rutilus* und dem Gründling, *Gobio gobio*

Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau A. Tischmeyer durchgeführt.

Auf die Exposition gegenüber *Benzo[a]pyren* reagierten die Hepatocyten der Gründlinge mit den stärksten DNA-Schädigungen. Sowohl Kiemen- als auch Darmzellen der Tiere zeigten einen ähnlichen, jedoch schwächeren Schädigungsgrad (Tab. 26 sowie Abb. 66). Trotz der geringeren Schadensintensität in der höheren Konzentration zeigten die Darmzellen mit 252 µg/L die niedrigste Nachweisgrenze gegenüber *Benzo[a]pyren*.

Bei den Rotaugen reagierten die Hepatocyten sensibler auf die Belastung mit *Benzo[a]pyren* als Kiemen- und Darmzellen, wobei die Kiemenzellen bei einer Konzentration von 25.200 µg/L die gleichen *Tail Moment*-Werte erreichten wie die Hepatocyten. Die geringste DNA-Fragmentierung zeigten bei beiden Fischarten die Darmzellen.



**Abb. 66:** Comet-Assay mit isolierten Hepatocyten aus Gründlingen (*Gobio gobio*) nach Belastung mit *Benzo[a]pyren* für 20 h. \* Tail Moment signifikant verschieden von der Kontrolle nach ANOVA ON RANKS in Kombination mit der Dunnett's Methode (Sigma Stat 2.03); \*\* signifikant verschieden, aber kleineres Tail Moment als die Kontrolle

**Tab. 26:** Statistische Auswertung des *Tail Moment* (Medianwerte) isolierter Hepatocyten, Kiemenzellen und Darmzellen aus Gründling und Rotauge nach *In vitro*-Exposition gegenüber *Benzo[a]pyren* für 20 h unter S9-Supplementierung.

		Kontrolle	25.2 µg/L	252 µg/L	25200 µg/L
Gründlinge	Hepatocyten	1,082	0.753**	1,400	8.806*
	Kiemenzellen	0.289	0.258	0.335	1.208*
	Darmzellen	0.152	0.152	0.335*	1.208*
Rotaugen	Hepatocyten	0.876	0.910	1.321*	3.846*
	Kiemenzellen	0.919	0.591**	0.927	3.920*
	Darmzellen	0.261	0.068**	0.411	1.541*

\*) Konzentration signifikant verschieden von der Kontrolle nach *One Way Anova on Ranks* ( $p < 0.05$ ) in Kombination mit der *Dunnett's* Methode (Sigma Stat 2.0); \*\*) signifikant verschieden, aber kleinere *Tail Moment*-Werte als die Kontrolle.

Nach Inkubation mit *4-Nitroquinolin-N-Oxid* zeigten die Hepatocyten der Gründlingen ebenfalls größere Effekte als die Zellen aus den anderen Organen. Wieder näherte sich der Schädigungsgrad der Kiemenzellen bei höherer Belastung denen der Hepatocyten an (Tab. 27). Bei den Rotaugen zeigten die Kiemenzellen in den höheren Konzentrationen stärkere DNA-Schädigungen. In der höchsten Belastungskonzentration war der Tail Moment-Wert der Kiemen als Meßgröße für die belastungsinduzierte DNA-Fragmentierung mehr als doppelt so groß als der entsprechende Wert der Hepatocyten. Die Darmzellen zeigten wiederum die am schwächsten ausgeprägte Dosis-Wirkungs-Beziehung.

**Tab. 27:** Statistische Auswertung des *Tail Moment* isolierter Hepatocyten, Kiemenzellen und Darmzellen aus Gründling und Rotaugen nach *In vitro*-Exposition gegenüber 4-Nitroquinolin-N-Oxid für 20 h.

		Kontrolle	0.19 µg/L	1.9 µg/L	190 µg/L
Gründlinge	Hepatocyten	0.863	1,137	1.532*	9.561*
	Kiemenzellen	0.328	0.312	0.493	8.854*
	Darmzellen	0.450	0.507	0.565*	1.362*
Rotaugen	Hepatocyten	1,040	0.650**	0.679**	4.544*
	Kiemenzellen	1,029	0.475**	1.119*	11.235*
	Darmzellen	0.217	0.062**	0.492*	1.776*

\*) Konzentration signifikant verschieden von der Kontrolle nach *One Way Anova on Ranks* ( $p < 0.05$ ) in Kombination mit der *Dunnnett's* Methode (Sigma Stat 2.0); \*\*) signifikant verschieden, aber kleinere *Tail Moment*-Werte als die Kontrolle.

### 3.6.2 *In situ*-Experimente

#### 3.6.2.1 Nachweis von DNA-Schäden in Fischen aus dem Neckar

Die Versuchstiere für die Freilandexperimente wurden über einen Zeitraum von vier Monaten (Juli '98 bis Oktober '98) aus dem Neckar bei Heidelberg Wieblingen sowie Neckarhausen („Alter Neckar“ unterhalb der Kläranlage Neckarhausen) entnommen; als Modellgewässer für ein kleines Fließgewässer unter anthropogenem Einfluß wurde der Forellenbach südöstlich von Heidelberg gewählt.

Um den möglichen Nachweis stressinduzierter DNA-Fragmentierung im Comet-Assay durch Transportstress der Freilandtiere auszuschließen, wurden die Kontrolltiere vor der Probenahme den Aquarien entnommen und in einem identischen Transportgefäß zur Probenahme und zurück mitgenommen.

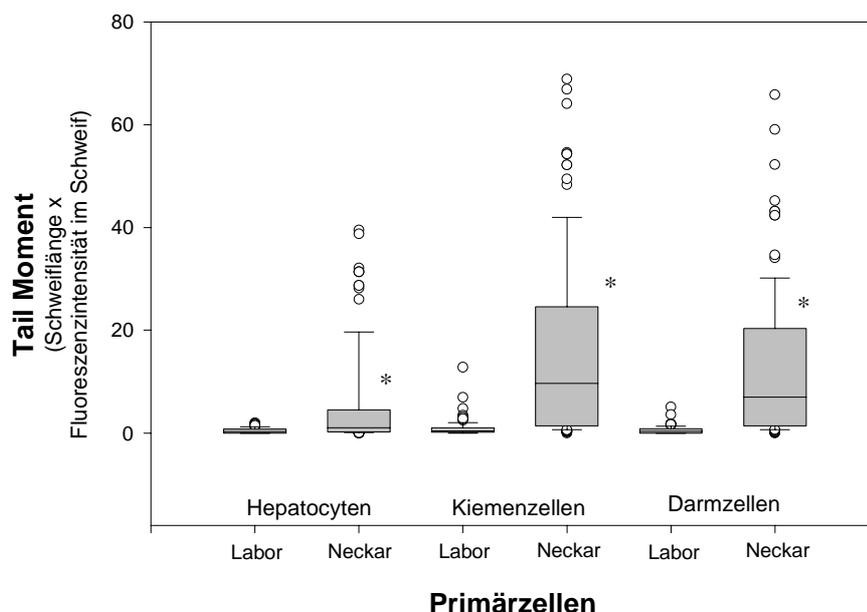
Bei den 23 untersuchten Rotaugen handelte es sich bis auf den Versuch vom 04. 08. 98, bei dem auch 2 dreijährige Tiere mituntersucht wurden (Tab. 29), um Jährlinge; hierbei wurden Primärzellen der untersuchten Organe von jeweils 3 Individuen gepoolt. Bei den 21 untersuchten Gründlingen handelte es sich um einen Querschnitt durch die Altersverteilung der Population; auch hier wurden die Primärzellen von jeweils 3 deutlich unterschiedlichen Individuen gepoolt.

Bei den Gründlingen ließ sich ein deutlicher Anstieg der statistisch signifikanten *Tail Moment*-Werte für die gefangenen Freilandtiere beobachten. Die Ergebnisse waren auch in den folgenden Versuchen reproduzierbar, wobei vor allem Kiemen- und Darmzellen eine akute Schädigung der DNA aufwiesen (Tab. 28). Die Hepatocyten zeigten geringere Abweichungen zu den Kontrollwerten (Abb. 67). Von den 7 Probenahmen erwiesen sich die isolierten Hepatocyten als viermal positiv und die Kiemenzellen sechsmal. Die Darmzellen, nur bei 4 Probenahmen mit untersucht, waren dreimal positiv. Somit zeigte sich in dieser Untersuchung keine der Proben von Primärzellen aus jeweils 3 Gründlingen ohne Befund; einer der untersuchten Primärzelltypen zeigte jedesmal ein positiven Befund.

Diese Ergebnisse bestätigten sich in ähnlicher Weise auch für die Rotaugen. Auch hier trat ein reproduzierbarer signifikanter Unterschied zwischen den Zellen der Kontrolltiere und der Freilandfänge auf (Tab. 29). Kiemenzellen und Darmzellen zeigten auch bei dieser Fischart einen größeren Schädigungsgrad der DNA als die Hepatocyten (Abb. 68). Innerhalb des Versuchsansatzes, in welchem Primärzellen von Rotaugen verschiedenen Alters getestet wurden, entfielen auf die älteren Tiere deutlich größere *Tail Moment*-Werte was auf eine altersabhängige Zunahme genotoxischer Effekte schließen

läßt (Tab. 29). Insgesamt zeigten 4 von 8 Hepatocytenproben ein genotoxisches Signal, 7 von 8 Kiemenproben sowie alle 5 getesteten Darmzellenproben. Nur in einem Testansatz (14.10.98) war in keiner der untersuchten Primärzellkulturen ein genotoxisches Signal nachzuweisen.

Ein auffallendes Merkmal der Schadensausprägung bei den Neckarfischen war die große Streuung der Tail Moment-Werte. Auch in den *In vitro*-Versuchen wurden die Zellen von 3 Individuen gepoolt, trotzdem zeigten die exponierten Zellen ein deutlich einheitlicheres Schadensmuster mit einer kleineren Standardabweichung als die Zellen der Neckarfische in den *In vivo*-Versuchen.

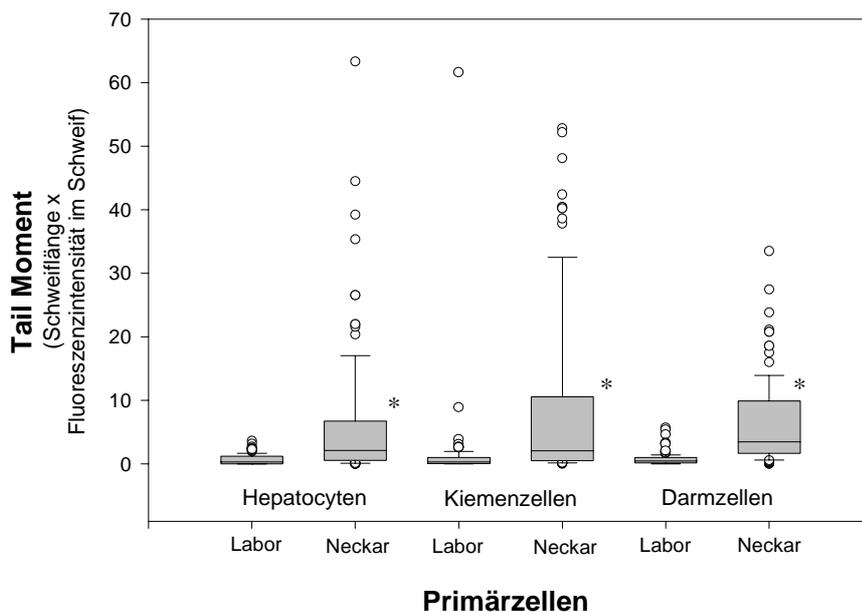


**Abb.67:** Vergleich der genotoxischen Belastung verschiedener Organe in Gründlingen aus dem Neckar und der Laborhaltung. Dargestellt ist das Ergebnis des 04.08.1998. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach ANOVA ON RANKS (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03).

**Tab. 28:** *In vivo*-Versuche mit isolierten Primärzellen aus dem Gründling: Medianwerte der statistischen Auswertung.

Fangdatum	Versuchstiere	Zelltypen		
		Hepatocyten	Kiemenzellen	Darmzellen
14.07.98	Kontrolle	0.703	0.505	-
	Wildfang	0.746	2.072*	-
23.07.98	Kontrolle	0.398	0.367	0.418
	Wildfang	0.417	1.967	3.049*
04.08.98	Kontrolle	0.282	0.411	0.315
	Wildfang	1.062*	9.636*	7.014*
18.08.98	Kontrolle	0.960	0.769	1.106
	Wildfang	1.310	1.427*	1.624
08.10.98	Kontrolle	0.326	0.407	1.025
	Wildfang	0.777*	8.290*	2.894*
14.10.98	Kontrolle	0,39	0,254	-
	Wildfang	1,082*	0,655*	-
20.10.98	Kontrolle	0,419	0,498	-
	Wildfang	1,851*	0,892*	-

\*) Zellpool signifikant verschieden von der Kontrolle nach *One Way Anova ON RANKS* ( $p < 0.05$ ) in Kombination mit der *Dunnett's Methode* (Sigma Stat 2.03).



**Abb.68:** Vergleich der genotoxischen Belastung verschiedener Organe in Rotaugen aus dem Neckar und der Laborhaltung. Dargestellt ist das Ergebnis der Jährlinge des 04.08.1998. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA ON RANKS* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode; Sigma Stat 2.03).

**Tab. 29:** *In vivo*-Versuche mit isolierten Primärzellen aus dem Rotauge: Medianwerte der statistischen Auswertung.

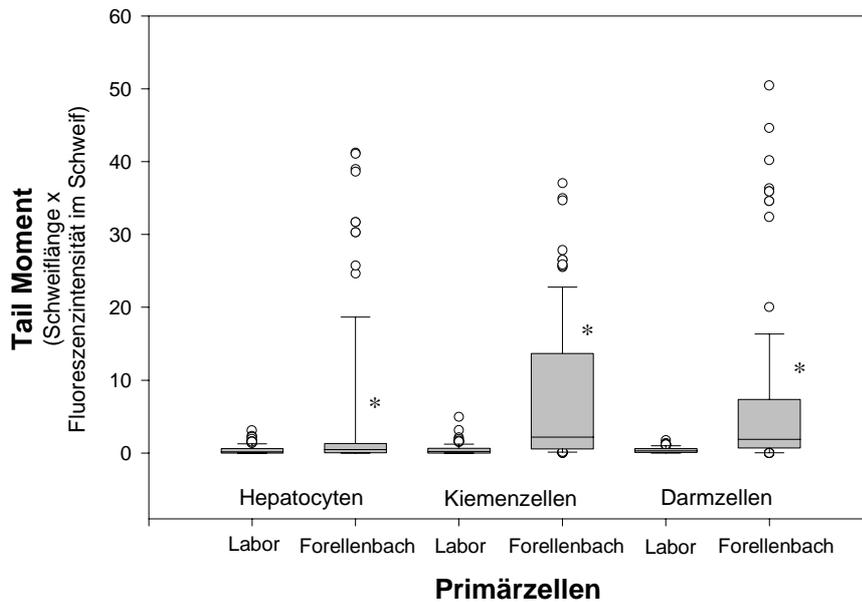
Fangdatum	Versuchstiere	Zelltypen		
		Hepatocyten	Kiemenzellen	Darmzellen
14.07.98	Kontrolle	0.312	0.530	-
	Wildfang	0.613*	2.042*	-
23.07.98	Kontrolle	0.441	0.440	0.375
	Wildfang	0.379	0.860*	1.165*
04.08.98	Kontrolle	0.265	0.635	0.341
	Jährlinge	0.898*	2.389*	1.713*
	Dreijährige	2.032*	2.586*	2.206*
08.10.98	Kontrolle	0.298	0.302	0.456
	Wildfang	2.127*	2.051*	3.455*
11.10.98	Kontrolle	0,351	0,353	0,454
	Wildfang	0,401	0,883*	0,897*
14.10.98	Kontrolle	0,204	0,084	-
	Wildfang	0,337	0,108	-
20.10.98	Kontrolle	0,428	0,396	-
	Wildfang	0,437	0,583*	-

\*) Zellpool signifikant verschieden von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* ( $p < 0.05$ ) in Kombination mit der *Dunnett's* Methode (Sigma Stat 2.03).

**3.6.2.2 Nachweis von DNA-Schäden in Fischen aus kleinen Fließgewässern**

In einem weiteren unabhängigen Experiment wurden drei Bachforellen aus dem Forellenbach nördlich von Waldhilsbach (südlicher Odenwald) unterhalb der Einleitungsstelle einer Kläranlage für ein Klinikum gefangen.

Für die Bachforellen zeigte sich ein ähnliches Bild wie für die anderen Freilandfänge. In allen drei Zelltypen traten statistische signifikante Unterschiede zu den *Tail Moment*-Werten der Kontrollen auf (Abb. 69 und Tab. 30), die bei den Kiemenzellen die größte Ausprägung erreichte.



**Abb. 69:** Vergleich über die genotoxische Belastung verschiedener Organe in Bachforellen aus dem Forellenbach und der Laborhaltung. Dargestellt ist das Ergebnis des 20.8.1998. \* Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA on ranks* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der *Dunnnett's Methode*; Sigma Stat 2.03).

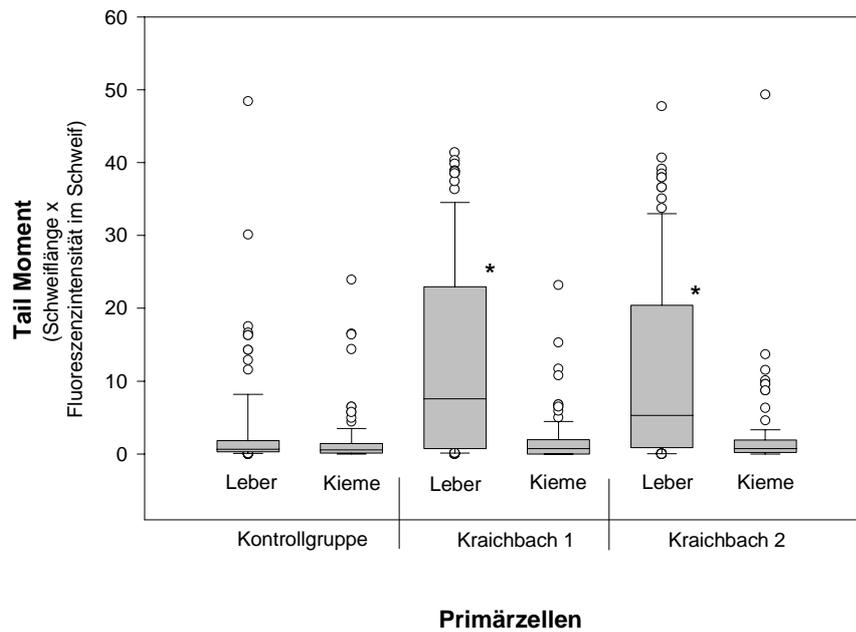
**Tab. 30:** *In vivo*-Versuche mit isolierten Primärzellen aus der Bachforelle: Medianwerte der statistischen Auswertung.

Fangdatum	Versuchstiere	Zelltypen		
		Hepatocyten	Kiemenzellen	Darmzellen
20.08.98	Kontrolle	0.180	0.242	0.294
	Wildfang	0.490*	2.175*	1.880*

\*) Zellpool signifikant verschieden von der Kontrolle nach *One Way ANOVA ON RANKS* ( $p < 0.05$ ) in Kombination mit der *Dunnnett's Methode* (Sigma Stat 2.03)

In einem weiteren Experiment wurden Stichlinge aus dem Kraichbach im Rahmen einer ökologischen Bestandsaufnahme untersucht. Zu Zeiten ungünstiger Wasserführung kann das Wasseraufkommen im Kraichbach zu 80 % aus geklärten Abwässern bestehen, des weiteren entwässert der Bach die land-

wirtschaftlich intensiv genutzte Gemarkung Hockenheim. Die faunistische Bestandaufnahme zeigte demzufolge auch hauptsächlich das Vorkommen unempfindliche Ubiquisten auf (*Maleri, persönl. Mitteilung*). Im Comet Assay auf genotoxische Belastung untersucht wurden Hepatocyten und Kiemenzellen aus 6 Stichlingen, wobei die Organe von jeweils 3 Tieren gepoolt wurden. Als Kontrollgruppe dienten Stichlinge aus dem gleichen Gewässer, die vorher 5 Wochen im Labor gehältert worden waren. Während die Kiemenzellen keine der untersuchten Gruppen erhöhte Tail Moment-Werte aufwiesen und sich nicht von der Laborgruppe unterschieden, zeigten die Hepatocyten von beiden Kraichbachgruppen deutliche Schweifbildung, die resultierenden Tail Moment-Werte unterschieden sich nicht nur signifikant von den Kontrollwerten sondern repräsentieren für *In vivo* – Untersuchungen mit Fischen hohe Werte (Abb. 70 und Tab. 31).



**Abb. 70:** Vergleich über die genotoxische Belastung von Stichlingen aus dem Kraichbach und der Laborhaltung. \*) Signifikant verschieden von der Kontrolle nach *ANOVA on ranks* (Kruskal-Wallis in Kombination mit der *Dunnnett`s Methode*; Sigma Stat 2.03).

**Tab. 31:** *In vivo*-Versuche mit isolierten Primärzellen aus dem Stichling: Medianwerte der statistischen Auswertung.

Datum	Zelltypen	Versuchstiere		
		Kontrolle	Kraichbach 1	Kraichbach 2
27.09.99	Hepatocyten	0,658	7,588*	5,322*
	Kiemenzellen	0,567	0,734	0,724

\*) Zellpool signifikant verschieden von der Kontrolle nach *One Way Anova on Ranks* ( $p < 0.05$ ) in Kombination mit der *Dunnnett`s Methode* (Sigma Stat 2.03)

### 3.7 Der Mikronukleus Test

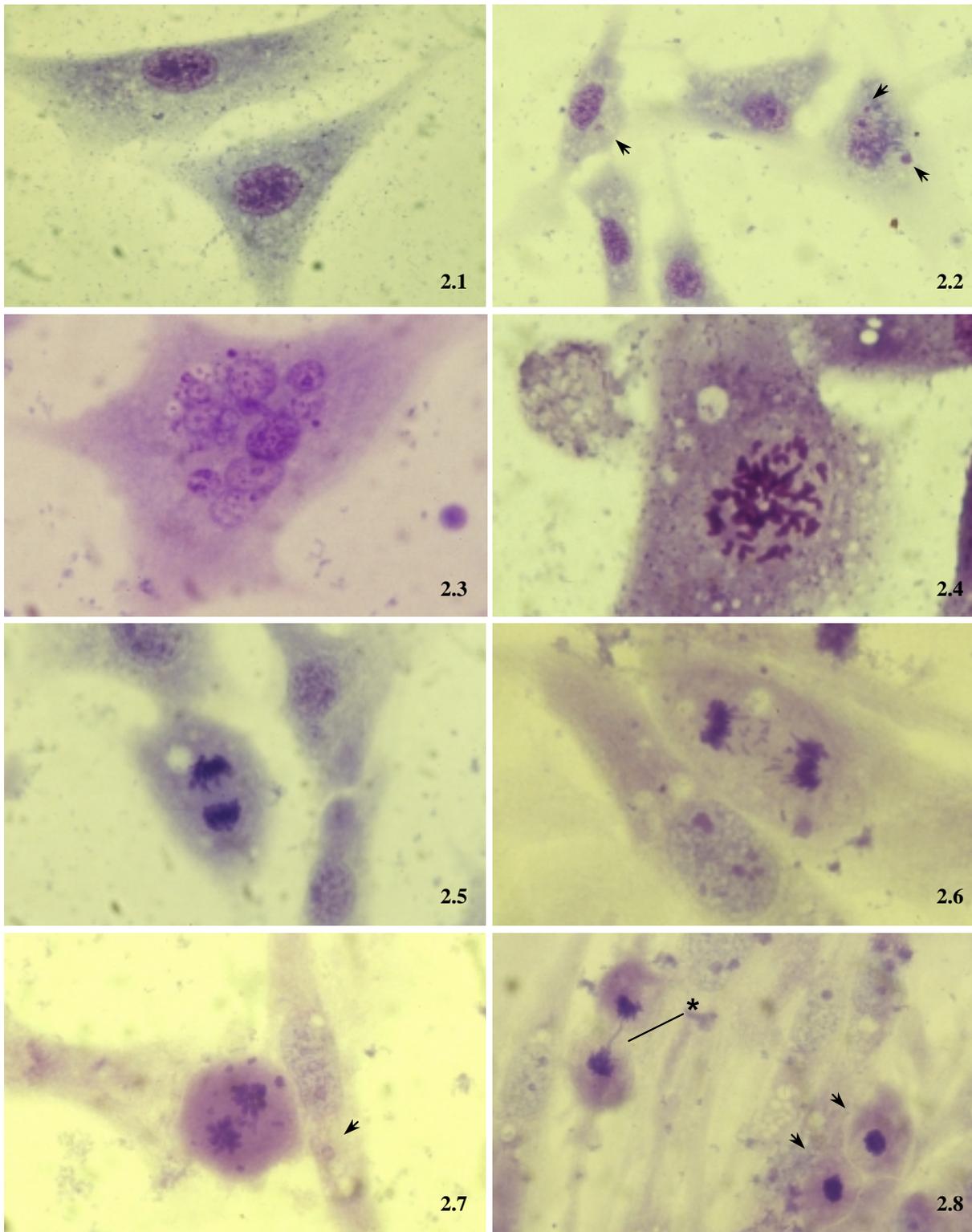
#### 3.7.1 Vergleichende Untersuchungen zur Auswirkung der Belastung von RTG-2 Zellen mit gentoxischen Substanzen im Mikronukleus Test

Als vergleichenden Genotoxizitätstest zum Comet Assay wurde der Mikronukleus Test mit RTG-2 Zellen durchgeführt. Als Modellsubstanzen wurden hierbei *4-Nitroquinolin-N-oxid*, *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* sowie *Benzo[a]pyren* in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Die Zellen wurden für 20 h mit den gentoxischen Substanzen belastet und dann, nach Mediumwechsel, für weitere 72 h ohne gentoxische Substanz inkubiert. Diese lange Nachinkubation ist notwendig, damit sich statistisch gesehen jede Zelle einmal unter Schadstoffeinfluß geteilt hat. Nach Fixieren und Anfärben wurden die Präparate bei 1220 x Vergrößerung am Mikroskop ausgewertet (Bildtafel 2, Abb. 2.1). Kriterien für einen gültigen Mikrokern waren: komplette Trennung vom Hauptkern, gleiche Anfärbbarkeit, sowie gleiche Schärfenebene (Bildtafel 2, Abb. 2.2). Wurden in einer Zelle 2 oder 3 Mikrokern identifiziert, so wurde das Ereignis nur als ein positiver Befund gewertet. Nicht mit in die Auswertung einbezogen wurden Zellen mit in viele Teilkern zerfallenem Kern (Bildtafel 2, Abb. 2.3). Für *4-Nitroquinolin-N-Oxid* (4-NQO) konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung mit signifikanten Unterschieden zur Kontrolle ab 19 µg/L erstellt werden (Abb. 71). Dieses Ergebnis liegt um eine Zehnerpotenz über der Nachweisgrenze im Comet Assay. Die höchste getestete Konzentration mit 1,9 mg/L (*nicht graphisch dargestellt*) konnte nicht ausgewertet werden, da die Zellen hier quantitativ (> 90 %) morphologische Veränderungen wie Kernveränderungen, Chromatinverdichtungen, Cytoplasmkondensation (stärkere Anfärbbarkeit), Abrunden der Zellen sowie Blebbing aufzeigten (siehe Bildtafel 4). Dieses läßt auf die Induktion apoptotischer Prozesse schließen.

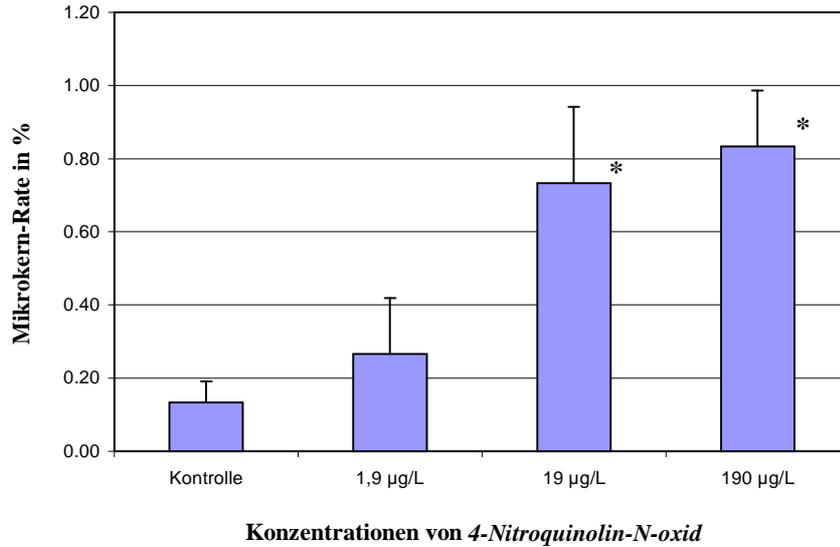
Für *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* (MNNG) konnte zwar ebenfalls eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufgezeigt werden, jedoch erwiesen sich diese Unterschiede als nicht signifikant (Abb. 72). Auch dieses Gentoxin induzierte in der höchsten getesteten Konzentration von 40 mg/L apoptotische Veränderungen bei über 90 % der belasteten Zellen (*nicht graphisch dargestellt*).

Die Wirkung von *Benzo[a]pyren* konnte nur in einem Versuch getestet werden. Auch hier zeigt sich die Andeutung einer Dosis-Wirkungsbeziehung (Abb. 73) mit einer Verdopplung der Mikrokernrate ab 25 µg/L und damit eine Zehnerpotenz unterhalb der Nachweisgrenze im Comet Assay. Hier können nur Versuchswiederholungen Aufschluß auf die Nachweisgrenze genotoxischer Signale im Mikronukleus-Test mit RTG-2 Zellen bringen. Im Unterschied zu den vorher untersuchten Substanzen 4-NQO und MNNG konnte im gesamten getesteten Konzentrationsbereich keine toxische Wirkung festgestellt werden.

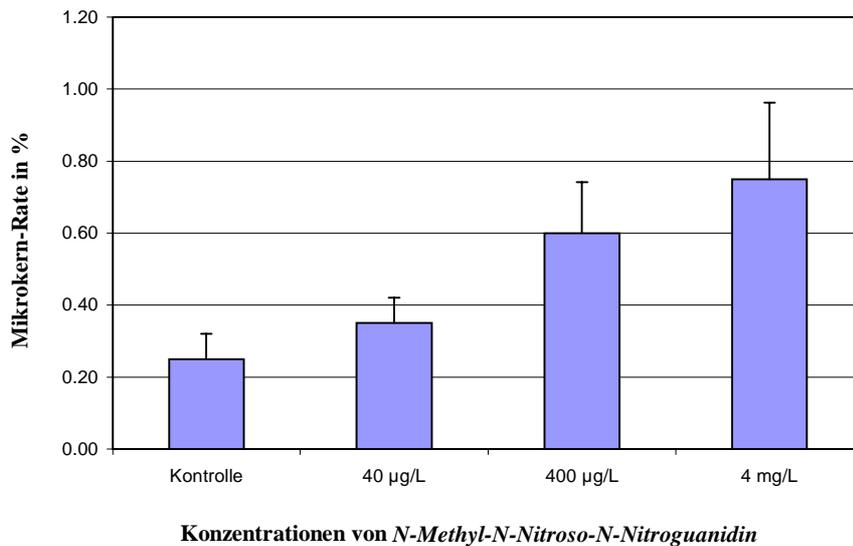
Neben der Induktion von Mikrokernen konnte insbesondere in den Konzentrationen von 19 µg/L und 190 µg/L für *4-Nitroquinolin-N-oxid* sowie 400 µg/L und 4 mg/L für *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* eine Häufung aberranter Teilungsstadien beobachtet werden (Bildtafel 2, Abb. 2.6 – 2.8). Gleichzeitig nahm die Teilungsaktivität in den belasteten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle ab, ausgebildete Metaphase- und Anaphaseplatten (Abb. 2.4) sowie Zellen in unterschiedlichen Stadien der Kern- und Zellteilung (Abb. 2.5 u. 2.8) wurden nur vergleichsweise selten beobachtet, eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ließ sich jedoch nicht erkennen.



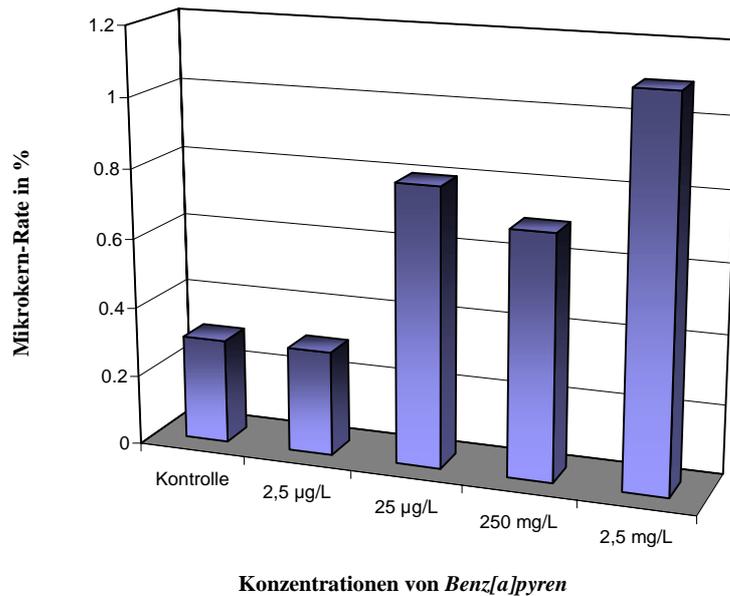
**Bildtafel 2** Mikrokern-Bildung in belasteten RTG-2 Zellen (GIEMSA-Färbung): **2.1:** Kontrollzellen (Original 860 x).. **2.2:** RTG-2 Zellen mit Mikrokernen (*Pfeile*) nach Belastung mit 190 µg/L 4-Nitroquinolin-*N*-oxid (4-NQO) für 20 h sowie anschließender Postinkubation für 72 h (Original 540 x). **2.3:** RTG-2 Zelle zeigt Kernzerfall, nicht berücksichtigt in Mikrokernuntersuchungen (Original 860 x). **2.4:** Zelle mit kondensierten Chromosomen, Kernhülle bereits aufgelöst (Original 1220 x). **2.5:** Metaphaseplatte: Aufteilung der Chromosomen (Original 540 x). **2.6 – 2.8:** Aberrante Teilungsstadien, gehäuft in den 4-NQO-Belastungskonzentrationen (Original 860 x, 540 x, 540 x): **2.6:** Chromosomen nicht vollständig aufgeteilt. **2.7:** Deutlich aberrantes Mitosestadium; *Pfeil* = Mikrokern; **2.8:** Zellteilung weitgehend vollzogen, eine „Chromosomenbrücke“ (\*) bleibt bestehen; *Pfeile*: komplette Kern- und Zellteilung.



**Abb. 71:** Mikronukleus-Häufigkeit in RTG-2 Zellen, die mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* für 20 h belastet und für 72 h nachinkubiert wurden. Daten aus 3 Experimenten, pro Konzentration wurden 1000 Zellen ausgewertet. \*) Signifikant verschieden von der Kontrolle mit  $p < 0,05$  nach *ONE WAY ANOVA* in Kombination mit der Dunnett's Methode (Sigma Stat 2.03).



**Abb. 72:** Mikronukleus-Häufigkeit in RTG-2 Zellen, die mit *N-Methyl-N-Nitroso-N-Nitroguanidin* für 20 h belastet und für 72 h nachinkubiert wurden. Daten aus 2 Experimenten, pro Konzentration wurden 1000 Zellen ausgewertet. \*) Signifikant verschieden von der Kontrolle mit  $p < 0,05$  nach *ONE WAY ANOVA* in Kombination mit der Dunnett's Methode, Sigma Stat 2.03.

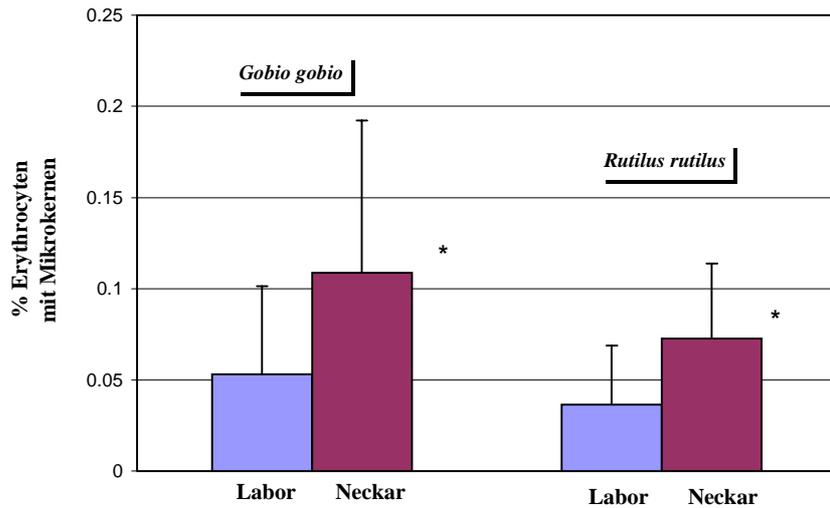


**Abb. 73:** Mikronukleus-Häufigkeit in RTG-2 Zellen, die mit *Benzo[a]pyren* für 20 h belastet und für 72 h nachinkubiert wurden. Daten aus 1 Experiment, pro Konzentration wurden 1000 Zellen ausgewertet.

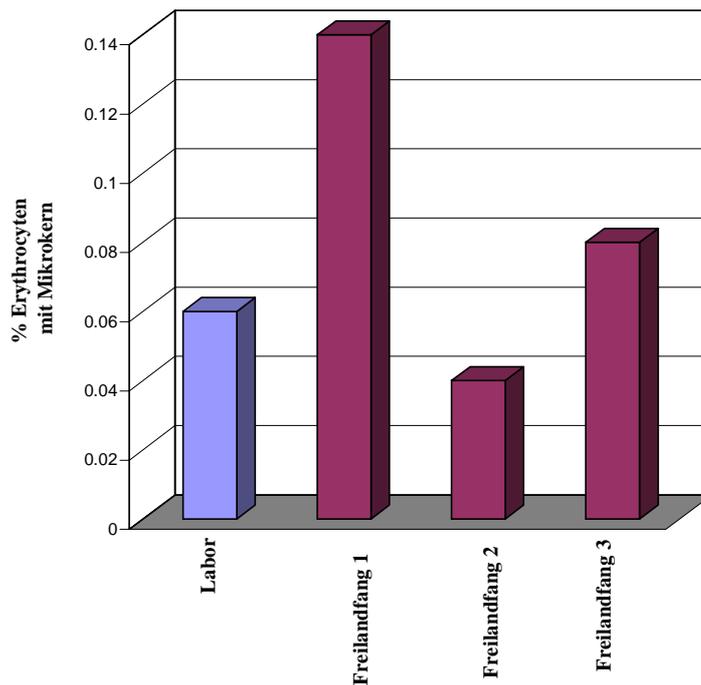
### 3.7.2 Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Fischen im Neckar mit dem Mikronukleus-Test

Der Mikronukleus Test wurde auch zur Erfassung der genotoxischen Belastung der untersuchten Neckarfische wurde der Mikronukleus-Test durchgeführt. Von den Fischen, die im Comet-Assay untersucht wurden, wurden Blutausstriche angefertigt und auf Mikrokerne untersucht (Bildtafel 3, Abb. 3.1 – 3.6). Hierfür wurden nur die reifen Erythrocyten verwendet, Lymphocyten (Abb. 3.1 u. 3.6) sowie weitere Blutzellen wurden nicht in die Untersuchung einbezogen. Pro Fisch wurden mindestens 2000 (Neckarfisch-Untersuchungen) bzw. 5000 Erythrocyten (Bachforellen, Bildtafel 3, 3.9) ausgezählt. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie Blutausstriche von 17 Gründlingen (Bildtafel 3, Abb. 3.8) und 11 Rotaugen (Abb. 3.7) untersucht. Aus dem Forellenbach wurden 3 Tiere entnommen und mit einer Bachforelle aus dem Labor verglichen (Abb. 3.9).

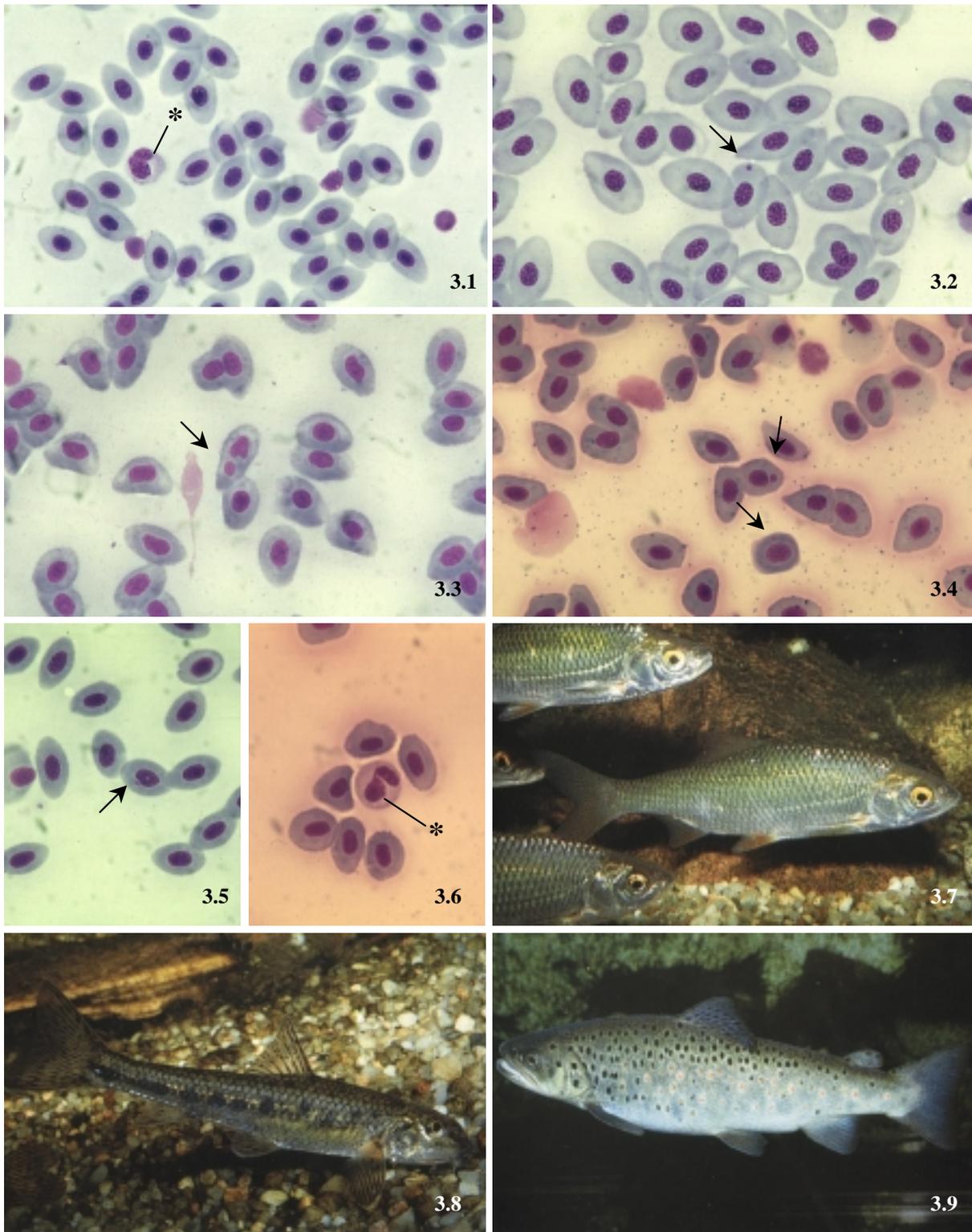
Die Anzahl der zweifelsfrei identifizierten Mikrokerne war bei allen untersuchten Fischen recht gering und erreichte den Maximalwert von 0,35 % der untersuchten Erythrocyten in einem Gründling (*Gobio gobio*) aus dem Neckar unterhalb von Heidelberg. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle zeigten die Gründlinge sowie in noch etwas stärkerem Maße die Rotaugen aus dem Neckar eine deutliche Erhöhung des Vorkommens von Mikrokerne pro eintausend Erythrocyten. Für beide Fischarten ist die Mikrokern-Rate, wenn auch niedrig, so doch statistisch signifikant höher als in den jeweiligen Labortieren, die als Kontrolle dienten. Wie die Standardabweichungen in Abbildung 74 belegen, war die interindividuelle Variabilität hoch, die Abbildung 75 illustriert dies sehr deutlich, eine untersuchte Bachforelle zeigte eine geringere Mikrokern-Frequenz als der Kontrollfisch, während die zweite Bachforelle einen vergleichsweise hohen Wert erreichte. Für weitere Aussagen bezüglich der Bachforellen ist die Anzahl der untersuchten Tiere zu gering. Für alle 3 Arten konnte aber eine Übereinstimmung mit den Daten aus dem Comet Assay aufgezeigt werden, mit dem eine leichte, aber signifikante Erhöhung der DNA-Fragmentierung wiederholt in verschiedenen Organen der Freilandtiere nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 3.6.2).



**Abb. 74:** Untersuchungen zur gentoxischen Belastung von Fischen (*Gobio gobio* und *Rutilus rutilus*) aus dem Neckar; pro Fisch wurden 2000 Erythrocyten ausgewertet. \* Signifikant verschieden von der jeweiligen Laborkontrolle nach Mann-Whitney-RANK SUM-TEST für *Gobio gobio* mit  $p < 0,026$  und dem T-TEST für *Rutilus rutilus* mit  $p < 0,032$ .



**Abb. 75:** Untersuchungen zur gentoxischen Belastung von Fischen aus dem Freiland am Beispiel der Bachforelle, *Salmo trutta f. fario* aus dem Forellenbach bei Heidelberg: Darstellung interindividueller Variation in der Merkmalsausprägung Mikronukleus. Es wurden 3 Fische aus dem Forellenbach untersucht, pro Fisch wurden 5000 Erythrocyten ausgewertet.



**Bildtafel 3:** Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Freilandfischen. Ermittelt wurde die Mikrokern-Rate pro tausend untersuchter Zellen in reifen Erythrocyten aus Blutausstrichen. **3.1:** Blutzellen Rotauge, Kern mit stark kondensiertem Chromatin, umgeben von organellenarmem Cytoplasma; \*) Lymphocyte (Original 860 x). **3.2:** Erythrocyten aus einem Neckar-Rotauge, *Pfeil* markiert einen Mikrokern (Original 860 x). **3.3:** Kerndeformation (*Pfeil*), Blutausstrich eines Gründlings aus dem Neckar (Original 860 x). **3.4:** Mikrokernhaltige Erythrocyten (*Pfeile*) aus einem Gründling aus dem Neckar (Original 860 x). **3.5:** Mikrokern (*Pfeil*) Bachforellen – Erythrocyt, (Original 860 x). **3.6:** \*) Lymphocyt, Blutausstrich Gründling (Original 860 x). **3.7:** *Rutilus rutilus*, L.: Rotauge, Plötze, Cyprinidae. **3.8:** *Gobio gobio*, L.: Gründling, Cyprinidae. **3.9:** *Salmo trutta f. fario*, L.: Bachforelle, Salmonidae.

### 3.8 Morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen von RTG-2 Zellen unter dem Einfluß genotoxischer Belastung

#### 3.8.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen

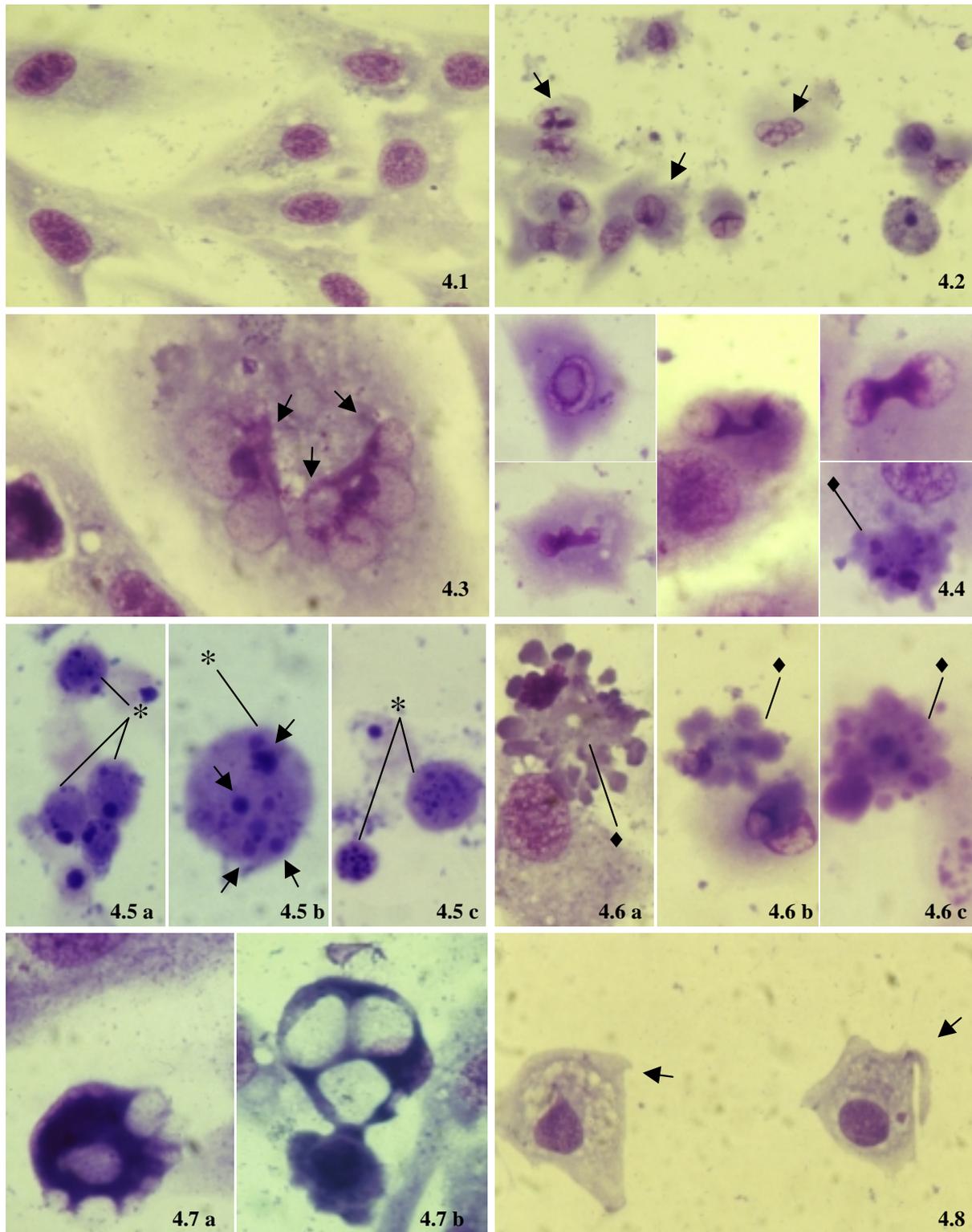
In dieser Studie wurden RTG-2-Zellen mit den gleichen Konzentrationen von *4-Nitroquinolin-N-oxid* mit 0.0019 mg/L bis 19 mg/L belastet wie in den Genotoxizitätsuntersuchungen mit dem Comet Assay und dem Mikronukleus Test. Zum Vergleich mit der elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden auch mit Fluoresceindiacetat / Ethidiumbromid sowie GIEMSA-gefärbte Proben herangezogen.

Die Kontrollzellen bildeten einen dichten Zellrasen, die einzelnen Zellen waren spindelförmig bis flächig gestreckt mit einigen Ausläufern. Dieses konnte mit den GIEMSA-Proben gezeigt werden (Bildtafel 4, 4.1). Häufig konnten Zellen in den verschiedenen Teilungsstadien beobachtet werden. Mit der Fluoresceindiacetat-Färbung konnte – nach Ablösen der Zellen mittels Trypsin – eine Vitalität der Zellen von > 95% nachgewiesen werden (Bildtafel 5, Abb. 5.1 u. 5.2).

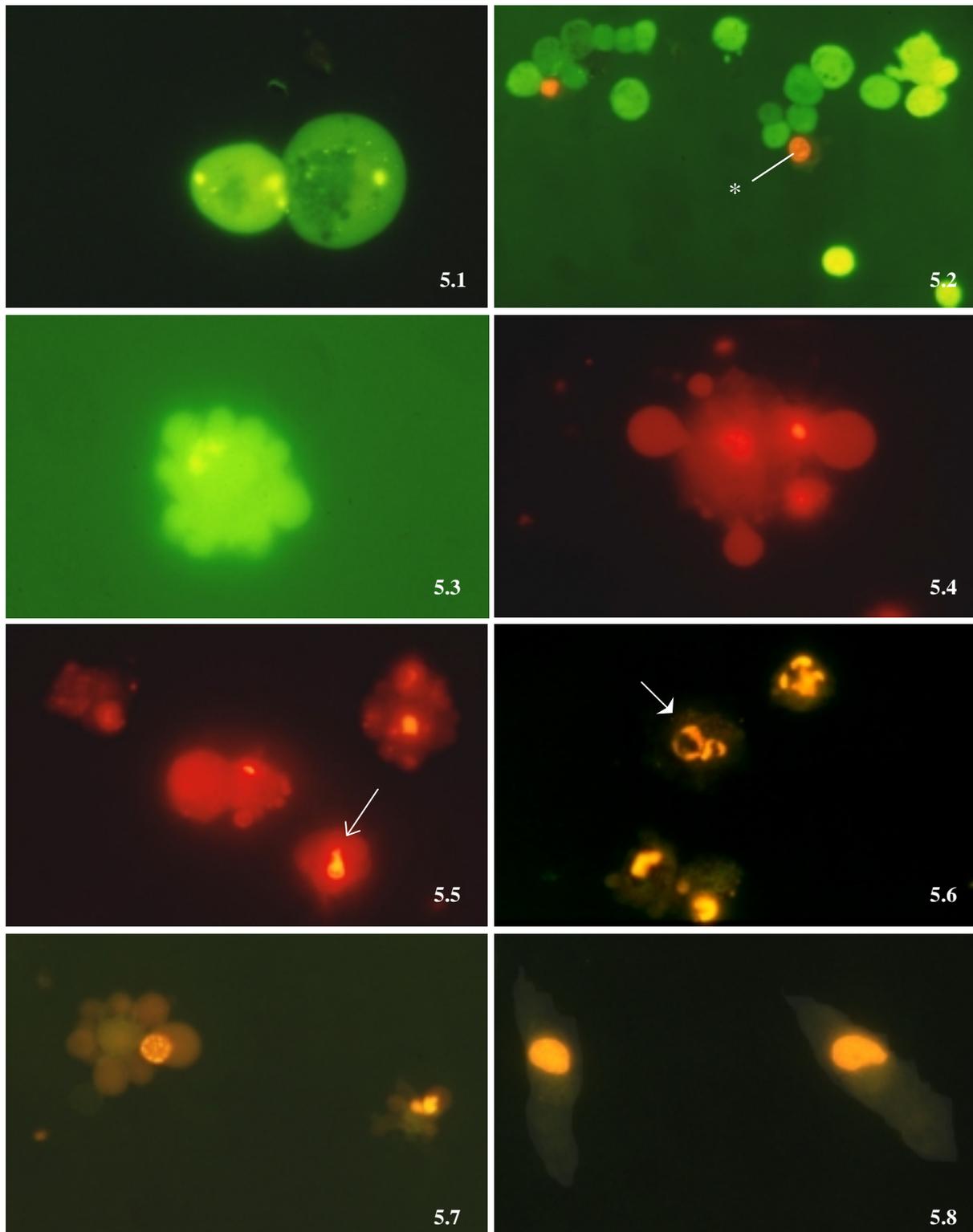
Nach 72 h Exposition gegenüber 1.9 mg/L *4-Nitroquinolin-N-oxid* wiesen die GIEMSA-gefärbten Zellen drastische Veränderungen auf, die auf die Induktion apoptotischer Prozesse hindeuten. Der Zellrasen hatte sich aufgelöst, selten fanden sich kleine Aggregate stark geschädigter Zellen. Die Zellen hatten sich zusammengezogen, z.T. abgekugelt und waren stärker angefärbt (Bildtafel 4, Abb. 4.2). Die Zellkerne wiesen Bereiche mit kondensiertem Heterochromatin und eine sehr unregelmäßige Form auf. Wie die Abbildungen 4.2 – 4.4 der Bildtafel 4 zeigen, ist die Kernform von der Chromatinkondensation beeinflusst. Die in weiteren Stadien beobachtete Kernfragmentierung (Abb. 4.5, 4.6) wird über Einschnürungen des Kerns durch Chromatinkondensation verursacht. Als Endstadium zeigten sich entweder stark gefärbte, abgekugelte Zellen mit mehreren bis vielen Kernfragmenten (Abb. 4.5 a-c, mehr als 90 % der untersuchten Zellen) oder die belasteten Zellen bildeten zahlreiche Auswölbungen, häufig als ‚blebbing‘ beschrieben (Bildtafel 4, Abb. 4.6 a-c, weniger als 10 % der untersuchten Zellen).

Das ‚Blebbing‘ der RTG-2 Zellen unter massiver genotoxischer Belastung konnte auch mit der Fluoresceindiacetat / Ethidiumbromid-Färbung gezeigt werden (Bildtafel 5, Abb. 5.3 – 5.5, 5.7). Ein großer Teil dieser Zellen zeigte stark kondensierte Kerne, die mit Ethidiumbromid angefärbt waren - ein Hinweis auf den Verlust der Membranintegrität dieser Zellen -, andere zeigten reine Fluorescein-induzierte Fluoreszenz (Abb. 5.3). Abbildung 5.5 zeigt einen Kern, der unter Chromatinkondensation seine Form veränderte. Als weiteres Apoptose-Merkmal zeigt sich in Abbildung 5.6 marginalisiertes Heterochromatin. Im Gegensatz dazu weist eine abgestorbene Zelle im Kontrollansatz im Ethidiumbromid-gefärbten Kern keine Veränderungen auf. Sowohl in der GIEMSA- als auch in der FDA-Färbung ergab die Belastung mit 19 mg/L *4-Nitroquinolin-N-oxid* ein deutlich anderes Bild. Die Zellen waren abgestorben und zeigten keine Kern- und Formveränderungen (Abb. 4.8 u. 5.8). Der noch ausgebildete Zellrasen ließ sich durch leichtes Spülen mit einer Pipette ablösen, der trotzdem durchgeführte Trypsinverdau im FDA-Ansatz führte zu keinem Abkugeln der Zellen.

Deutliche Veränderungen der Zellmorphologie ergab auch die Belastung mit 40 mg/L *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin*. Die Zellen kondensierten sich stark und waren so stark angefärbt, daß bis auf das Vorhandensein großer Vakuolen keine strukturellen Details erkennbar waren (Bildtafel 4, Ab. 4.7a,b).



**Bildtafel 4:** Morphologische Veränderungen von RTG-2 Zellen nach Belastung mit 4-Nitroquinolin-N-oxid (4-NQO) für 3 Tage (**4.1 – 4.6:** 1.9 mg/L 4-NQO); GIEMSA-Färbung: **4.1:** Kontrollzellen. **4.2:** Beginnende Kernveränderungen, Chromatinkondensation; Zellen schrumpfen, Cytoplasma färbt sich stärker an (*Pfeil*). **4.3:** Chromatinkondensation, Kern kurz vor der Fragmentierung. (*Pfeil*) **4.4:** Verschiedene Kernmodifikationen (*Pfeil*); **◆** ‚Blebbing‘. **4.5 a-c:** Endstadium von > 90 % der Zellen nach Belastung: \*) Kern fragmentiert, Fragmente mit stark kondensiertem Chromatin (*Pfeile*, **4.5 b**), Zellen abgerundet, geschrumpft mit stark färbendem Cytoplasma. **4.6 a-c:** **◆** ‚Blebbing‘, bei < 10 % der Zellen als beobachtetes Endstadium. **4.7 a, b:** Zellveränderung nach Belastung mit 40 mg/L MNNG. **4.8:** Belastung mit 19 mg/L 4-NQO, Zelltod ohne sichtbare morphologische Veränderungen, Zellen lösen sich vom Untergrund (*Pfeile*). **4.1, 4.2, 4.4 – 4.6, 4.8:** Original 540 x, **4.3** u. **4.7:** Original 860 x.



**Bildtafel 5:** Morphologische Veränderungen von RTG-2 Zellen nach Belastung mit 4-Nitroquinolin-N-oxid für 3 Tage (Färbung *Fluoresceindiacetat-Ethidiumbromid*). **5.1** und **5.2:** Kontrollzellen nach Resuspendierung über Trypsinverdau; lebende Zelle färbt grün = enzymatische Umsetzung des FDA \*) Tote Zelle, Cytoplasma ohne enzymatische Aktivität, Kern mit Ethidiumbromid gefärbt (**5.1:** Original 540 x, **5.2:** 340 x). **5.3:** Blebbing nach 3-tägiger 4-NQO-Belastung (Original 540 x). **5.4** und **5.5:** Blebbing, Kerndeformation (*Pfeil*), (Original 860 x und 540 x). **5.6:** Chromatinkondensation (*Pfeil*) in belasteten Zellen (Original 540 x). **5.7:** Blebbing und Chromatinkondensation im Kern (Original 540 x). **5.3** – **5.7:** Belastet mit 1.9 mg/L 4-NQO für 3 Tage. **5.8:** Nach Belastung mit 19 mg/L 4-NQO: abgestorbene Zellen ohne morphologische Veränderungen (Original 540 x)

### 3.8.2 Ultrastrukturelle Untersuchungen

#### *Kontrollen*

Die Untersuchung der Ultrastruktur zeigte für die Kontrollzellen, die einen dichten Zellrasen gebildet hatten, folgendes Bild: Der Zellkern hatte zumeist eine unregelmäßige Form ohne prominenten Nukleolus und enthielt wenig Heterochromatin. Rauhes Endoplasmatisches Retikulum (RER) war in wenigen Zisternen, zum Teil parallel ausgerichtet, vorhanden. Glattes Endoplasmatisches Retikulum (SER) war in allen Zellen deutlich zu erkennen, ebenso der Golgi-Apparat, dessen einzelne Dictyosomen aus mehreren langgestreckten, aktiven Zisternen bestanden.

Die Mitochondrien waren in Form und Ausprägung der Cristae variabel. Lysosomale Elemente und Myelinkörper konnten regelmäßig beobachtet werden (Bildtafel 6, Abb. 6.1). In einigen Zellen waren große, parallel ausgerichtete Filamentbündel erkennbar (Abb. 6.2). Auch die Kondensation der DNA zu deutlich erkennbaren Chromosomen mit gleichzeitiger Auflösung der Kernmembran im Zuge der Zellteilung ließ sich beobachten (Abb. 6.3).

#### *Belastung über 2h*

Nach 2 h Belastung mit 4-NQO-Konzentrationen von 1,9 µg/L bis 1,9 mg/L zeigten sich in der Übersicht keine Unterschiede, die Zellen bildeten weiterhin in allen Konzentrationen einen dichten Zellrasen aus, und es konnten nur geringe ultrastrukturellen Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden (*keine Abb.*). Myelinwirbel und lysosomale Elemente traten vermehrt auf, eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung war aber nicht zu erkennen.

#### *Belastung über 72 h*

Die Kontrollzellen zeigten das für oben beschriebene Bild spindelförmiger Zellen, die einen dichten Zellrasen ausgebildet haben (Bildtafel 6,6.1 – 6.3). Von diesen kaum zu unterscheiden waren die beiden niedrigsten Konzentrationen mit 1,9 und 19 µg/L 4-Nitroquinolin-N-oxid. Lediglich eine leichte Zunahme der lysosomalen Elemente war zu beobachten (Tab. 32).

In der nächsthöheren Konzentration von 190 µg/L zeigte sich der Zellrasen über weite Strecken als intakt, ultrastrukturelle Unterschiede zur Kontrolle waren nicht ersichtlich. In den Zellrasen integriert konnten allerdings Zellen beobachtet werden, deren Kerne marginalisiertes Heterochromatin und eine stark unregelmäßige Form aufwiesen. Außerdem zeigte sich ein prominenter Nukleolus (Bildtafel 7, 7.1). In diesen Zellen konnten auch große RER-Wirbel festgestellt werden (Abb. 7.1). Bild 7.2 zeigt einen Kern, der sich vergleichbar den Ergebnissen aus der GIEMSA-Färbung (Bildtafel 4) unter dem Einfluß der Chromatinkondensation einzuschnüren beginnt. In Zellen mit deutlich veränderter Kernmorphologie konnte zudem eine Zunahme lysosomaler Elemente und des Glatten Endoplasmatischen Retikulums festgestellt werden (Abb. 7.3).

Die 72 h Exposition gegenüber 1,9 mg/L 4-Nitroquinolin-N-oxid zeigte ultrastrukturell drastische Veränderungen. Der in den Kontrollen ausgebildete Zellrasen hatte sich fast komplett aufgelöst, in den wenigen verbliebenen Zellaggregaten zeigten die Zellen die für 190 µg/L 4-NQO-Belastung beschriebenen Kernveränderungen (Abb. 7.4). Einige Zellen bildeten z.T. große Ausläufer, die Organellen enthielten und deren schmale Basis eine bevorstehende Abschnürung vermuten läßt (Bildtafel 8, Abb. 8.1 – 8.3). Weitaus häufiger waren kleine abgekugelte Zellen, mit Kernfragmenten, noch intakten Mitochondrien und RER-Zisternen, aber auch vielen lysosomalen Elementen zu beobachten. Zusätzlich war eine deutliche Peroxisomen-Proliferation erkennbar (Bildtafel 9, Abb. 9.1 u. 9.2 u. Tab. 32).

Abb. 9.3 zeigt verschiedene Membranstapel sowie kondensiertes Chromatin, umgeben von einer Kernmembran. Hierbei handelt es sich um Kernfragmente, wobei, bei der Kernfragmentierung noch weitere Organellen inkorporiert wurden. Abb. 10.1 zeigt die in unterschiedlichen Stadien verlaufende

Reaktion auf die genotoxische Belastung: eine Zelle mit beginnenden Kern- und Organellenveränderungen, während die obere schon ohne erkennbare zelluläre Organisation ist. In dieser Konzentration ließen sich weiterhin viele kleine Zellfragmente mit Kernfragmenten und großen Membranwirbeln, die häufig mehrschichtige Scheiden bildeten, nachweisen (Bildtafel 11, Abb. 11.1 und 11.2). Als Endstadium zeigten sich dann Zellen / Zellreste, in denen Kernfragmente noch erkennbar waren, die weitere zelluläre Organisation aber völlig aufgelöst war (Abb. 11.3 u. 11.4). Die Kernfragmente zeigen charakteristisch Aufblähungen der Kernmembran (Abb. 11.5).

**Tab. 32:** Ultrastrukturelle Untersuchung von RTG-2 Zellen nach Belastung mit verschiedenen Konzentrationen von *4-Nitroquinolin-N-oxid* für 72 h

		Kontrolle	1.9 µg/L	19 µg/L	190 µg/L	1900 µg/L	19000µg/L
Zelle	Spindelförmig	++++	++++	++++	+++	-	+
	Zellrasen	++++	++++	++++	+++	-	-
	Zellfragmente	-	-	-	+	+++	-
Kern	Form	var.	var.	var.	Sehr var.	Fragm.	var
	Heterochromatin	+	+	+	++	+++	+++
Mitochondrien	Menge	++	++	++	++	+	-
	Heterogenität	++	++	++	++	++	-
	Assoz. mit ER.	+	+	+	+	-	-
Peroxisomen:	Menge	+	+	+	++	+++	-
	Heterogenität	+	+	+	+	+	-
RER	Menge	++	++	+	++	++	-
	Stapelbildung	+	+	+	+	-	-
	Parallele Zisternen	+	+	+	+	-	-
	Fragmentierung	+	+	+	+	++	-
	Wirbelbildung	+	+	+	++	+++	-
SER	Menge	++	++	++	+++	++	-
	verteilt	++	++	++	++	++	-
Golgi	Menge	++	++	++	++	+	-
	Zisternen	++	++	++	++	+	-
Lysosomen	Menge	++	++	++	+++	+++	-
	Myelin	++	++	++	+++	+++	-
	Vakuolen	++	++	++	++	+++	-
Lipid	Menge	+	+	+	+	+	-
Glykogen	Menge	+	+	+	+	+	-
++++	Merkmal sehr stark ausgeprägt oder sehr häufig				var.	variabel	
+++	stark ausgeprägt oder häufig				fragm	fragmentiert	
++	ausgeprägt oder regelmäßig vorkommend						
+	wenig ausgeprägt oder selten						
-	nicht vorhanden						

Die Abrundung und Fragmentierung der Zellen, die Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung des Kerns sowie die Auflösung der ultrastrukturellen Integrität der Organellen sind deutliche Anzeichen für einen programmierten Zelltod. In einer Konzentration von 19 mg/L ließen sich nur noch sehr wenige Zellreste nachweisen, das großflächige Absterben und damit verbundene leichte Ablösen der Zellen, wie bei der Untersuchung mit der FDA/Ethidiumbromid-Färbung beobachtet, kann hierfür als Ursache angenommen werden, da für die elektronenmikroskopische Untersuchung zahlreiche

Waschschritte nötig sind. Die wenigen verbliebenen Zellen zeigten Kerne mit kondensiertem, nicht-randständigem Chromatin (Bildtafel 12, Abb. 12.2 u. 12.4), im Gegensatz zu Kernen aus der Belastung mit 1.9 µg/L 4-NQO (Abb. 12.5).

Die übrige zelluläre Organisation war völlig aufgelöst. Hier zeigen sich deutliche Übereinstimmungen mit nekrotischen Zellen (Abb. 12.1, 12.3), wie sie im Zellrasen der Belastungskonzentrationen der niedrigeren Belastungskonzentrationen selten zu beobachten waren.

**Tab. 33:** Ultrastrukturelle Untersuchung von RTG-2 Zellen nach Belastung mit verschiedenen Konzentrationen von 4-Nitroquinolin-N-oxid für 120 h

		Kontrolle	1.9 µg/L	19 µg/L	190 µg/L	1900 µg/L	19000µg/L
Zelle	Spindelförmig	++++	++++	++++	-	-	+
	Zellrasen	++++	++++	++++	-	-	-
	Zellfragmente	-	-	-	+++	+++	-
Kern	Form	var.	var.	var.	fragm.	fragm.	var
	Heterochromatin	+	+	+	+++	+++	+++
Mitochondrien	Menge	++	++	++	+	+	-
	Heterogenität	++	++	++	++	++	-
	Assoz. mit ER.	+	+	+	-	-	-
Peroxisomen:	Menge	+	+	+	+++	+++	-
	Heterogenität	+	+	+	+	+	-
RER	Menge	++	++	+	++	++	-
	Stapelbildung	+	+	+	-	-	-
	Parallele Zisternen	+	+	+	-	-	-
	Fragmentierung	+	+	+	++	++	-
	Wirbelbildung	+	+	+	+++	+++	-
SER	Menge	++	++	++	++	++	-
	verteilt	++	++	++	++	++	-
Golgi	Menge	++	++	++	+	+	-
	Zisternen	++	++	++	+	+	-
Lysosomen	Menge	++	++	++	+++	+++	-
	Myelin	++	++	++	+++	+++	-
	Vakuolen	++	++	++	+++	+++	-
Lipid	Menge	+	+	+	+	+	-
Glykogen	Menge	+	+	+	+	+	-

++++	Merkmal sehr stark ausgeprägt oder sehr häufig	var	variabel
+++	stark ausgeprägt oder häufig	fragm	fragmentiert
++	ausgeprägt oder regelmäßig vorkommend		
+	wenig ausgeprägt oder selten		
-	nicht vorhanden		

*Belastung über 120 h*

Nach 120 h Belastung mit verschiedenen Konzentrationen von 4-Nitroquinolin-N-oxid zeigte sich ein vergleichbares Bild. Eine scharfe Grenze zwischen geringen Unterschieden zur Kontrolle und einer Effektkonzentrationen mit völlig anderem Erscheinungsbild als die Kontrollzellen konnte wieder festgestellt werden. Allerdings war jetzt auch die Konzentration mit 190 µg/L 4-Nitroquinolin-N-oxid stark betroffen (Tab. 33).

Es konnten in dieser Konzentration zwar noch kleinere Aggregate spindelförmiger Zellen beobachtet werden, aber die überwiegende Mehrzahl der Zellen hatten die oben beschriebenen drastischen Veränderungen der Zellform durch Abkugeln, Schrumpfung und ‚Blebbing‘, der zellulären Organisation mit großen RER-Wirbeln, verstärktem Vorkommen lysosomaler Elemente und Peroxisomen, und des Zellkerns mit Chromatinkondensationen und Kernfragmentierung durchgemacht, die unter 72 h Belastung für die Konzentration 1.9 mg/L beschrieben wurden.

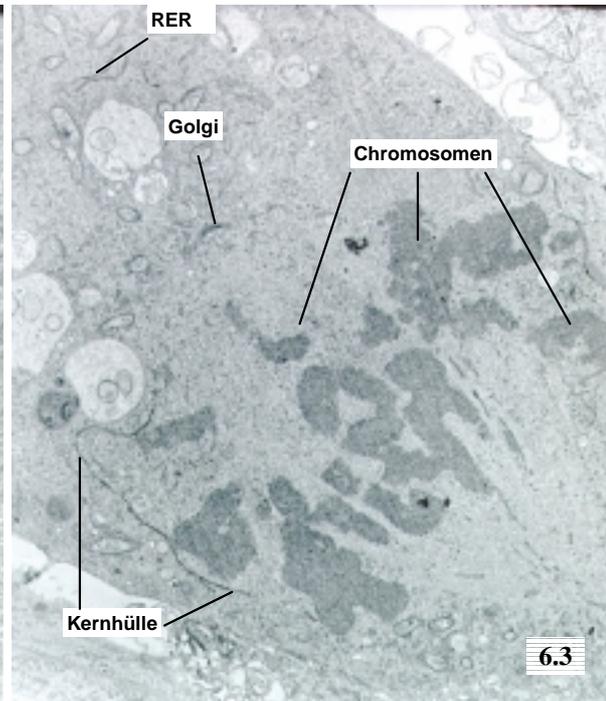
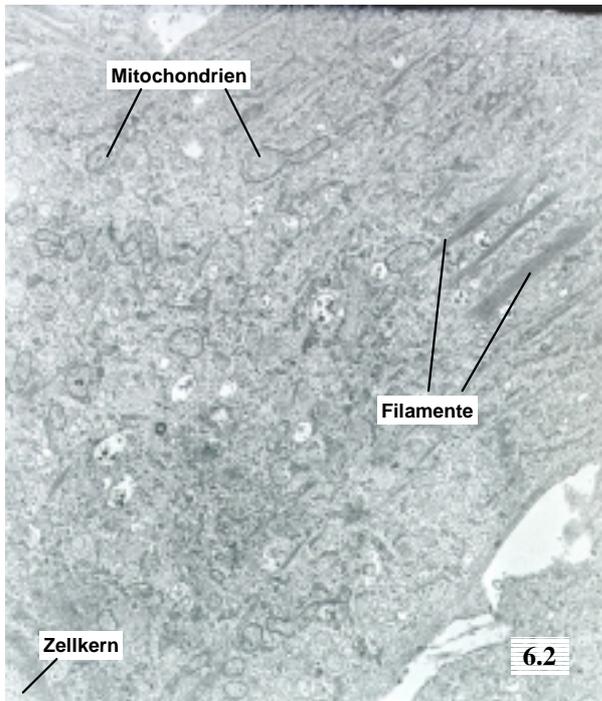
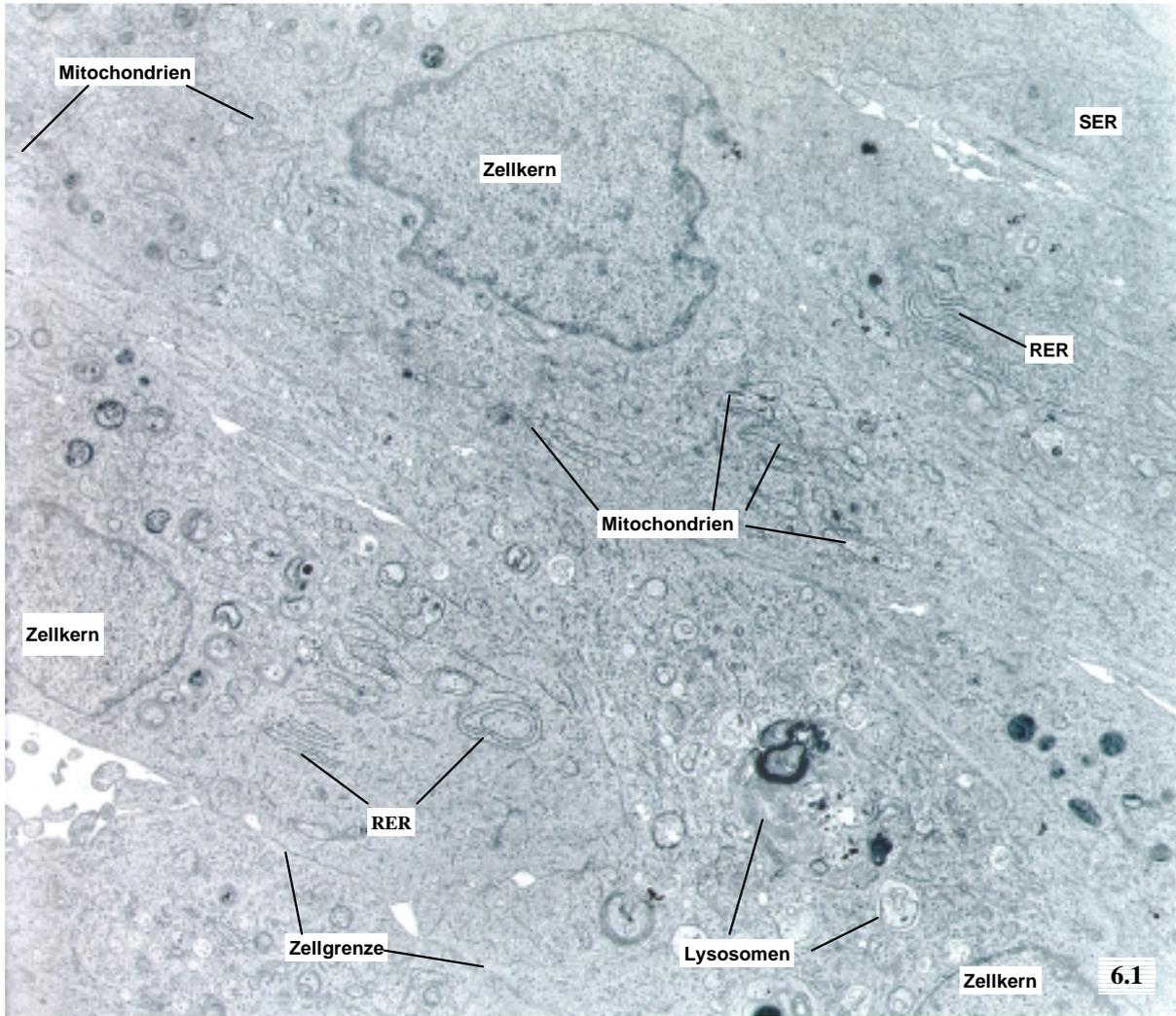
---

### **Bildtafeln, siehe folgende Seiten:**

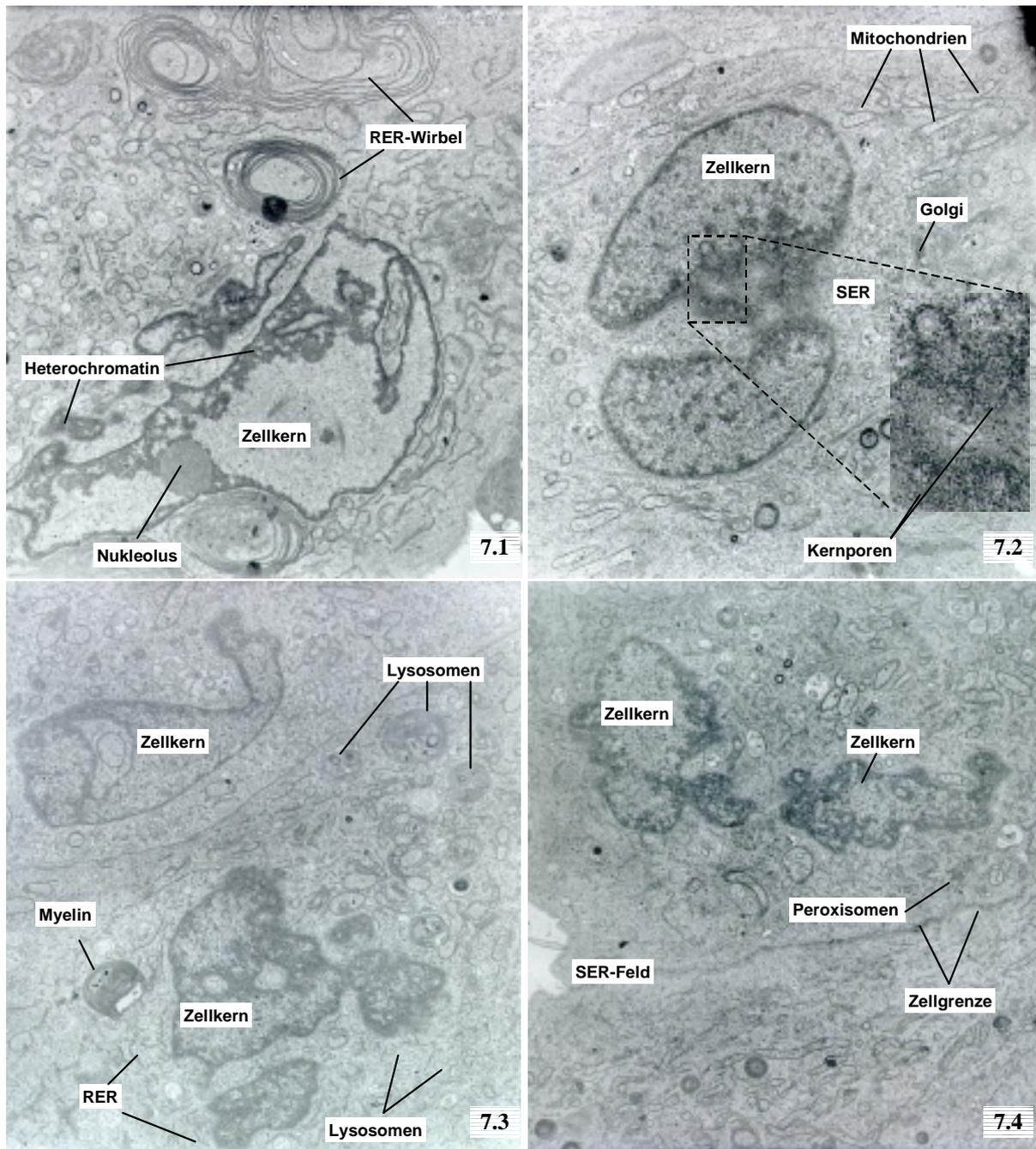
**Bildtafel 6:** RTG-2-Zellen, Kontrollen **6.1.:** die Zellen bilden einen dichten Zellrasen; Kerne mit unregelmäßiger Form und wenig Heterochromatin, RER: Rauhes Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrienform variabel, lysosomale Elemente häufig, Original: 4000 x. **6.2:** Große Filamentbündel, Original 5000 x. **6.3:** Beginnende Zellteilung, DNA kondensiert in deutlich erkennbare Chromosomen, die Kernmembran hat sich bis auf Reste aufgelöst, Original 6300 x.

**Bildtafel 9:** RTG-2 Zellen nach Belastung mit 1.9 mg/L *4-Nitroquinolin-N-oxid* für 72 h. **9.1:** Abgekugelte Zelle mit Kernfragmenten, im Vergleich zu den Kontrollen mit sehr vielen Peroxisomen, lysosomalen Elementen, Mitochondrien in verschiedenen Stadien, RER fragmentiert und in Wirbeln, Original 6300 x. **9.2:** Vergleichbare Zelle mit vielen Kernfragmenten, Peroxisomen und Lysosomen. Fragmentiertes ER, Original 5000 x. **9.3:** Ausschnitt aus **9.2**, verschiedene Membranstapel und Bereiche mit kondensiertem Chromatin, von einer Kernmembran umgeben (*Pfeile zeigen Bereiche der Kernmembran, die deutliche Ähnlichkeit mit Kernporen aufweisen*), Original 5000 x.

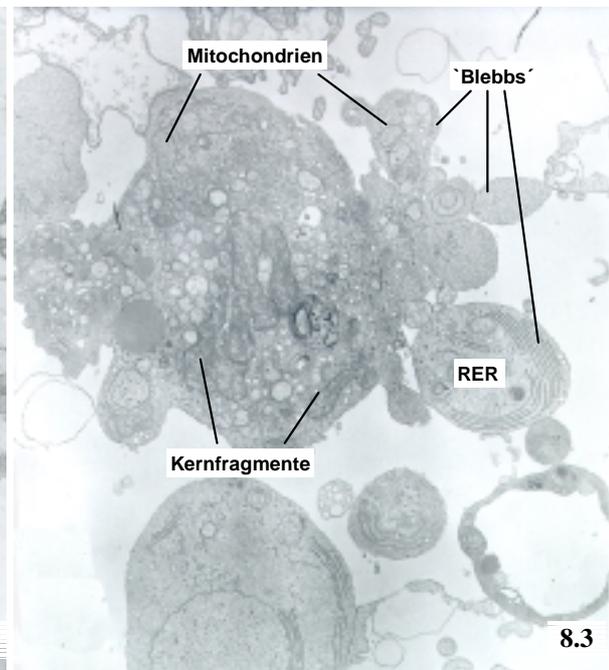
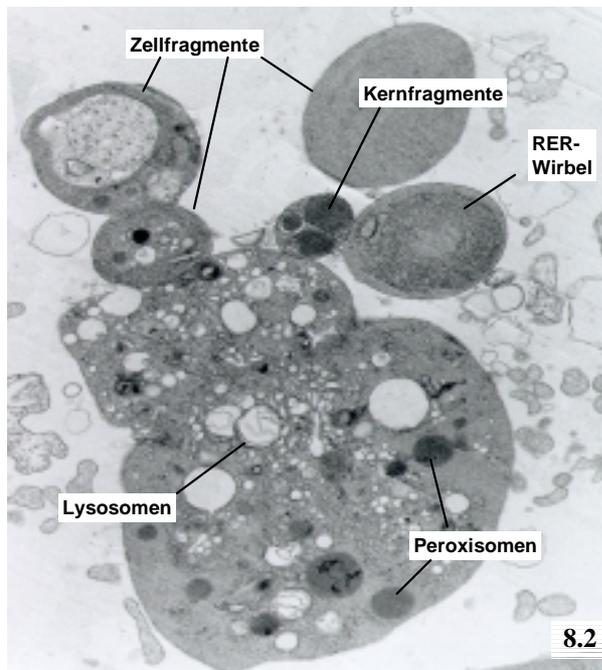
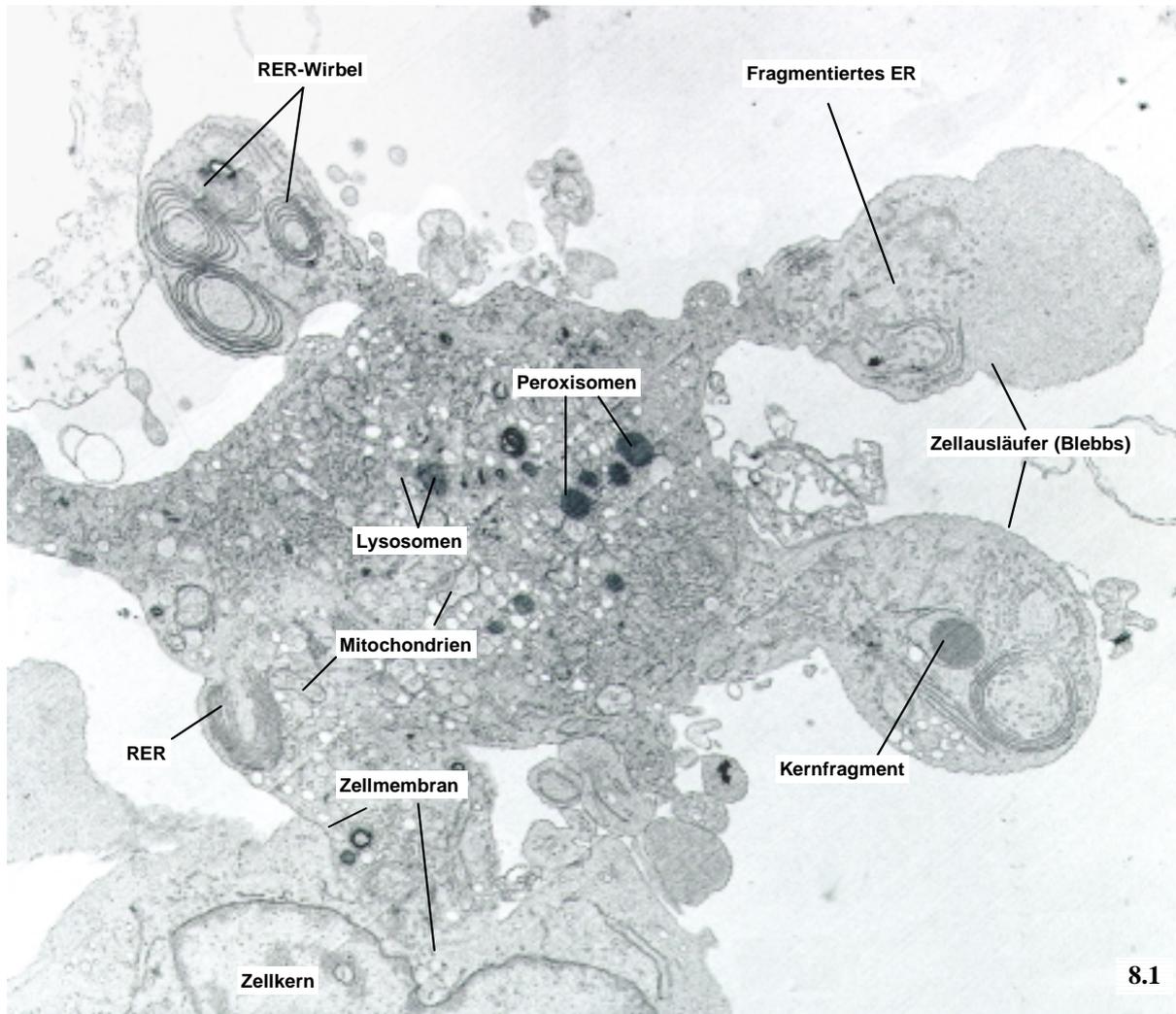
**Bildtafel 12:** In unterschiedlichen Belastungskonzentrationen beobachtete Nekrosen von RTG-2 Zellen. **12.1:** Nekrotische Zelle im Zellrasen, belastet mit 190 µg/L *4-Nitroquinolin-N-oxid* für 72 h, Chromatinkondensation, völlige Auflösung der zellulären Organisation, Original 6300 x. **12.2:** Nekrotische Zelle nach Belastung mit 19 mg/L *4-NQO* für 72 h, Original 2500 x. **12.3:** Kern mit stark kondensiertem, nicht-randständigem Chromatin, Original 5000 x. **12.4:** Zellkernveränderungen nach Belastung mit 19 mg/L *4-NQO* für 72 h, Original 5000 x. **12.5:** Randständiges Heterochromatin, *Pfeile zeigen Auftreibungen der Kernmembran*, Original 6300 x.



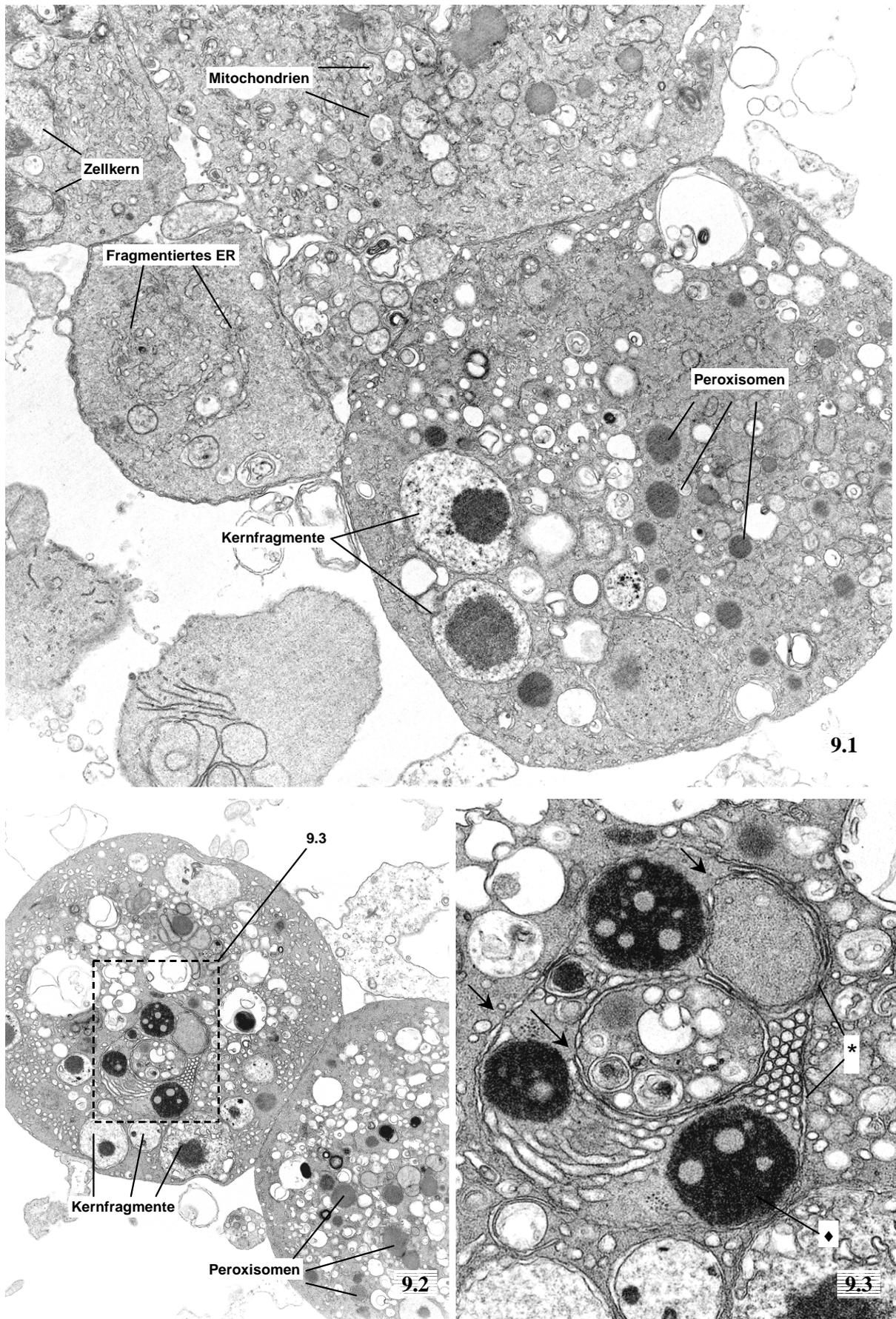
**Bildtafel 6:** RTG-2 Zellen, Kontrollen. *Beschreibung siehe Seite 109.*



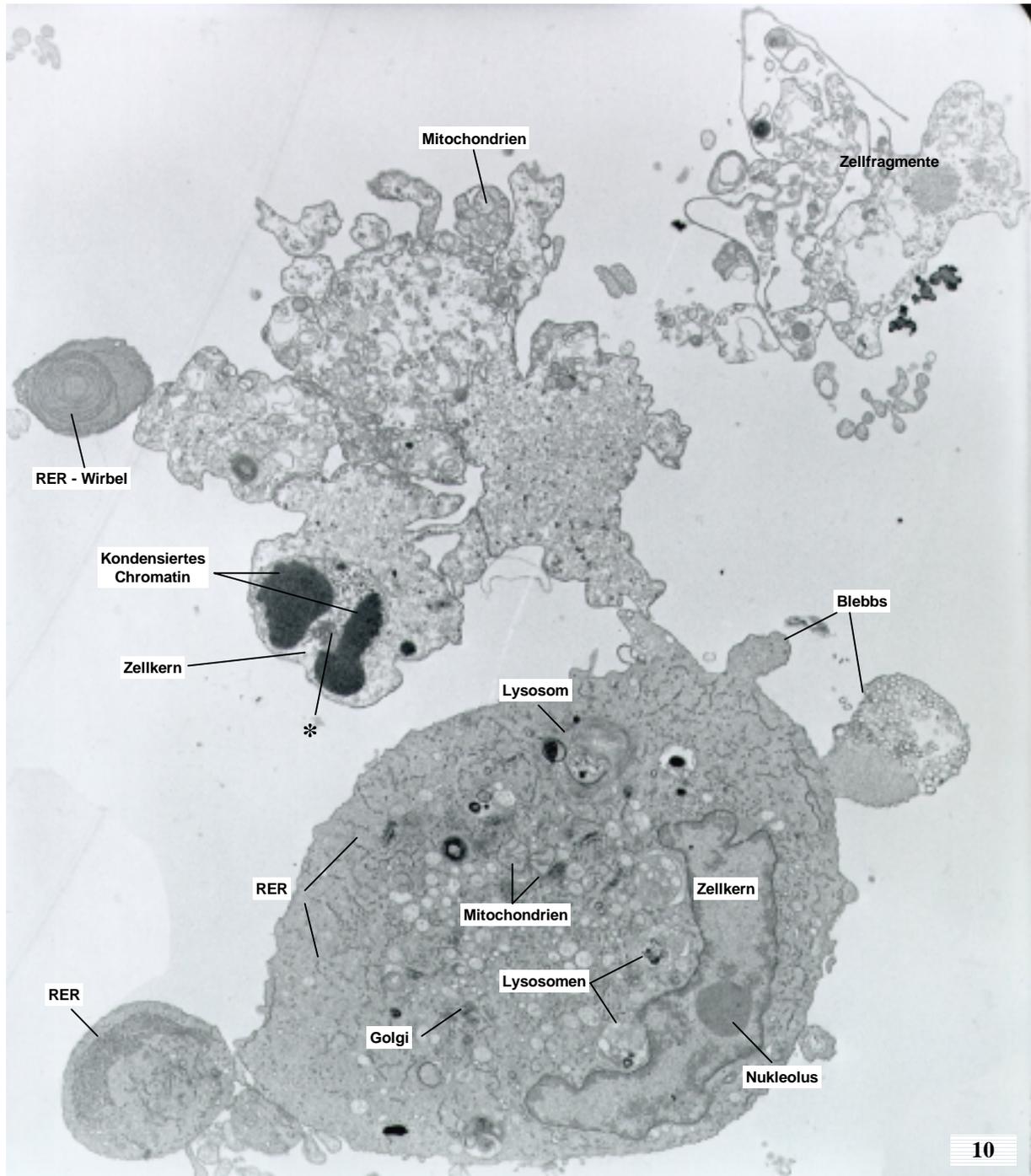
**Bildtafel 7:** Kernveränderungen in RTG-2 Zellen nach dreitägiger Belastung mit 190  $\mu\text{g/L}$  und 1.9  $\text{mg/L}$  4-Nitroquinolin-N-oxid (4-NQO). **7.1:** Die Kernform wird sehr unregelmäßig, marginalisiertes Heterochromatin nimmt im Vergleich zur Kontrolle deutlich zu, auch der prominente, scharf abgegrenzte Nukleolus konnte in den Kontrollzellen nicht beobachtet werden; starke RER-Wirbelbildung, 1.9  $\text{mg/L}$  4-NQO (Original 5000 x). **7.2:** Beginnende Kernfragmentierung; Ausschnitt zeigt Kernporen (Original 4000 x). **7.3:** Verschiedene Kernformen mit viel Heterochromatin; große lysosomale Elemente nehmen deutlich zu (Original 5000 x). **7.4:** Kernfragmente, Zellen mit großen SER-Feldern (Original 5000 x).



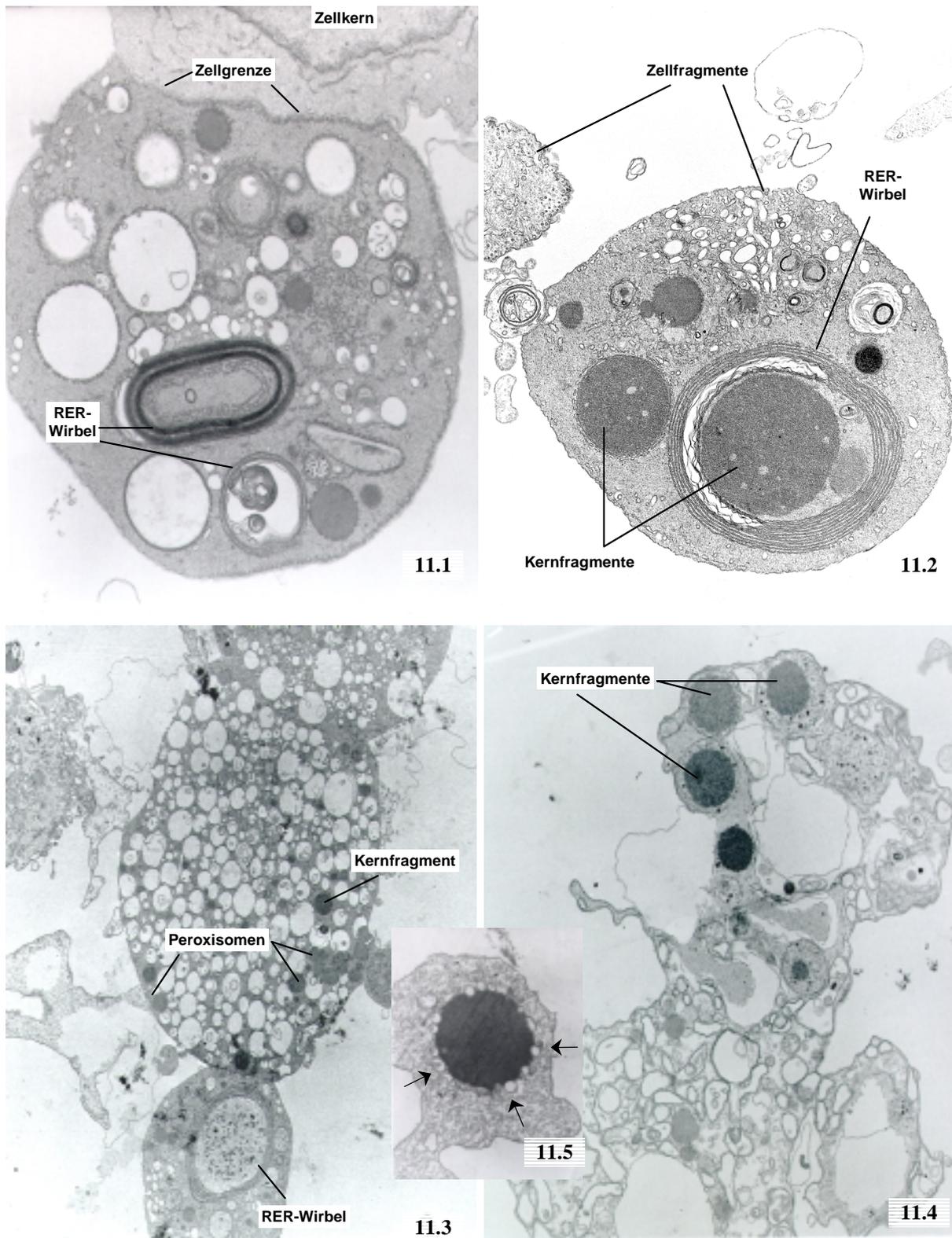
**Bildtafel 8:** Morphologische Veränderungen von RTG-2 Zellen durch Belastung mit 1.9 mg/L 4-Nitroquinolin-N-oxid für 3 Tage. **8.1 – 8.3:** Zellen bilden Ausläufer („Blebbs“), in denen sich Zellorganellen und z.T. Kernfragmente befinden. Große RER-Wirbel, lysosomale Elemente sowie Peroxisomen treten vermehrt auf (Original: **8.1:** 3150 x; **8.2:** 3150 x; **8.3:** 4000 x).



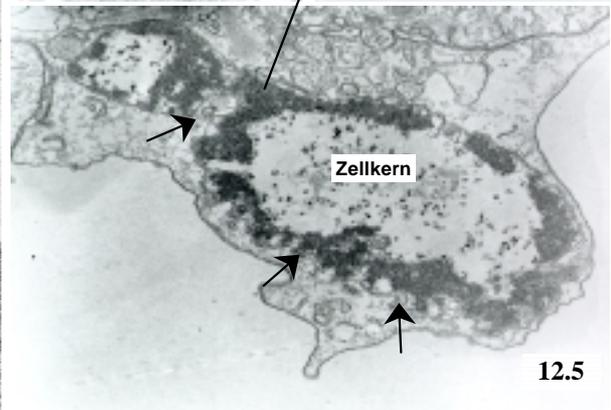
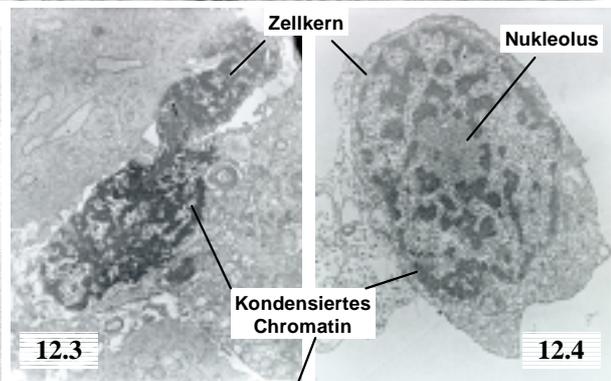
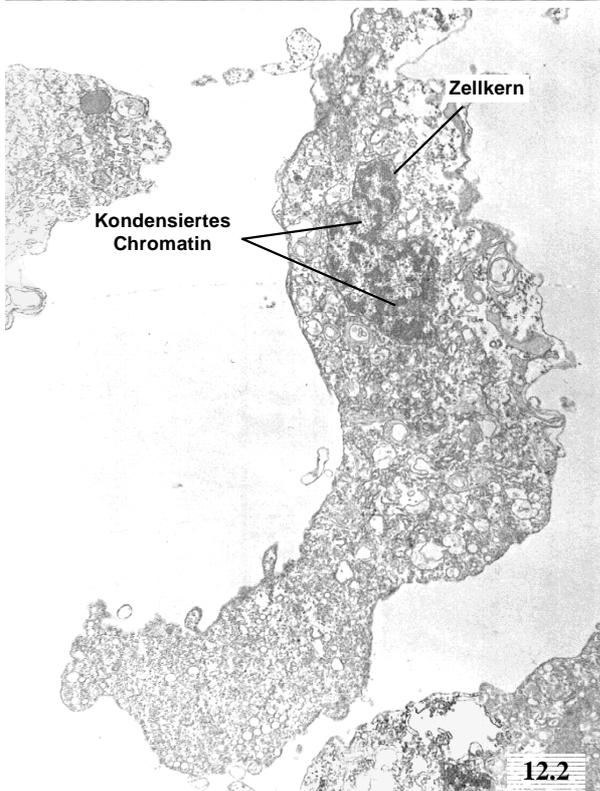
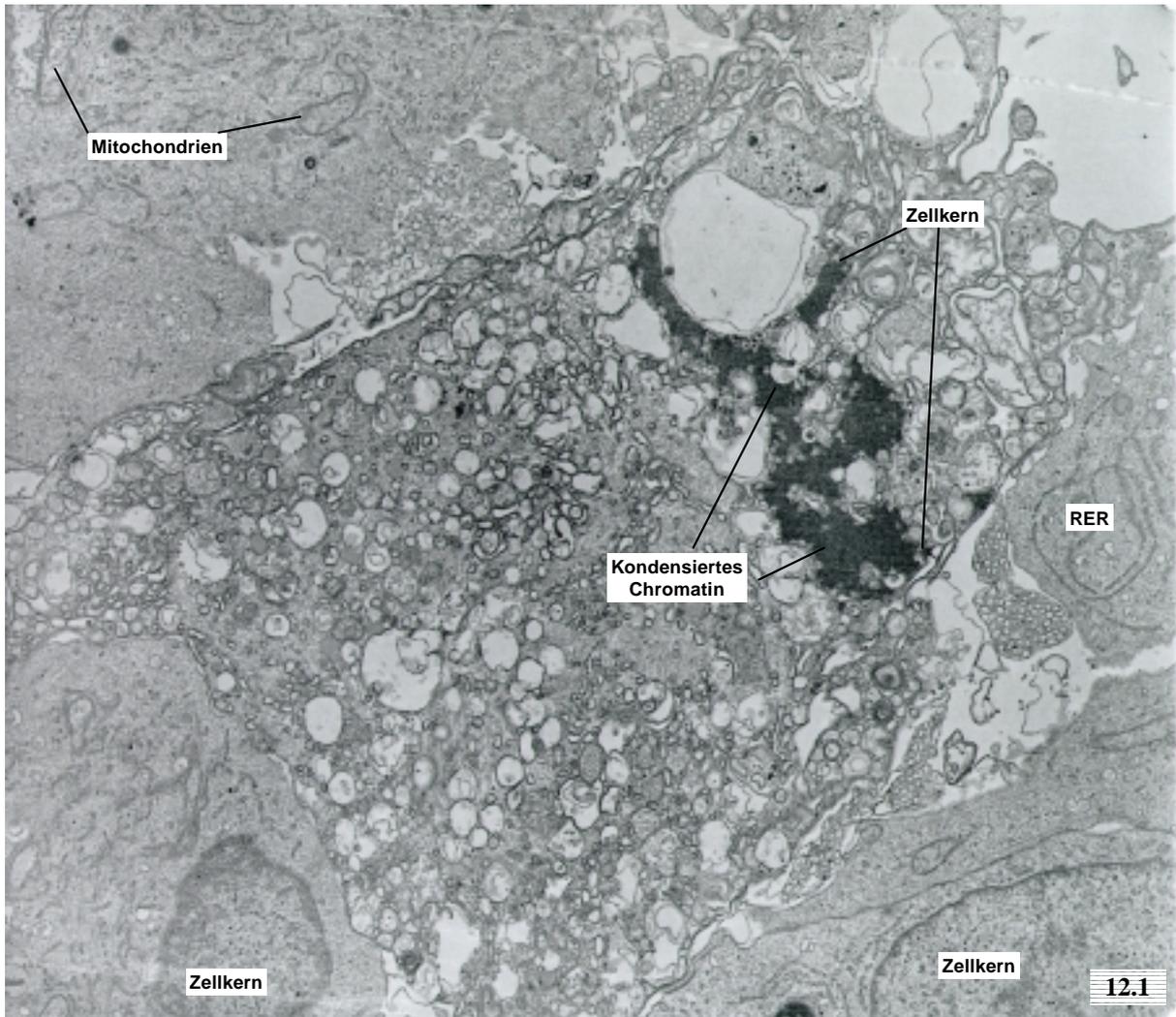
**Bildtafel 9:** RTG-2 Zellen nach Belastung mit 1.9 mg/L 4-NQO für 72 h. Beschreibung siehe Seite 109.



**Bildtafel 10:** RTG-2 Zellen in unterschiedlichen Stadien des programmierten Zelltods (Apoptose) nach Belastung mit 1.9 mg/L 4-Nitroquinolin-N-oxid für 3 Tage. **10:** Unten: Zelle mit marginalisiertem Heterochromatin und prominentem, scharf umrissenem Nukleolus; RER fragmentiert, einige intakte Mitochondrien sowie große lysosomale Elemente. Zelle bildet einige Ausläufer (Blebbs), im linken unteren Bildrand mit großem RER – Stapel; Oben: Zelle mit stark aufgelöster ultrastruktureller Organisation, Lediglich einige Mitochondrien sowie der Kern mit großem Anteil kondensiertem Chromatins; \*) Nukleolus noch erkennbar. Original 2500 x.



**Bildtafel 11:** Morphologische Veränderungen von RTG-2 Zellen nach Belastung mit 1.9 mg/L 4-Nitroquinolin-N-oxid für 3 Tage. **11.1:** Apoptotischer Körper mit großen RER-Wirbeln (Original 5000 x). **11.2:** Abgeschnürtes Zellfragment, mit großen RER-Wirbeln und Kernfragmenten (Original 5000 x). **11.3:** RTG-2 Zelle, mehrere Zellfragmente, zelluläre Organisation weitgehend aufgelöst, einige Kernfragmente und Peroxisomen erkennbar; sonst nur Vakuolen (Original 4000 x). **11.4:** RTG-2 Zelle, zelluläre Organisation weitgehend aufgelöst, mehrere Kernfragmente mit stark kondensiertem Chromatin (Original 6300 x). **11.5:** Zellfragment, Kernfragment mit stark kondensiertem Chromatin und aufgeblähter Kernmembran (Original 16000 x).



**Bildtafel 12:** Nekrotische Veränderungen bei RTG-2 Zellen. *Beschreibungen, siehe Seite 109.*

### 3.9 Morphologie und Ultrastruktur der eingesetzten Primärzellen

Die im Comet Assay untersuchten primären Hepatocyten aus dem Zebrabärbling wurden in einer Dichte von maximal  $1 \times 10^5$  Zellen / mL ausgesät und bildeten nach 24 h in Kultur in den Wells einer 24 Well-Platte kleinere Aggregate (Bildtafel 13, Abb. 13.1). Im Gegensatz dazu ließ sich bei den isolierten Kiemenzellen, einer viel heterogeneren Zellpopulation, eine Aggregation der Zellen nicht beobachten (Abb. 13.2).

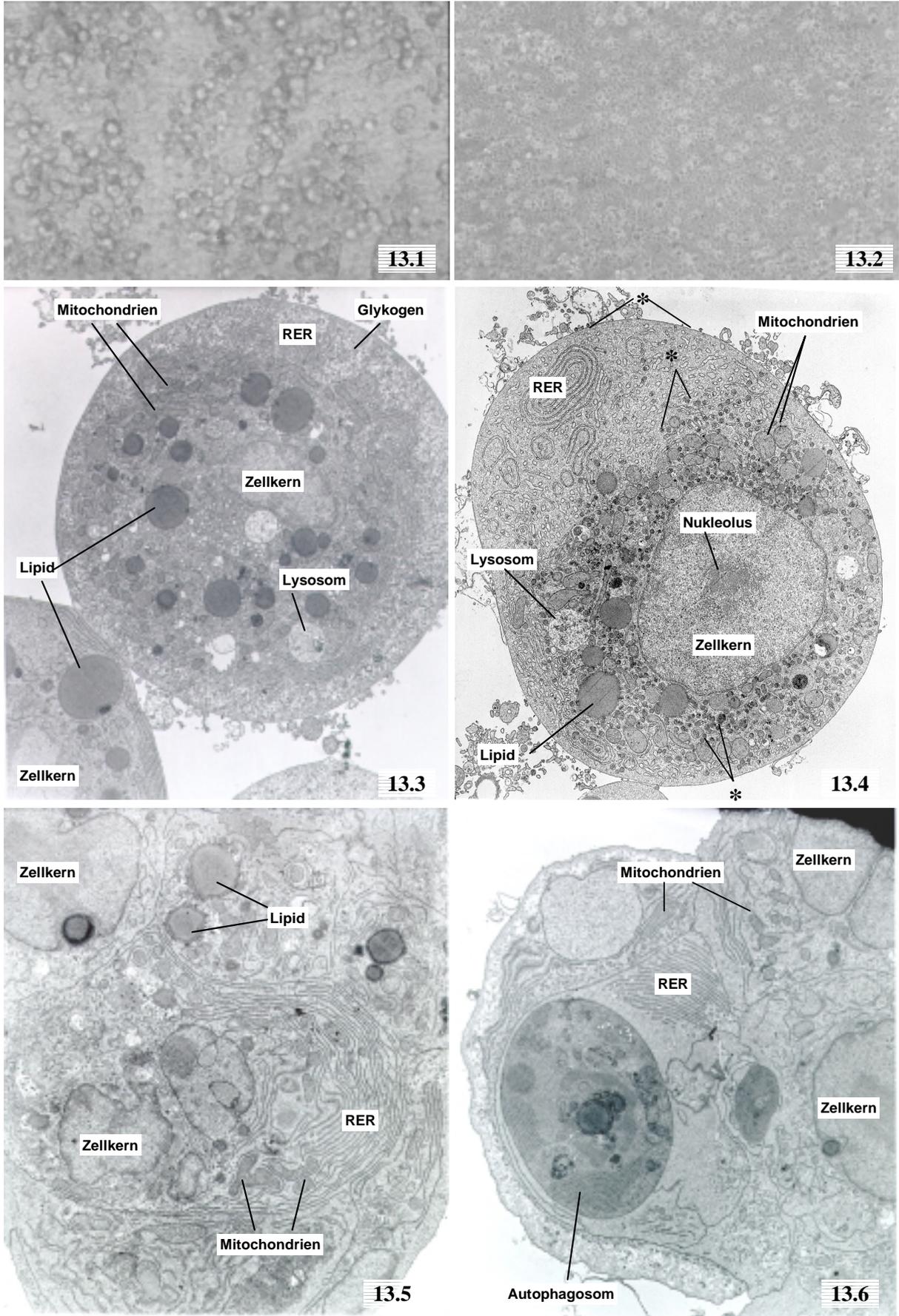
Die Hepatocyten des Zebrabärblings zeigten im elektronenmikroskopischen Bild einen zentralen Kern, Stapel von RER-Zisternen und als Speicherstoff Lipid sowie geringe Mengen Glykogen (Abb. 13.3). Ein ähnliches Bild zeigten die isolierten Hepatocyten aus dem Rotaugen (Abb. 13.4). Auffällig waren die kleinen dunklen Partikel, die verstreut im Cytoplasma der Zelle, aber auch an der Zelloberfläche beobachtet werden konnten. Diese Anordnung legt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um einen Virusbefall handeln könnte, bei einem frei lebenden Fisch aus dem Neckar durchaus denkbar.

Nach 3 Tagen in Kultur konnten auch im Elektronenmikroskop Zellaggregate aus Hepatocyten des Zebrabärblings beobachtet werden. Untypisch ist der für Hepatocyten sehr unregelmäßig geformten Zellkern in der Mitte von Abb. 13.5, hierbei könnte es aber auch um eine Fibrocyte handeln. Bei der Zellgewinnung werden für Hepatocyten recht hohe Zentrifugationskräfte mit 130-180 g angewendet, hierbei werden neben Hepatocyten auch Fibrocyten gewonnen. In Abb. 13.6 ist ein weiteres Aggregat dokumentiert, hier scheint eine Hepatocyte eine weitere Zelle phagozytiert zu haben.

---

#### Bildtafeln:

**Bildtafel 13:** **13.1:** Primäre Hepatocyten aus dem Zebrabärbling, 24 h in Kultur, Original 100 x. **13.2:** Primäre Kiemenzellen aus dem Zebrabärbling, 24 h in Kultur, Original 60 x. **13.3:** Primäre Hepatocyten aus dem Zebrabärbling 24 h nach Isolation, Original 5000 x. **13.4:** Primäre Hepatocyte aus dem Rotaugen, 24 h nach Isolation; \*) Dunkle Punkte sowohl im Zellinneren wie auch angedockt an Zellwand, möglicherweise handelt es sich hierbei um Viruspartikel, bei einem wildlebenden Fisch aus dem Neckar durchaus denkbar, Original 5000 x. **13.5:** Zellaggregat aus Leberzellisolation aus dem Zebrabärbling; unregelmäßige Kernform deutet auf Fibrocyte in der Mitte des Aggregats hin, Original 6300 x. **13.6:** Zellaggregat, phagozytierte Zelle/Autophagosom innerhalb einer Zelle, Original 6300 x.



**Bildtafel 13:** Beschreibungen siehe Seite 117.

### 3.10 Ultrastrukturelle Veränderungen in Leber und Kieme von Zebraäbrblingen unter dem Einfluß genotoxischer Belastung

Am Institut für Hydrobiologie der Universität Dresden wurde, wie schon in Abschnitt 3.1.8 erwähnt, ein Life-Cycle-Experiment mit Zebraäbrblingen unter Belastung mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* durchgeführt. Die mit dem Comet Assay erhobenen Untersuchungen sind in Abschnitt 3.1.8 dargestellt. Für eine elektronenmikroskopische Untersuchung von Leber und Kieme konnten leider pro Konzentration nur ein Männchen und ein Weibchen zur Verfügung gestellt werden. Damit entfällt aufgrund interindividueller Unterschiede die Möglichkeit eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehungen für diesen Versuch aufzustellen. Trotzdem wurden die Zielorgane mikroskopisch untersucht, da die in diesem Life-Cycle-Experiment gewählten Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze des Comet Assays mit primären Fischzellen lagen und eine Konzentration höher (24 µg/L) schon starke Populationseinbrüche im Life Cycle hingenommen werden mußten (deswegen konnten keine Tiere dieser Konzentration untersucht werden). Somit bot sich die Gelegenheit, den Endpunkt des Indikatortests Comet Assay mit eventuell nachzuweisenden biologischen Folgen einer genotoxischen Belastung zu korrelieren.

#### *Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Leber*

*Weibchen:* Die Leber des Kontrollweibchens zeigte ein homogenes Parenchym aus stark lipidspeichernden Hepatocyten; im Unterschied zu den männlichen Hepatocyten wurden nur geringe Glykogenspeicher beobachtet (Bildtafel 14, Abb. 14.1). Es konnten nur sehr wenige Fremdzellen, in der Regel Makrophagen in angeschnittenen Gefäßen und Kapillaren, nachgewiesen werden.

Auch auf der ultrastrukturellen Ebene zeigten sich die untersuchten Zellen als sehr homogen, die zentral gelegenen Zellkerne wiesen deutliche Nukleoli und wenig Heterochromatin auf. Das Rauhe Endoplasmatische Retikulum (RER) bildete große Stapel aus bis zu 12 langgestreckten Zisternen; Myelinkörper und lysosomale Elemente waren selten. Glykogen fand sich locker gespeichert in kleinen Arealen, dafür zeigten die meisten Zellen 1 bis mehrere große Lipidtropfen (Abb. 15.1). Die Mitochondrien zeigten eine enge Assoziation zu einzelnen ER-Zisternen und Peroxisomen. Der Golgiapparat setzte sich aus Dictyosomen mit 3-5 kurzen Zisternen zusammen (Bildtafel 15, Abb. 15.2 u. 15.3).

Das Leberparenchym der belasteten weiblichen Tiere (Abb. 14.4) zeigte lichtmikroskopisch wenig Änderungen zur Kontrolle. Allerdings konnten hier, licht- wie elektronenmikroskopisch, neben Fremdzellen (Makrophagen, Bildtafel 16, Abb. 16.1, 16.2, 16.5, Granulocyten, Abb. 16.4) und Fremdzellennestern (Abb. 17.1) auch Areale mit Fasereinlagerungen festgestellt werden (siehe auch 14.6). Ultrastrukturell zeigte sich eine deutliche Proliferation des Proteinbiosynthese-Apparats: das RER bildete mächtige Stapelfelder aus bis zu 21 Zisternen (Abb. 16.3). Außerdem konnten in den Belastungsgruppen beginnende Wirbelbildung, Fenestrierungen und Dilatationen nachgewiesen werden (Bild 17.2). Die Anzahl der Dictyosomen nahm zu und die einzelnen Dictyosomen zeigten deutlich längere Zisternen (Bild 16.3). Die Lipidspeicherung zeigte keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, die Glykogenmenge variierte, war aber ähnlich gering wie in der Kontrolle. In der höchsten Konzentration zeigte die Leber sehr große Interzellularen (dies ist aufgrund der Perfusionfixierung aber nicht mit letzter Sicherheit als pathologisches Symptom des untersuchten Organs anzusprechen).

*Männchen:* Die Kontrolleber des Männchens zeigte im Lichtmikroskop ein homogenes Parenchym aus stark glykogenspeichernden Hepatocyten (Bildtafel 14, Abb. 14.2). Auch ultrastrukturell waren die Hepatocyten recht gleichförmig aufgebaut: ein zentral gelegener Kern mit deutlichem Nukleolus

und wenig Heterochromatin war von größeren Glykogenfeldern umgeben, in denen sich eingestreut wenige Organellen befanden. Die länglich-ovalen Mitochondrien zeigten eine enge Assoziation mit jeweils einer Zisterne Rauhem Endoplasmatischen Retikulums (RER) sowie Peroxisomen, der Golgi-Apparat war nur wenig ausgeprägt (Bildtafel 18, Abb. 18.1). Selten zeigten sich stark dilatierte ER-Zisternen. Myelinstrukturen und lysosomale Elemente konnten nur selten beobachtet werden. Im Glykogenfeld eingestreut befanden sich wenige Zisternen des Glatten Endoplasmatischen Retikulums. Lipid als Speicherstoff war selten, auch Fremdzellen konnten nur wenig beobachtet werden (Tab. 34, Abb. 18.1).

In den mit 4-NQO belasteten Gruppen zeigten die männlichen Tiere ein heterogeneres Parenchym, der Glykogengehalt variierte. Aufgrund der geringen Probenzahl konnte jedoch keine Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt werden (Bildtafel 14, Abb. 14.3 u. 14.5). Abb. 14.5 zeigt eine Parenchymstörung, die auch elektronenmikroskopisch als Läsionen mit Fasereinlagerungen nachgewiesen werden konnten (Bildtafel 18, Abb. 18.3 u. Bildtafel 19, Abb. 19.5). Als Fremdzellen waren Makrophagen häufig (Abb. 19.5). Auf der Ebene der Ultrastruktur zeigten alle belasteten Männchen Zellkerne mit deutlich erhöhtem Anteil an marginalisiertem Heterochromatin (Abb. 18.2, 19.3). Die Anzahl und Heterogenität der Mitochondrien war ebenfalls erhöht, ringförmige Mitochondrien konnten regelmäßig beobachtet werden (Abb. 19.4), ihre Assoziation mit RER und Peroxisomen war vergleichbar mit der Kontrolle. Das Vorkommen stark dilatierter ER-Zisternen nahm in allen Konzentrationen deutlich zu (Abb. 19.4), ebenso zeigte sich der Golgi-Apparat mit Dictyosomen aus mehreren kurzen Zisternen deutlich prominenter (Abb. 19.1). Der Glykogengehalt variierte im Vergleich zur Kontrolle leicht, ein deutlicher Unterschied war somit nicht festzustellen. Das Bild einzelner Parenchymbereiche wurde allerdings deutlich unruhiger, da immer wieder Areale stark entspeicherter Zellen beobachtet wurden (Abb. 19.2). Lipid als Speicherstoff nahm hingegen in allen untersuchten Tieren zu. Auch lysosomale Elemente und Myelinfiguren nahmen deutlich zu (Tab. 34).

#### *Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Kieme*

Die Grundstruktur der Teleostierkieme besteht aus 4 Kiemenbögen, die regelmäßige, kammähnliche Kiemenfilamente tragen, wobei sich die Enden der Filamente oder Primärlamellen benachbarter Kiemenbögen in Ruhestellung berühren. Auf den Kiemenfilamenten sitzen dichtgepackt die Kiemenplättchen. An letzteren, auch als Sekundärlamellen bezeichnet, findet der Gasaustausch mit dem umgebenden Wasser über ein Gegenstromprinzip statt. Die Sekundärlamellen sind äußerst dünnwandige Säcke, deren Lumen in regelmäßigen Abständen durch Pflasterzellen abgestützt wird (Bone und Marshall, 1985).

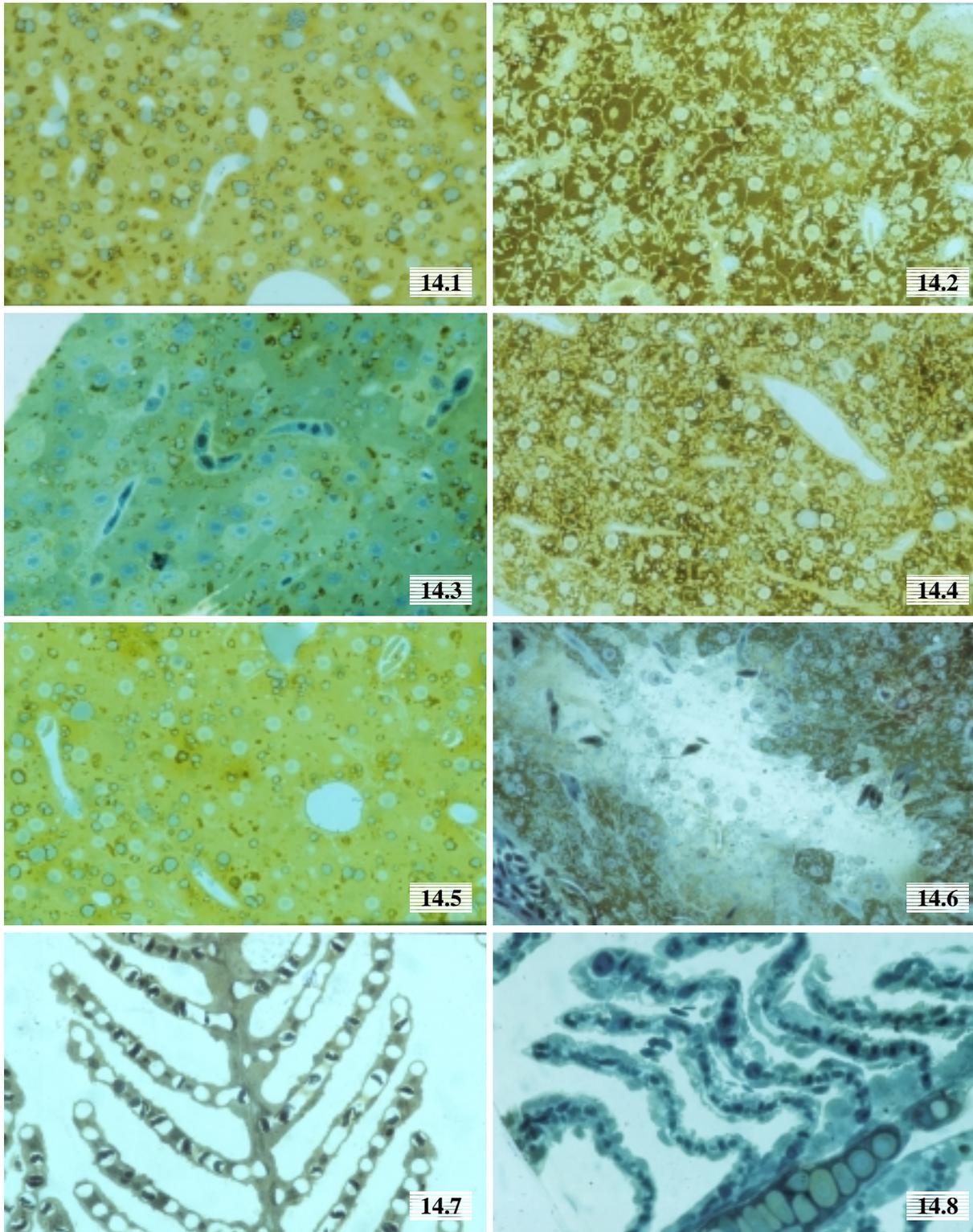
Bei der Untersuchung der Kieme konnten kein geschlechtsspezifischen Unterschiede erkannt werden. Somit erfolgt die Beschreibung für beide Geschlechter zusammen. Wie aus Bildtafeln 14, Abb. 14.7 und Bildtafel 20, Abb. 20. 1 zu entnehmen, zeigten die Sekundärlamellen der Zebrabärblingskieme ein dünnzelliges Epithel, welches die durch Pflasterzellen getrennten Kapillaren bedeckt. An der Basis der Sekundärlamellen war das Epithel der Primärlamelle mehrschichtig und wies Chlorid- und Schleimzellen an der Oberfläche auf (Abb. 20.2).

Die Kiemen der belasteten Tiere zeigten ein breites Spektrum in ihrem ultrastrukturellen Erscheinungsbild: Bereiche vergleichbar den Kontrollen (Bildtafel 21, Abb. 21.1) lagen neben Arealen mit zahlreichen nekrotischen Zellen (Abb. 21.4), und Epithelverdickungen (Abb. 21.2 u. 14.8). Häufig zeigten sich auch unter das Deckepithel der Sekundärlamelle eingewanderte Makrophagen (Abb. 21.3). Das Abheben des Epithels konnte zwar auch vermehrt beobachtet werden, wiederum kann jedoch die Möglichkeit, daß es sich um ein perfusionsbedingtes Fixierungsartefakt handelt, nicht restlos ausgeschlossen werden.

**Tab. 34:** Ultrastrukturelle Untersuchung der Leber von Zebrafärbungen nach Belastung mit verschiedenen Konzentrationen von *4-Nitroquinolin-N-oxid* (0.3, 0.9, 2.7 und 8.1 µg/L) in einem Life-Cycle-Test

		Kontrolle E	Belastung E	Kontrolle Γ	Belastung Γ
Intrazelluläre Kompartimentierung		+++	+++ -	++	++
Kern	Form	Rundlich	rundlich	rundlich	rundlich
	Lage	+/- zentral	+/- zentral	+/- zentral	+/- zentral
	Heterochromatin	+	+	+	+++
Mitochondrien	Menge	++++	+++	++	++
	Heterogenität	+	++	+	++
	Assoziation m. ER.	++	++	++	++
Peroxisomen:	Menge	++	++	+	++
	Größe	+	+	+	+
	Heterogenität	+	+	+	+
RER	Menge	+++	++++	++	++
	Stapelbildung	+++	++++	+	+
	Parallele Zisternen	++	++	-	-
	Fragmentierung	+	++	-	-
	Dilatation	+	++	+	+++
SER	Menge	+	++	+	++
	Stapelbildung				
	Lage in Glykogen	+	+	+	+
Golgi	Menge	++	+++	+	++
	Zisternen	++	+++	+	++
	Fenestrierung	-	-	-	-
Lysosomen	Menge	+	++	+	++
	Myelin	+	++	+	++
	Autophagosomen	-	+	-	+
	Vakuolen	-	-	-	-
Lipid	Menge	+	++	+	++
	im Glykogenfeld	+	++	+	++
Glykogen	Menge	++	++	+++	++
Fremdzellen	Makrophagen	+	+++	+	+++
	Granulocyten	-	+	-	+
	Parenchymstörungen	-	++	-	++

- +, - Merkmalsausprägung, da nur Einzeltiere zur Verfügung standen, werden nur Unterschiede aufgezeigt, die von der Gesamtheit der Belastungstiere gezeigt werden
- ++++ Merkmal sehr stark ausgeprägt oder sehr häufig
- +++ stark ausgeprägt oder häufig
- ++ ausgeprägt oder regelmäßig vorkommend
- + wenig ausgeprägt oder selten
- nicht vorhanden



**Bildtafel 14:** Semidünnschnitte von Leber- und Kiemenproben von Zebraabärblingen (*Danio rerio*) aus einem Life-Cycle-Experiment mit 4-Nitroquinolin-*N*-oxid (durchgeführt von M. Diekmann, AG Nagel, TU Dresden). **14.1:** Kontrolleber ♀, Hauptspeicherstoff Lipid (*graue Areale*). **14.2:** Kontrolleber ♂, Hauptspeicherstoff Glykogen (*braune Areale*). **14.3:** Leberübersicht Belastungsgruppe 0.9 µg/L 4-NQO, ♀. **14.4:** Leberübersicht 0.9 µg/L 4-NQO, ♂. **14.5:** Leberübersicht 8.1 µg/L 4-NQO, ♀. **14.6:** Leberübersicht 8.1 µg/L 4-NQO, Parenchymstörung, ♂. **14.7:** Kieme Kontrolle ♂. **14.8:** Kieme 8.1 µg/L 4-NQO, ♂. Original-Vergrößerung **14.1 – 14.8:** 540 x. Das Organ Kieme wurde nicht nach Geschlecht getrennt dargestellt, da keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Reaktion auf 4-NQO festgestellt werden konnten.

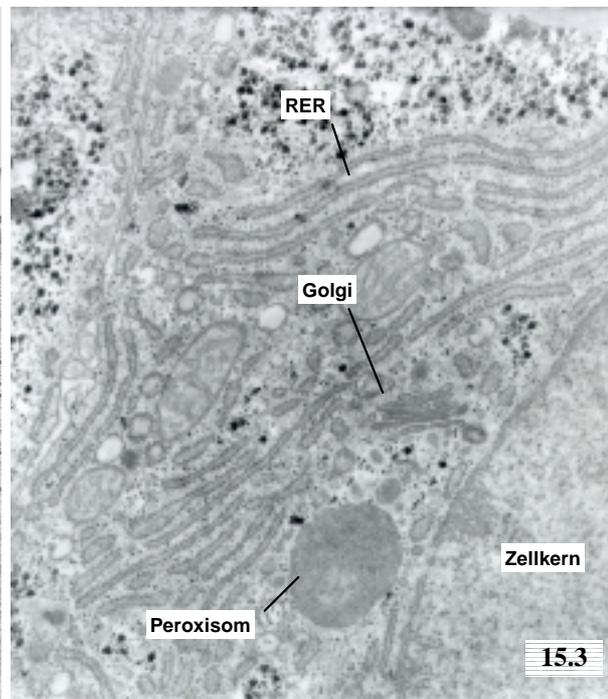
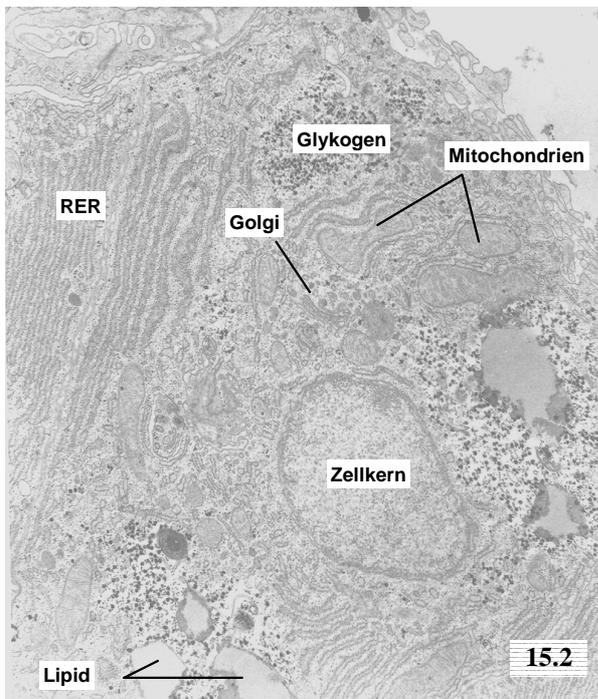
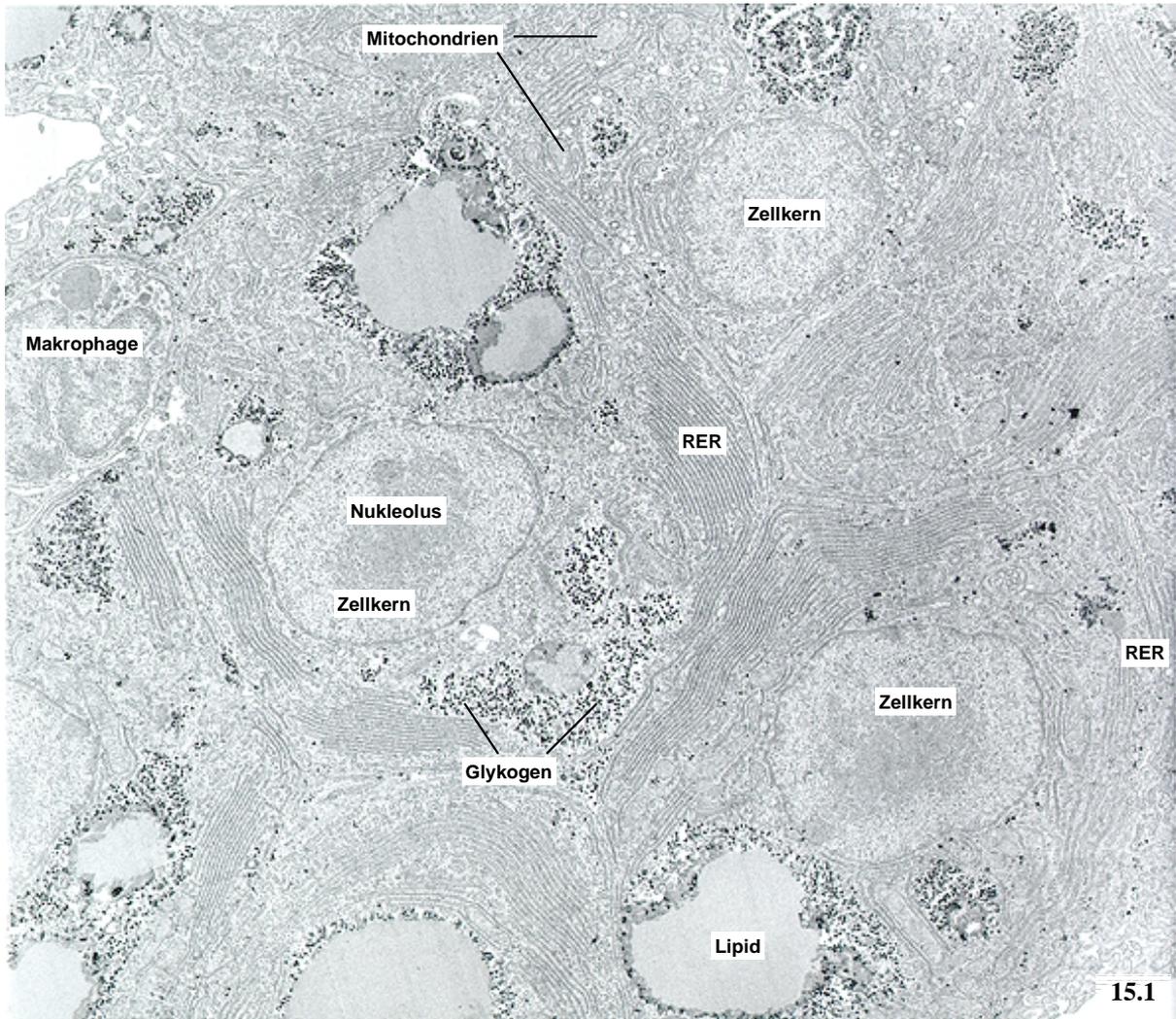
---

**Bildtafeln siehe folgende Seiten:**

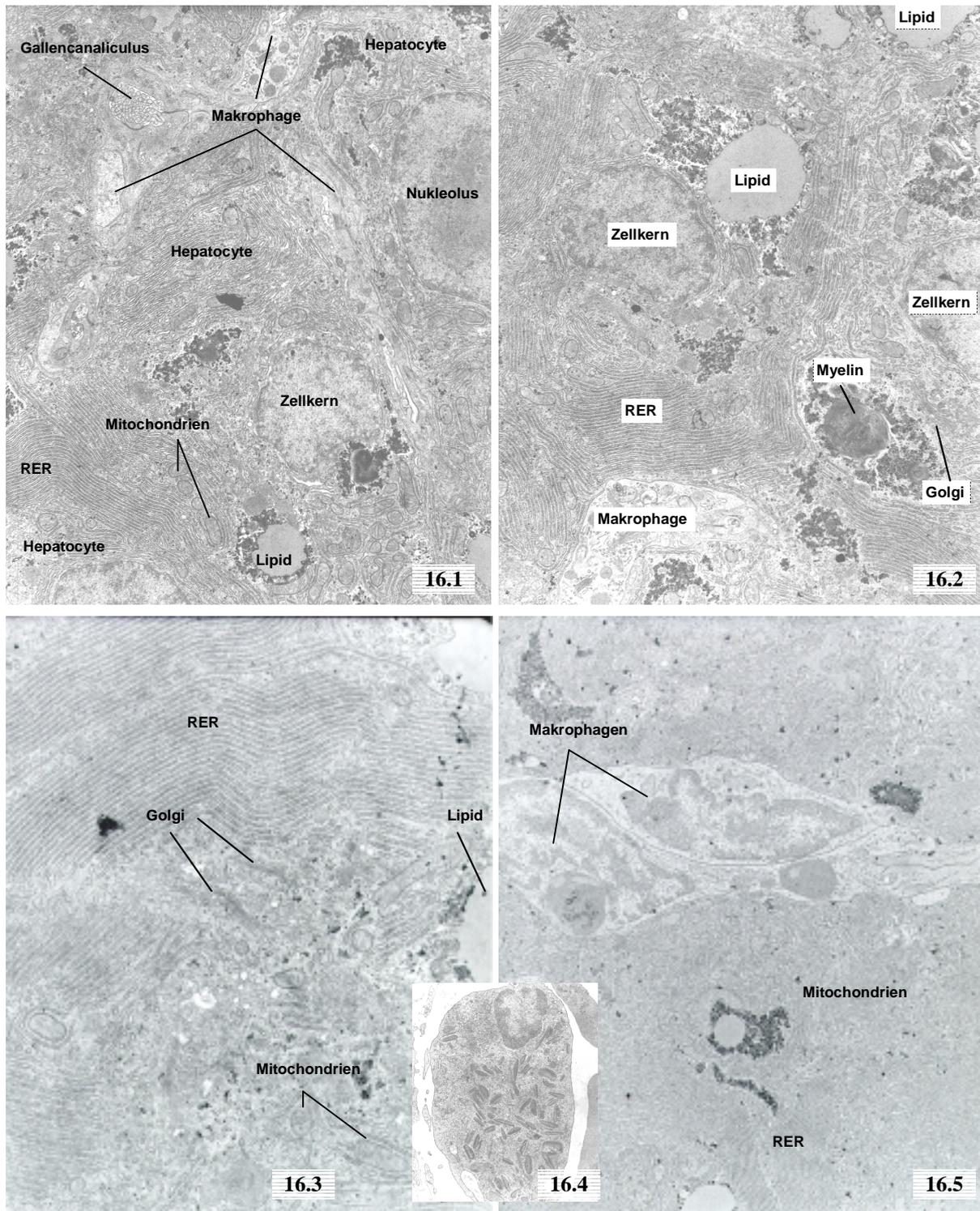
**Bildtafel 15:** **15.1:** Übersicht Leberparenchym Kontrollweibchen: sehr homogen, zentraler Kern mit Nukleolus, große RER-Stapel, Lipidspeicher, wenig Glykogen; Original 4000 x. **15.2:** Übersicht Kontrollzelle: zelluläre Ausstattung vergleichbar 15.1, Golgi aus 3-5 kurzen Zisternen; Original 5000 x. **15.3:** Ausschnitt Kontrollzelle: RER, Peroxisom und Golgi sowie Mitochondrien gut zu erkennen; Original 10000 x.

**Bildtafel 17:** **17.1:** Übersicht Makrophagen-Nest im Leberparenchym des mit 2.7 µg/L 4-NQO belasteten Weibchens; Original 4000 x. **17.2:** Übersicht Leberparenchym des Weibchens mit 8.1 µg/L 4-NQO, Zellen mit RER angefüllt, dieses häufig fragmentiert und dilatiert (RER\*); Original 5000 x.

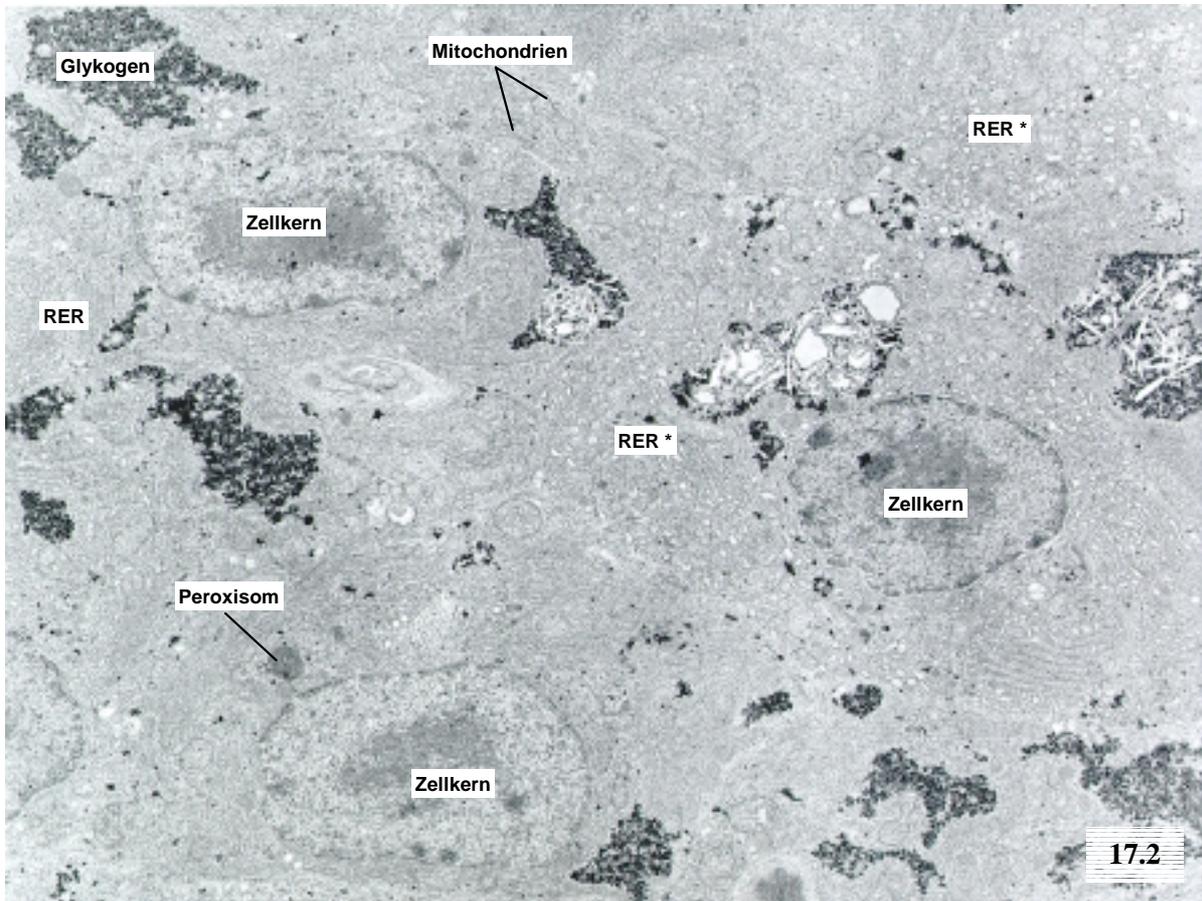
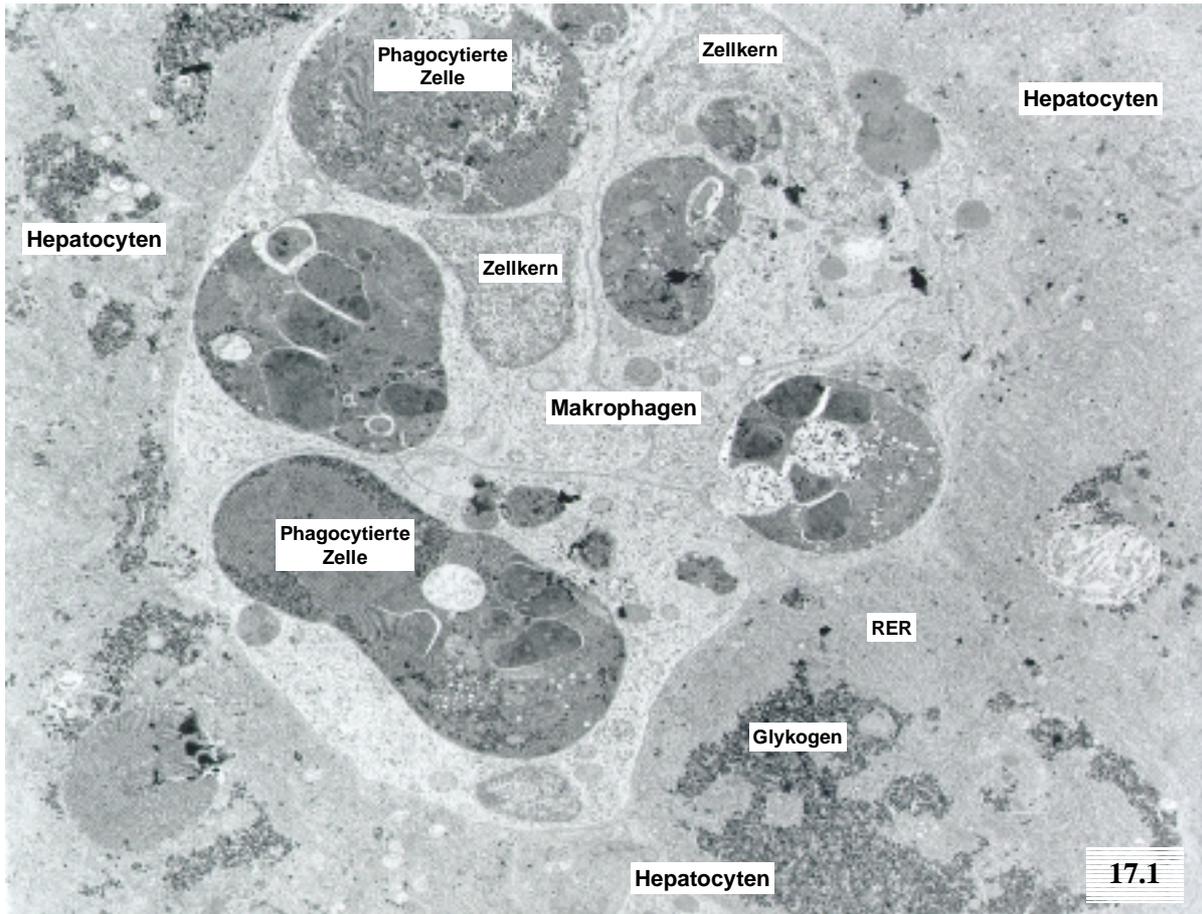
**Bildtafel 18:** **18.1:** Übersicht Hepatocyte aus dem Leberparencham des männlichen Kontrollfisches, große Mitochondrien, assoziiert mit jeweils einer Zisterne RER; große Glykogenfelder; seltener konnten stark dilatierte RER-Zisternen beobachtet werden; Original 6300 x. **18.2:** Übersicht Hepatocyte aus belastetem Männchen (0.9 µg/L 4-NQO), beginnende Proliferation des Heterochromatins; variabelere Mitochondrien-Formen; Original 5000 x. **18.3:** Parenchymstörung, belastetes Männchen (0.9 µg/L 4-NQO), zwischen den Hepatocyten große Fasereinlagerungen; Original 3150 x.



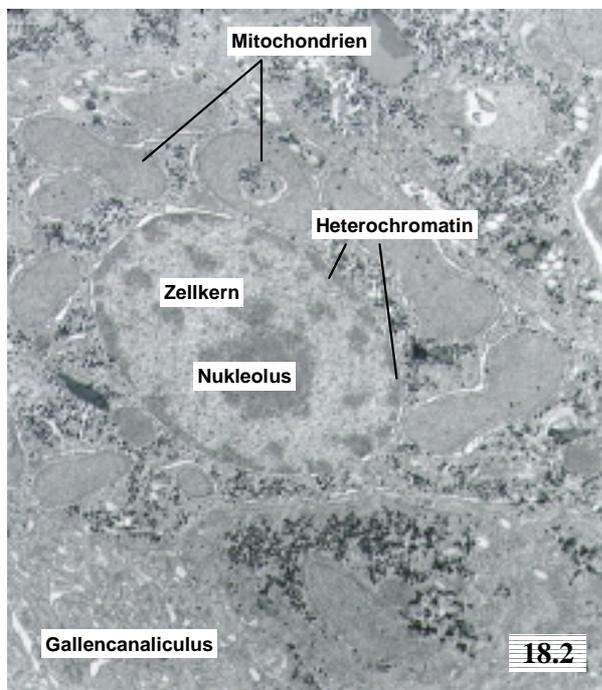
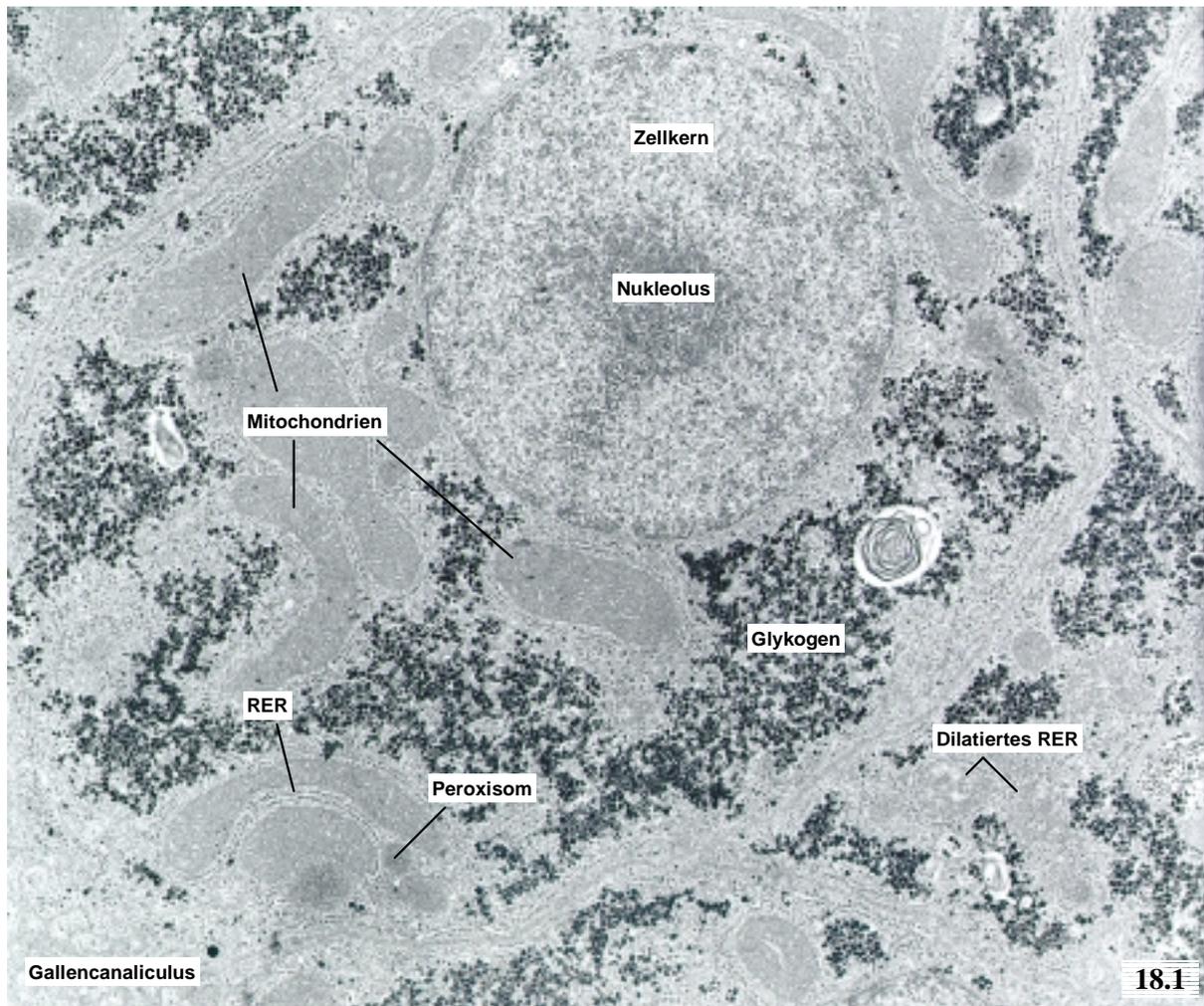
**Bildtafel 15:** Übersicht Leberparenchym, Hepatocyten, Kontrollweibchen. *Beschreibungen, siehe Seite 123.*



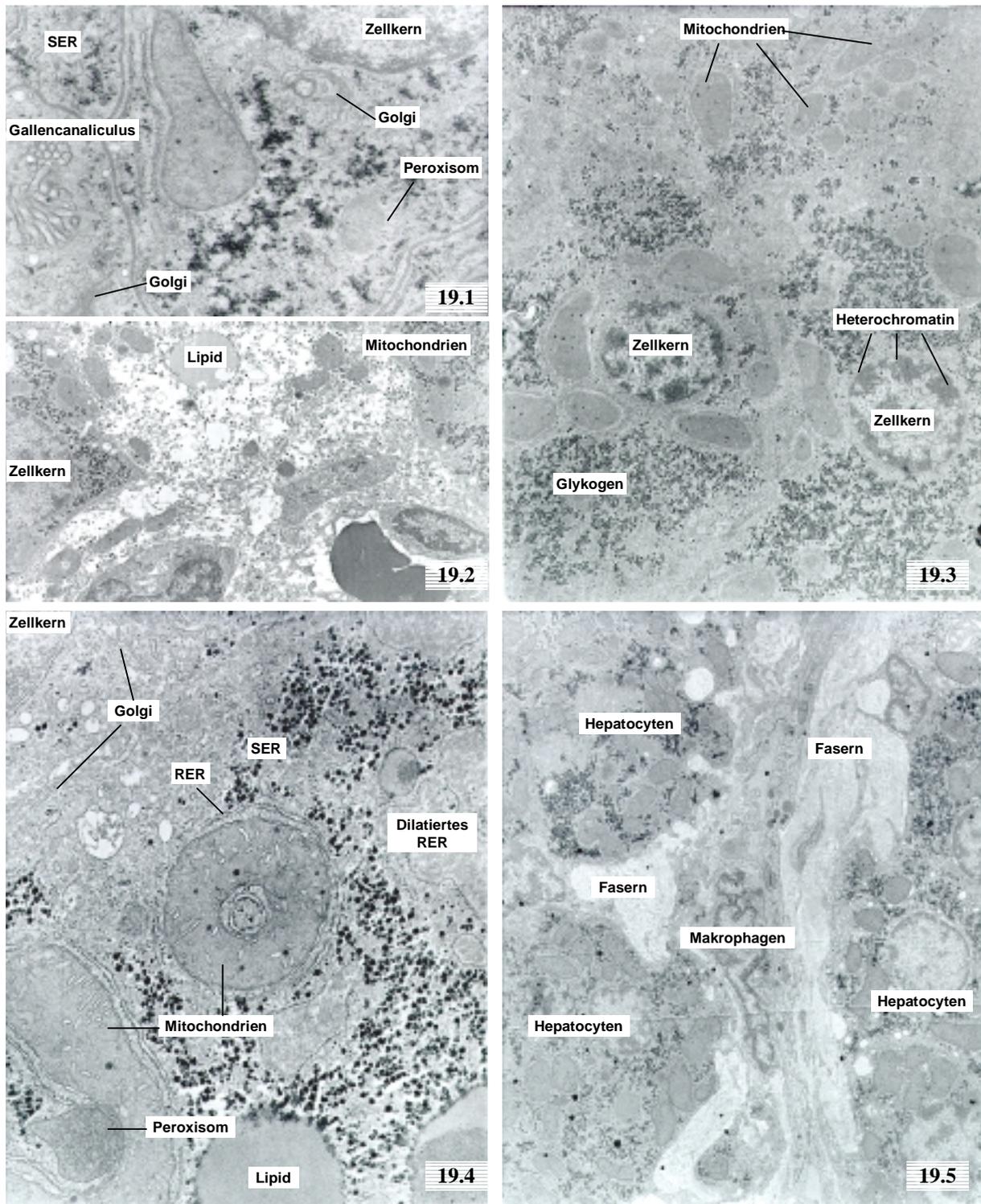
**Bildtafel 16:** **16.1:** Übersicht Leberparenchym des mit 0.9 µg/L 4-NQO belasteten Weibchen: Parenchym wirkt heterogener, an verschiedenen Stellen sind Makrophagen-Anschnitte zu erkennen; Original 3150 x. **16.2:** Übersicht Leberparenchym aus weiblichem Zebrafahrbling, belastet mit 0.9 µg/L 4-Nitroquinolin-N-oxid im Life-Cycle. **16.3:** Ausschnitt Zelle, sehr große RER-Stapel und große Golgi-Apparate, 0.9 µg/L 4-NQO; Original 6300x. **16.4:** Granulocyt in größerem Gefäß; Original 5000 x. **16.5:** Übersicht Parenchym, Makrophagen zwischen den Hepatocyten, 2.7 µg/L 4-NQO, Original 5000 x.



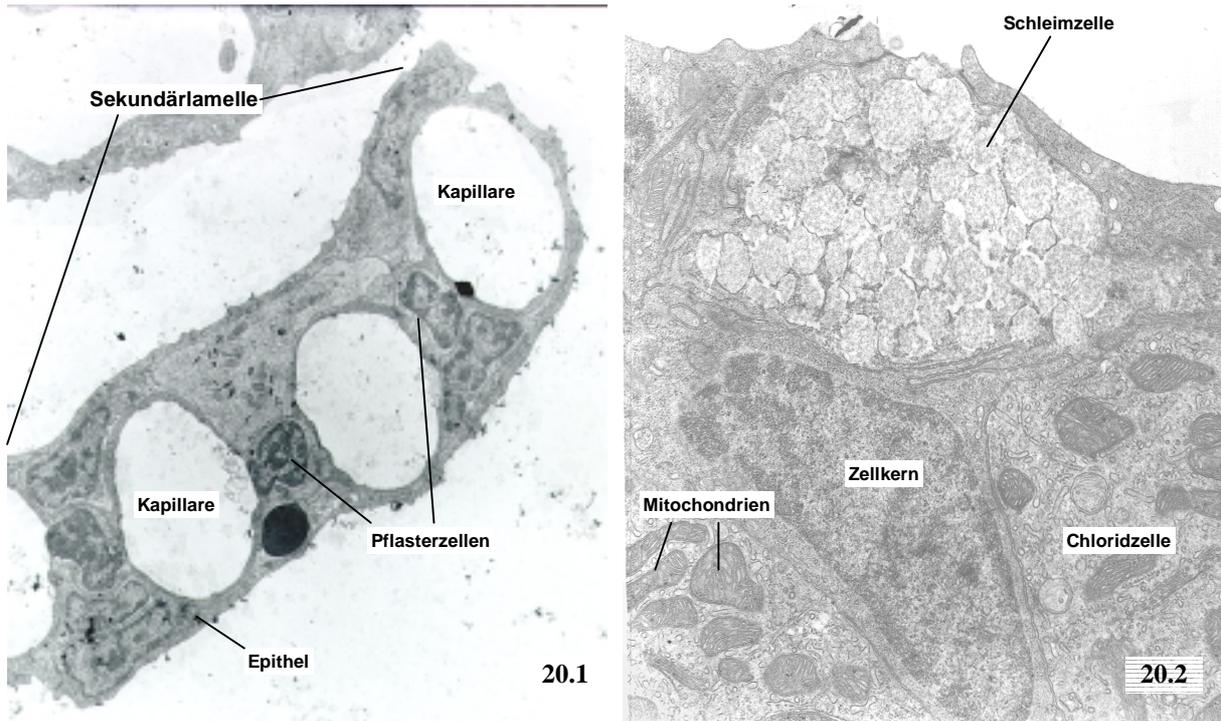
**Bildtafel 17:** Leberparenchym, belastetes Weibchen. *Beschreibungen siehe Seite 123*



**Bildtafel 18:** Kontrollmännchen, belastetes Männchen. *Beschreibungen siehe Seite 123*



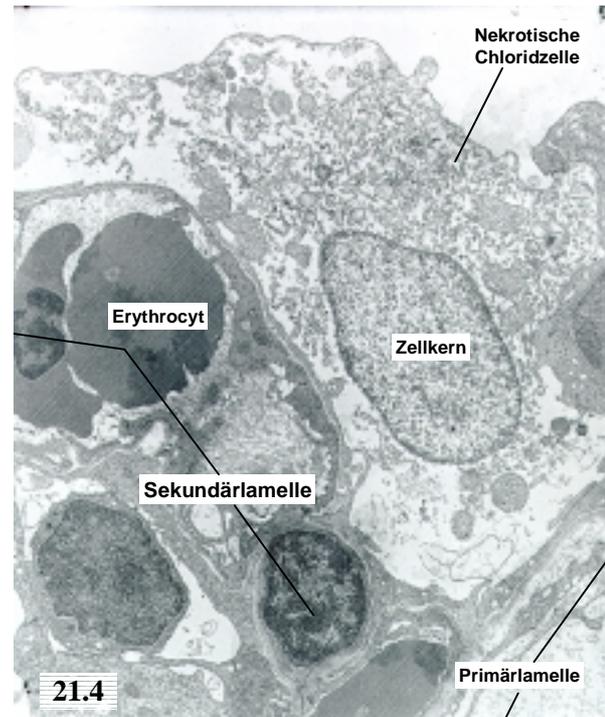
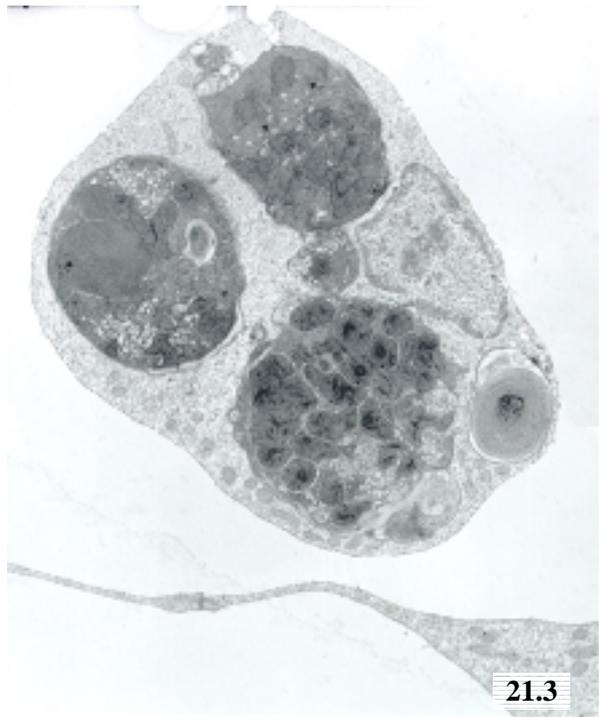
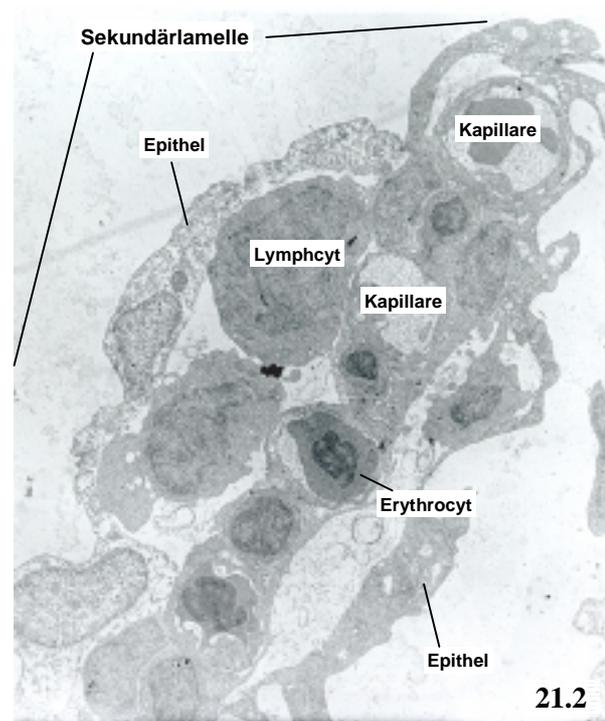
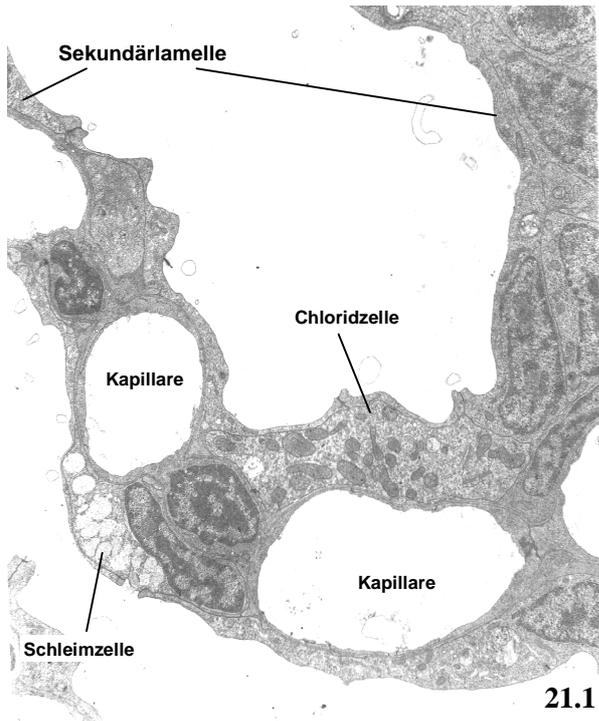
**Bildtafel 19:** **19.1:** Ausschnitt Hepatocyte, belastetes Männchen (0.9  $\mu\text{g/L}$  4-NQO); Original 8000 x. **19.2:** Ausschnitt Hepatocyten, belastetes Männchen (2.7  $\mu\text{g/L}$  4-NQO), im Leberparenchym eingestreut häufig entspeicherte Areale lassen das; Original 5000 x. **19.3:** Übersicht Hepatocyten, belastetes Männchen (2.7  $\mu\text{g/L}$  4-NQO), Kerne mit großem Heterochromatin-Anteil; Original 3150 x. **19.4:** Ausschnitt Hepatocyte, belastetes Männchen (8.1  $\mu\text{g/L}$  4-NQO), variable Mitochondrien-Formen, zwischen Glykogen-Partikeln Glattes Endoplasmatisches Retikulum, große, dilatierte RER-Zisternen, Original 10000 x. **19.5:** Übersicht Parenchymstörung, belastetes Männchen (8.1  $\mu\text{g/L}$  4-NQO), große Fasereinlagerungen, dazwischen Makrophagen; Original 3150 x.



**Bildtafel 20: 20.1:** Sekundärlamelle Zebrafärbling ♂, regelmäßiger Aufbau aus Kapillaren, diese umschließende Epithelzellen sowie Pflasterzellen, als interne Stützelemente; Original 2500 x. **20.2:** Oberfläche der Primärlamelle: Schleimzelle mit benachbarter Chloridzelle; Original 5000 x.

**Bildtafel, 21 siehe folgende Seite:**

**Bildtafel 21: 21.2:** Basis Sekundärlamelle, vergleichbar Kontrolle, ♂ aus Belastungskonzentration 2.7 µg/L 4-Nitroquinolin-*N*-oxid; Original 3150 x. **21.2:** Spitze Sekundärlamelle aus gleichem Individuum, Epithelaufreibungen, nekrotische Zellen; Einwandern von Makrophagen unter die Epithelzellen; Original 3150 x. **21.3:** Makrophage mit phagozytierten Schleim- und Chloridzellen; Original 5000 x. **21.4:** Basis Sekundärlamelle, nekrotische Chloridzelle, ♂ aus Belastungskonzentration 8.1 µg/L 4-NQO; Original 5000 x.



**Bildtafel 21:** Kieme, belastete Männchen. *Beschreibungen siehe Seite 129.*

### 3.11 Untersuchungen zur teratogenen Wirkung der Referenzsubstanzen auf die Embryonalentwicklung des Zebrafisches

Die im Comet Assay getesteten Referenzsubstanzen 2-Acetylaminofluoren (0,022 – 223 mg/L), Benzo[a]pyren (0,025 – 25,2 mg/L), Dimethylnitrosamin (0,0074 – 740 mg/L), Nitrofurantoin (0,024 – 720 mg/L), N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin (0,005 – 50 mg/L), 4-Nitroquinolin-N-oxid (0,0019 – 19 mg/L) sowie UV C-Licht (15 sec – 16 min) wurden in dieser Untersuchung auf ihre teratogene Wirkung im Embryotoxizitäts- sowie Early Life Stage-Test mit dem Zebrafisch getestet. Hintergrund dieser Studie, in der die gleichen Konzentrationen wie im Comet Assay untersucht wurden, war der Versuch, die in den Abschnitten 3.1-3.6 aufgezeigten Effekte im Comet Assay mit anderen biologischen Endpunkten korrelieren zu können. Hierfür wurde jede Substanz dreimal getestet.

Der Tabelle 4 in Abschnitt 2.10 sind die nach 24, 48, 72 und 96 h untersuchten Parameter zu entnehmen. In die folgende Auswertung wurden aber nur die Daten nach 48 h (Ende des klassischen Embryotoxizitätstest) sowie nach 96 h (Ende des Early-Life-Stage Tests) einbezogen. Hierbei wurden die der Tabelle 35 zu entnehmenden Endpunkte nach der jeweiligen Untersuchungszeit als letal gewertet. Dieser Bewertung wurden mögliche morphologisch-anatomische und ökologische Konsequenzen aus den beobachteten Veränderungen der betroffenen Individuen zugrunde gelegt (*letal = (1) abgestorben, (2) deutliche Reduktion der Fitness des betroffenen Individuums*): selbst nach 96 h muß ein undifferenzierter Zellhaufen (keine Somiten angelegt) noch nicht abgestorben sein, aber eine Weiterentwicklung kann ausgeschlossen werden, somit ein letaler Endpunkt. Auch nach 96 h noch nicht geschlüpfte Individuen wurden (*unter den gewählten Versuchsbedingungen schlüpfen die Tiere zwischen 48 und 72 h*), obwohl lebend, als letal gewertet, da ein so spät schlüpfender, in seiner Entwicklung deutlich retardierter Fisch Selektionsnachteile hat, und die Tiere nach tatsächlich erfolgtem Schlupf zu 100 % Verkrümmungen in der Längsachse aufwiesen (siehe Bildtafel 24). Auch die beobachteten Oedeme (siehe Bildtafel 24) wurden in diese Bewertung aufgenommen: Von der Bildung von Perikardialoedemen dieser Ausprägungsstärke zeigte sich auch das Blutgefäßsystem immer mitbetroffen, Mißbildungen des Herzens und ein nicht geschlossenes Gefäßsystem wurden parallel beobachtet.

**Tab. 35:** Endpunkte der Untersuchung im Embryotoxizitäts (48 h)- und Early-Life-Stage (96 h)-Test

Endpunkt	48 h	96 h
Koagulierter Keim	x	x
Keine Somiten	x	x
Keine Schwanzablösung	x	x
Kein Herzschlag	x	x
Keine Augenanlagen	x	x
Kein Blutkreislauf	x	x
Keine Spontanbewegung	x	x
Oedeme	x	x
Nicht geschlüpft		x
Retardierte Entwicklung		x
Mißbildungen		x
Verkrümmungen		x

*Kontrollen:* Direkt nach Ablachen und Befruchtung beginnt die Entwicklung der Eier. Mit Beginn des Vierzellstadiums lassen sich befruchtete und unbefruchtete Eier erstmals unzweifelhaft unterscheiden. Nach etwa 4 h hat sich beim befruchteten Ei durch die Zellteilungsaktivität eine milchig-trübe Keimscheibe gebildet (Bildtafel 22, Abb. 22.1 u. 22.2), bei unbefruchteten Eiern bleibt diese durchsichtig (Abb. 22.2: \*). Nach 24 h hat der Embryo seine Gestalt ausgebildet, Kopf und Augenanlagen sind deutlich erkennbar, ebenso Wirbelsäule, Herzschlag und Blutgefäßsystem; lediglich die Pigmentierung fehlt (Abb. 22.3). Zu dieser Zeit führt er heftige Spontanbewegungen aus. Nach 48 h nehmen Spontanbewegungen bedingt durch Platzmangel deutlich ab, der Embryo ist jetzt stark pigmentiert (Abb. 22.4). Bei den gegebenen Versuchsbedingungen schlüpfen die Tiere zwischen 48 h und 72 h. Kurz nach dem Schlupf hält sich die Fischlarve hauptsächlich am Gefäßgrund in Seitenlage auf (Abb. 22.5), nach 96 h schwimmt sie aktiv (Abb. 22.6).

*2-Acetylaminofluoren (2-AAF)* zeigte sehr deutliche Effekte mit einer LC 50 von 0,32 mg/L nach 48 h sowie von 0,22 mg/L für den Early-Life-Stage-Test nach 96 h (Abb. 76). In den ersten 48 h konnte eine deutliche Ja/Nein-Antwort beobachtet werden, entweder die Eier koagulierten oder die Entwicklung verlief ohne sichtbare Symptomatik. Es konnten nur sehr wenige Entwicklungsanomalien, hauptsächlich verkrüppelte Schwanzbereiche (Bildtafel 23, Abb. 23.5), in den höheren Konzentrationen festgestellt werden. Im folgenden Early-Life-Stage-Test konnte eine dosisabhängige Verringerung der Schlupfrate festgestellt werden. Zwischen 48 h und 72 h schlüpfen die unbelasteten Fische der Kontrolle, während bei 0,24 mg/L nach 72 h noch 40 % nicht geschlüpft waren. Hinsichtlich der weiteren überprüften Parameter zeigten die exponierten Tiere vor allem eine deutlich verlangsamte Entwicklung, und die geschlüpften Zebrabärblinge verblieben mit steigender Konzentration in Seitenlage. Nach 96 h waren bei einer 2-AAF-Konzentration von 0,28 mg/L noch 30 % der Tiere nicht geschlüpft. Einige schlüpfen zwischen 96 h und 120 h, diese Tiere waren jedoch alle fast halbkreisförmig gekrümmt (Bildtafel 24, Abb. 24.1, 24.2).

Im Gegensatz zu *2-Acetylaminofluoren* zeigte die Belastung der befruchteten Eier mit *Benzo[a]pyren*-Konzentrationen bis zur Löslichkeitsgrenze (bei etwa 25 mg/L) kaum Effekte (Abb. 77). In der höchsten Konzentration (25,2 mg/L) waren nach 48 h etwa 10 % der Eier koaguliert, weitere Effekte zeigten sich auch in den folgenden 48 h nicht.

Auch *Dimethylnitrosamin* zeigte weder im Embryotoxizitäts- noch im Early-Life-Stage Test deutliche Effekte auf die Entwicklung des Zebrabärblings vom befruchteten Ei bis zur freischwimmenden Fischlarve nach 96 h. Erst die beiden höchsten getesteten Konzentrationen mit 148 mg/L und 740 mg/L wiesen Ausfälle zwischen 5 – 25 % auf (Abb. 78).

*Nitrofurantoin* als Modellsubstanz für Versuche über oxidativen Stress zeigte wenig Auswirkung auf die Embryonalentwicklung in den getesteten Konzentrationen von 0,024 – 720 mg/L. Bis 48 h zeigten sich konzentrationsabhängige Effekte ab 80 mg/L in der Embryotoxizitätsprüfung mit einem Maximum von 30 % Ausfall. Hierbei zeigte sich ähnlich wie bei *2-Acetylaminofluoren* eine Ja/Nein – Antwort, denn bei den Ausfällen handelte es sich ausnahmslos um koagulierte Eier / Embryonen. Im Early-Life-Stage Test wurde dann bei 720 mg/L Nitrofurantoin eine Ausfallrate von 60 % erreicht (Abb. 79), hierbei ist diese höchste *Nitrofurantoin*-Konzentration wieder an der Löslichkeitsgrenze.

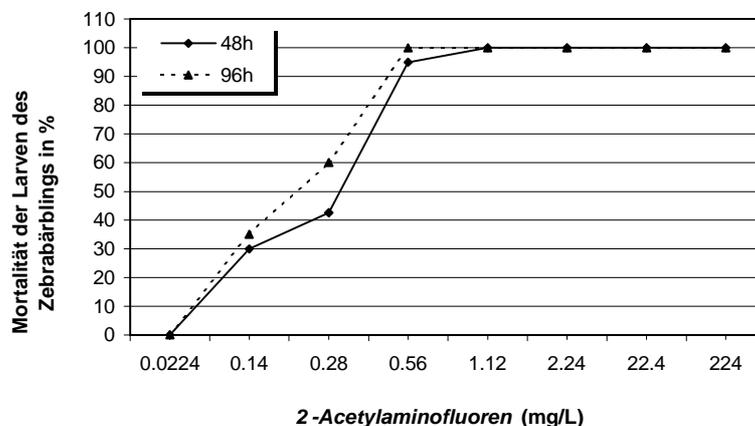
Die drei folgenden Gentoxine (*N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin*, *4-Nitroquinolin-N-oxid* sowie *UV C<sub>[254 nm]</sub>*) zeigten ein sehr ähnliches Wirkungsbild mit einer sehr steilen Dosis-Wirkungs-Beziehung im jeweiligen Effektbereich. Hierbei wurden mit steigender Dosis massive Störungen der Embryonalentwicklung induziert: frühzeitig koagulierte Eier, Ausfall einer gerichteten Entwicklung (Endstadium Zellhaufen), Verkrüppelungen, Mißbildungen sowie große Oedeme. Nach 96 h geschlüpfte Tiere zeigten zum Teil deutliche Veränderungen in der Körperform (Bildtafel 24).

Für *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* (MNNG) lag die LC 50 nach 48 h und 96 h zwischen 0,8 – 0,9 mg/L (Abb. 80). Im Embryotoxizitätstest zeigten sich zahlreiche Embryonen mit starken Ent-

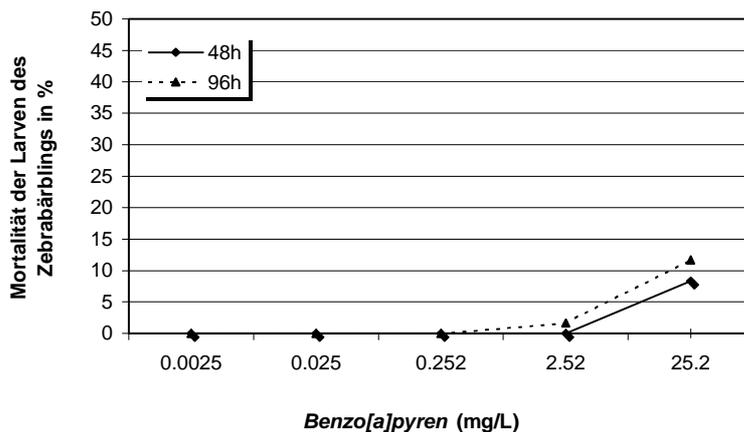
wicklungsstörungen, die Bildung der Wirbelsäule erfolgt, eine Differenzierung in Kopf- und Schwanzregion unterblieb (Bildtafel 23, Abb. 23.1 u. 23.2). Weiterhin traten starke Wirbelsäulenverkrümmungen bei den belasteten Embryonen vermehrt auf (Abb. 23.8). Neben den oben genannten Symptomen zeigte sich, im Vergleich mit den anderen Substanzen, die Induktion großer Oedeme im Herzbereich als charakteristisch für die Belastung mit MNNG (Bildtafel 24, Abb. 24.7 u. 24.8). Weiterhin konnte gehäuft eine gestörte Epidermisentwicklung bei den geschlüpften Tieren beobachtet werden. Die Epidermis gab ein rauhes, unregelmäßiges Bild (Abb. 24.6).

*4-Nitroquinolin-N-oxid* erwies sich unter den getesteten Chemikalien als das stärkste Teratogen mit einer LC 50 von 0,63 mg/L nach 48 h und 0,27 mg/L bei 96 h und einer sehr steilen Effektkurve, die LC 100 für 48 h lag schon bei 0,7 mg/L, die für 96 h bei 0,47 mg/L (Abb. 81). Auch in den niedrigen Testkonzentrationen mit geringeren Ausfallraten zeigten sich schon schwere Mißbildungen und Entwicklungsstörungen, als Endstadium der Entwicklung ein nicht differenzierter Zellhaufen (Bildtafel 22, Abb. 22.7), keine Cephalisation (Abb. 22.8) sowie starke Wirbelsäulendeformationen (Abb. 23.3 u. 23.4). Nach 48 h konnten weiterhin gering entwickelte Embryonen mit deutlich gestörter Epidermisentwicklung beobachtet werden (Abb. 23.7). Im Early-Life-Stage schlüpfen zahlreiche Larven mit stark veränderter Gestalt, großen Oedemen sowie gestörter Epidermisentwicklung (Bildtafel 24, Abb. 24.3 – 24.5).

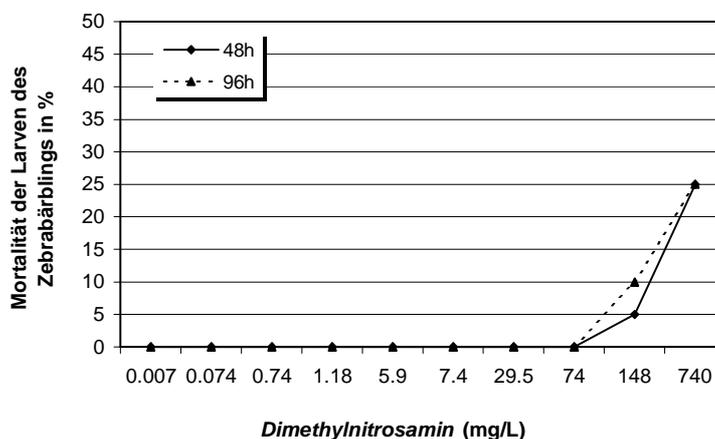
Vergleichbar in den Effekten mit MNNG und 4-NQO zeigte sich die UV C-Belastung, die mit einer Stärke von 0,27 mV/cm<sup>2</sup> in verschiedenen Expositionszeiten getestet wurde. Hier lagen die LC 50-Werte für beide Tests sehr nahe zusammen bei 105 sec (Abb.82). Sehr ähnlich zu manchen 4-NQO-Effekten konnten nach 48 h gering entwickelte Embryonen mit gestörter Epidermisbildung und großen Oedemen beobachtet werden (Bildtafel 23, Abb. 23.6).



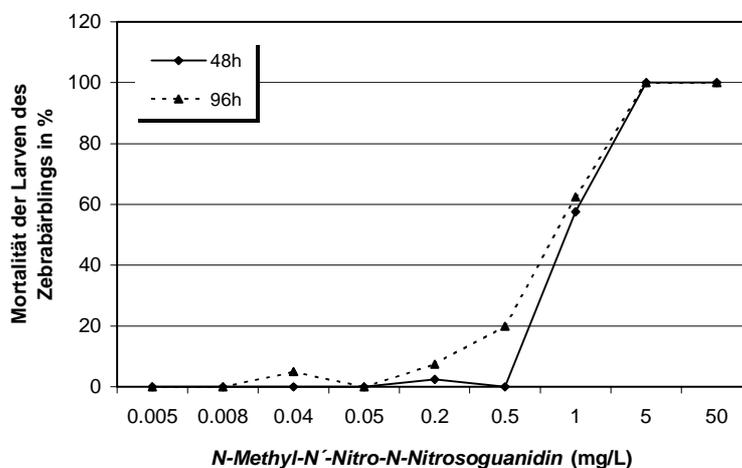
**Abb. 76:** Mortalität von Larven des Zebrafischarb (Danio rerio) nach Belastung mit 2-Acetylaminofluoren. Pro Konzentration wurden 20 Embryonen nach 48 h sowie 96 h Exposition untersucht. Daten aus 3 unabhängigen Versuchen.



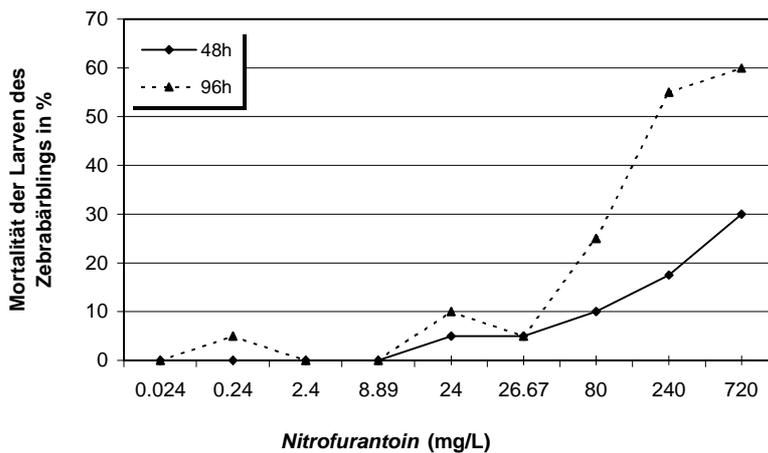
**Abb. 77:** Mortalität von Larven des Zebrafischarb ( *Danio rerio* ) nach Belastung mit *Benzo[a]pyren*. Pro Konzentration wurden 20 Embryonen nach 48 h sowie 96 h Exposition untersucht. Daten aus 3 unabhängigen Versuchen.



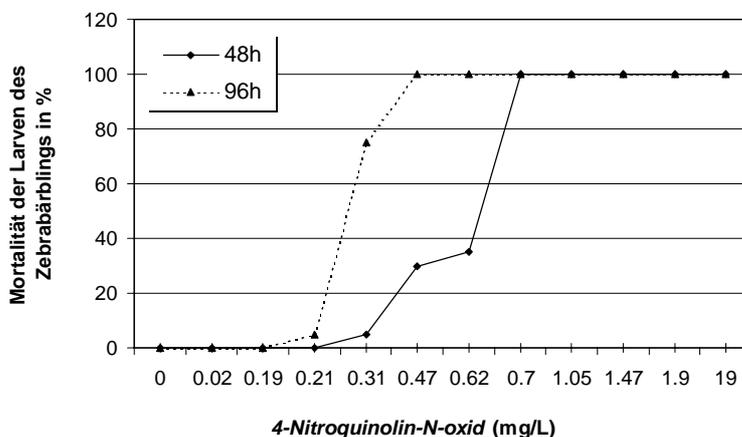
**Abb. 78:** Mortalität von Larven des Zebrafischarb ( *Danio rerio* ) nach Belastung mit *Dimethylnitrosamin*. Pro Konzentration wurden 20 Embryonen nach 48 h sowie 96 h Exposition untersucht. Daten aus 3 unabhängigen Versuchen.



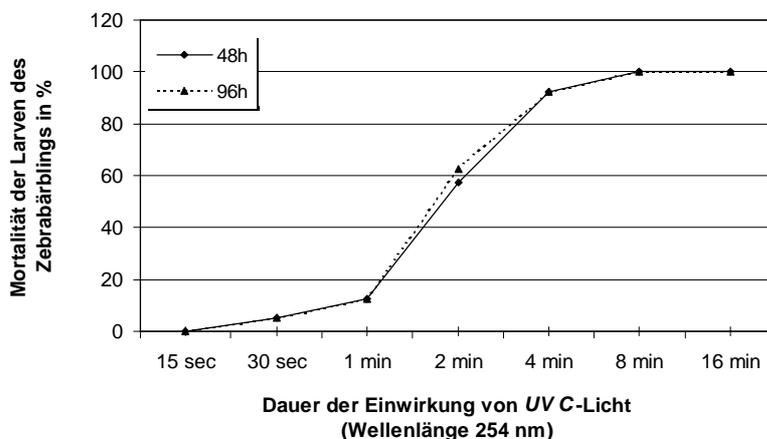
**Abb. 79:** Mortalität von Larven des Zebrafischarb ( *Danio rerio* ) nach Belastung mit *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin*. Pro Konzentration wurden 20 Embryonen nach 48 h sowie 96 h Exposition untersucht. Daten aus 3 unabhängigen Versuchen.



**Abb. 80:** Mortalität von Larven des Zebrabärlings (*Danio rerio*) nach Belastung mit *Nitrofurantoin*. Pro Konzentration wurden 20 Embryonen nach 48 h sowie 96 h Exposition untersucht. Daten aus 3 unabhängigen Versuchen.



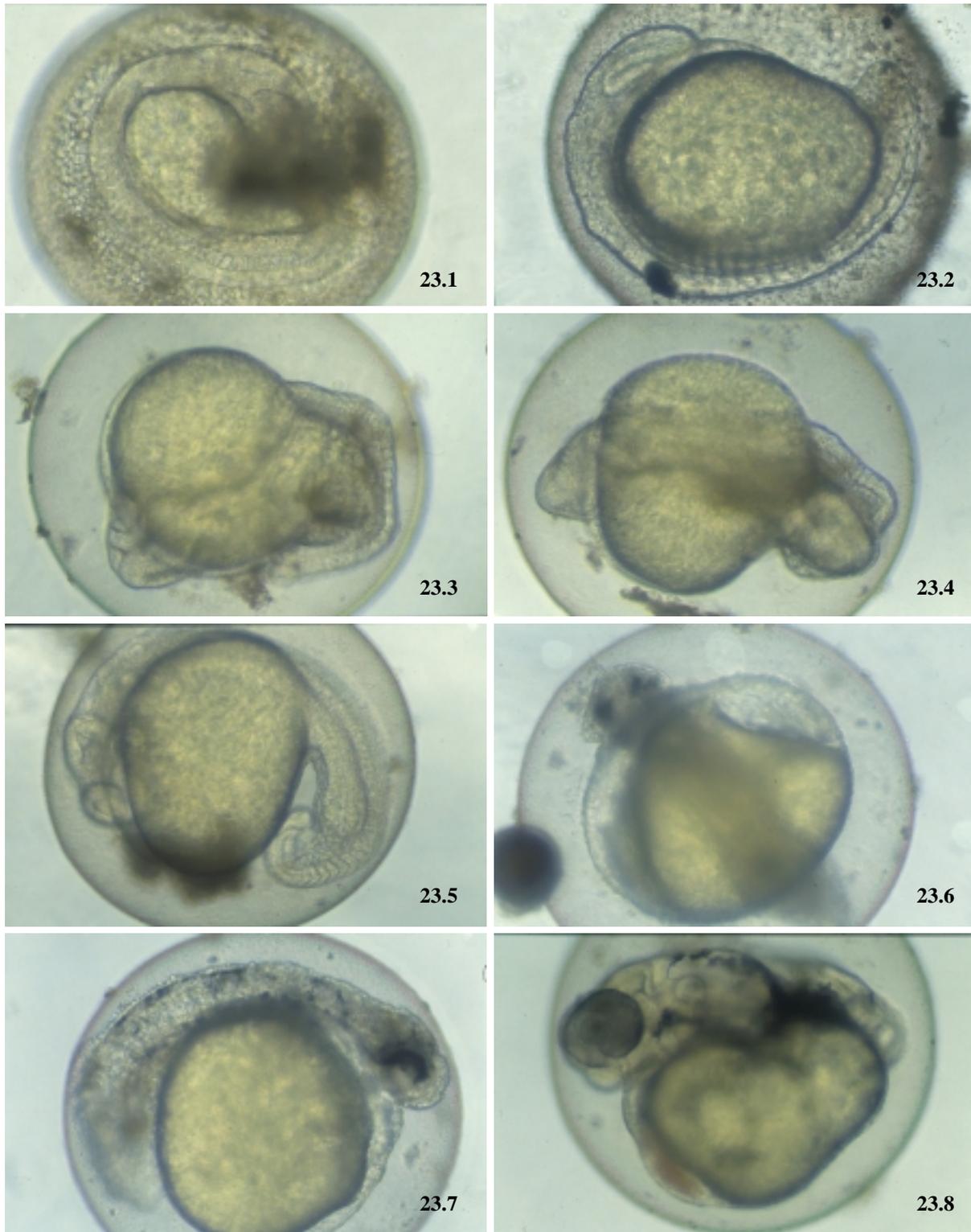
**Abb. 81:** Mortalität von Larven des Zebrabärlings (*Danio rerio*) nach Belastung mit *4-Nitroquinolin-N-oxid*. Pro Konzentration wurden 20 Embryonen nach 48 h sowie 96 h Exposition untersucht. Daten aus 3 unabhängigen Versuchen.



**Abb. 82:** Mortalität von Larven des Zebrabärlings (*Danio rerio*) nach Belastung mit *UV C-Licht*. Pro Konzentration wurden 20 Embryonen nach 48 h sowie 96 h Exposition untersucht. Daten aus 3 unabhängigen Versuchen.



**Bildtafel 22:** Embryotoxizitäts- und Early-Life-Stage-Untersuchungen mit dem Zebrafärbling (*Danio rerio*), Kontrollen. **22.1** und **22.2:** Eier etwa 4 h nach Eiablage; \* unbefruchtetes Ei; **22.3:** ca. 24 h alter Embryo, noch nicht pigmentiert, mit kräftigen Spontanbewegungen; **22.4:** ca. 48 h alter Embryo, deutlich pigmentiert. **22.5:** Fischlarve etwa 72 h alt, häufig noch auf dem Gefäßgrund in Seitenlage. **22.6:** Fischlarve nach etwa 96 h, aktive Schwimmbewegungen. Original: **22.1** u. **22.2:** 23 x, **22.3** u. **22.4:** 43 x, **22.5** u. **22.6:** 16 x. **22.7:** Undifferenzierter Zellhaufen, nach 24 h Exposition gegenüber 310 µg/L 4-NQO. **22.8:** 24 h alt, keine Ausdifferenzierung von Kopf- und Schwanzbereich (310 µg/L 4-NQO). Original: **22.7:** 43 x u. **22.8:** 23 x.



**Bildtafel 23:** Embryotoxizitäts-Untersuchungen mit *Danio rerio*: **23.1** und **23.2:** Gering entwickelte Embryonen nach 24 h Inkubation in 1 mg/L *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin*. Die Cephalisation ist weitgehend unterblieben; **23.3** und **23.4:** Starke Verkrümmungen der Wirbelsäule nach 24 h Belastung mit 4-Nitroquinolin-*N*-oxid, auch die in **23.4** abgebildete Larve zeigt eine nur rudimentäre Kopfentwicklung; **23.5:** Embryo mit Deformation der Schwanzwirbelsäule nach 24 h Belastung mit 280 µg/L 2-Acetylaminofluoren. **23.6:** 48 h alter Embryo nach einmaliger Bestrahlung mit *UV C* für 8 min, starke Oedembildung. **23.7:** 48 h alter Embryo, ähnlich **23.6**, nach Belastung mit 310 µg/L 4-Nitroquinolin-*N*-oxid; gestörte Entwicklung der Epidermis. **23.8:** 48 h, Belastung mit 1 mg/L MNNG; Tier mit starker Wirbelsäulenverkrümmung, ohne ausdifferenzierten Schwanzbereich und mit deutlichem Perikardialoedem. Original **23.1** – **23.8:** 43 x.



**Bildtafel 24:** Early-Life-Stage-Untersuchungen mit dem Zebrafärbling (*Danio rerio*): **24.1:** Stark gekrümmte Fischlarve nach 96 h Belastung mit 280 µg/L 2-Acetylaminofluoren. **24.2:** Belastung siehe **24.1**, Fischlarve bleibt auch außerhalb des Eies in eingerollten Körperhaltung. **24.3 – 24.5:** Fischlarven nach 96 h Belastung mit 310 µg/L 4-Nitroquinolin-N-oxid; deutliche Veränderungen der Körperform sowie starke Oedembildung. **24.6:** Belastung mit 1 mg/L N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin; stark aufgetriebene Leibeshöhle, gestörte Epidermisentwicklung; **24.7** und **24.8:** Veränderungen der Körperform sowie starke Ausbildung von Perikardialoedemen nach 1 mg/L MNNG-Belastung. Originale **Bildtafel 24:** **24.1-24.7:** 16 x, **24.8:** 43 x.

## 4 Diskussion

### 4.1 Voruntersuchungen zur Optimierung des Comet Assays mit RTG-2 Zellen

In ersten Versuchsreihen wurden Expositionsschemata entwickelt, die einen besonders schonenden Umgang mit den zu exponierenden Zellen erlauben, da der Endpunkt DNA-Strangbruch auch über unterschiedlichste Streßfaktoren während des Handlings induziert werden kann. Da dieser Endpunkt aber auch ein schnell reparierbares Ereignis darstellt, wurde darauf geachtet, die Zeit zwischen Ende der Exposition und dem Eingießen in die Gele sehr kurz zu halten.

Der Comet Assay beruht auf der Wanderung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld. Ob es sich hierbei aber in jedem Fall um Einzelfragmente oder nur um entspiralisierte Einzelstränge handelt, die im elektrischen Feld aus dem im Gel eingegossenen Zellareal herauswandern, ist weiterhin strittig (Klaude et al., 1996; McKelvey-Martin et al., 1993; Singh, 1996; Singh und Stephens, 1997). Trotz dieser methodischen Unklarheit ist die bestmögliche Exponierung der entwundenen DNA-Stränge im elektrischen Feld während der Elektrophorese für die Sensitivität des Assays (Detektion nur weniger Schadensereignisse) von entscheidender Bedeutung. Deshalb mußten Denaturierungs- und Elektrophoresezeiten dem zu untersuchenden Objekt angepaßt oder zumindest bestehende Testprotokolle bezüglich möglicher Sensitivitätssteigerungen untersucht werden. Um diese Versuche mit einer sehr homogenen Zellpopulation durchführen zu können, wurde hierfür die Dauerzelllinie RTG-2 aus der Gonade der Regenbogenforelle verwendet. Es zeigte sich jedoch, daß das für Säugerzellen etablierte Testprotokoll (Tice et al., 1996) für Fischzellen übernommen werden kann.

Weiterhin wurden mit den RTG-2 Zellen Expositionsschemata sowohl für wasserlösliche und in Stammlösungen (*Lösungsvermittler Dimethylsulfoxid, DMSO*) angesetzte Einzelsubstanzen und Umweltproben als auch für Wasserproben getestet. Diese Versuche bildeten die Grundlage für die Untersuchungen mit den Primärzellen, bei denen das Expositionsschema verändert werden mußte, um der geringen Adhäsion der Primärzellen an den Gefäßgrund Rechnung zu tragen. Während die Exposition von RTG-2 Zellen einer konfluenten Monolayerkultur mit einer genotoxischen Noxe einfach über einen Mediumwechsel im entsprechenden Kulturgefäß erfolgen konnte, konnten die abgelösten Primärzellen erst nach einem Zentrifugationsschritt in das entsprechende Expositionsmedium aufgenommen und ausgesät werden.

### 4.2 *In vitro*-Untersuchungen mit isolierten Primärzellen aus dem Zebraabärbling

#### 4.2.1 *In vitro*-Untersuchungen zur Genotoxizität ausgewählter Monosubstanzen

Auch in Fischen erfolgt die Biotransformation von Fremdstoffen über unterschiedliche Enzymsysteme, unter denen das Cytochrom P450-System eine herausragende Rolle spielt, da es von verschiedenen Xenobiotika induziert werden kann (Monod et al., 1998). Allerdings ist bei Fischen bisher nur das P450 CYP1A nachgewiesen, während Säuger über verschiedene Isoformen verfügen (Stegemann, 1989). Weiterhin zeigen vergleichende Untersuchungen zur metabolischen Kompetenz von S9-Fractionen aus Fischen und Nagetieren eine deutlich schwächere Wirkung der Fisch-S9-Präparate (De Flora et al., 1982; Yamashita et al., 1987) die auch einen geringeren Gehalt an P450 aufweisen (Ade et al., 1984). Zudem wurden selbst zwischen nahe verwandten Arten wie zwei amerikanischen Katzenwelsen (*Ameiurus nebulosus* und *Ictalurus punctatus*) deutliche Unterschiede in der Metabolisierung

von Xenobiotica festgestellt (Ploch et al., 1998). Durch Induktion mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-Dioxin (TCDD) konnte in verschiedenen Organen von *Danio rerio* die Expression von Cytochrom P450 1A nachgewiesen werden (Buchmann et al., 1993).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Monosubstanzen *2-Acetylaminofluoren*, *Benzo[a]pyren* sowie *Dimethylnitrosamin* bedürfen der Aktivierung über das Cytochrom P450-System, um mit der DNA über Adduktbildung in Wechselwirkung zu treten (Rodrigues et al., 1994; Sykora et al., 1985; Walum et al., 1990), während *Nitrofurantoin*, *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* sowie *4-Nitroquinolin-N-oxid* zwar z. T. auch über cytosolische Enzyme wie verschiedene Nitroreduktasen verstoffwechselt werden (Menichini et al., 1989; Youngman et al., 1982), ihre DNA-schädigende Wirkung aber hauptsächlich über die Induktion von oxidativem Stress entfalten. Hierbei handelt es sich auch um den Hauptwirkmechanismus von Wasserstoffperoxid, einem klassischen Induktor von oxidativem Stress. Ebenfalls getestet wurde die Wirkung verschiedener Expositionszeiten gegenüber UV C-Strahlen. Hierbei kommt es durch Absorption des Lichts in den Nukleinsäuren (Maximum der DNA-Absorption bei 254 nm; Wellenlänge UV C = 200-280 nm) zur Bildung von Photoprodukten wie Thymindimeren und dem in der Mutagenese wichtigen 6-4-Pyrimidin-Thymin-Photoprodukt (Hagen, 1994). Außerdem können DNA-Strangbrüche gesetzt werden.

Die für einen Genotoxizitätstest auf primäre DNA-Schäden lange Expositionszeit von 20 h wurde im Standardprotokoll mit Fischzellen etabliert, nachdem erste Prüfungen über 2 h keine oder nur sehr schwache Effekte für *2-Acetylaminofluoren*, *Benzo[a]pyren* und *Dimethylnitrosamin* erbracht hatten. In dieser Testreihe wurden die Experimente für die 3 Substanzen sowohl mit als auch ohne exogene Aktivierung über S9-Präparate durchgeführt. Da die genannten Substanzen hauptsächlich über Adduktbildung mit der DNA interagieren (Tab. 36), ist die im Comet Assay detektierbare DNA-Fragmentierung ein Ergebnis zellulärer Reparaturleistungen (Speit und Hartmann, 1995). Da Fische nur über eine vergleichsweise geringe Kapazität zur Excisionsreparatur verfügen (Maccubin, 1994) und in entsprechenden Untersuchungen eine lange Adduktpersistenz nachgewiesen wurde (Sikka et al., 1990, 1991), wurde die Expositionszeit auf 20 h ausgedehnt, um derartige adduktbildende Substanzen auch mit Fischzellen im Comet Assay nachweisen zu können.

*Benzo[a]pyren* zeigte nun in beiden Zellsystemen, isolierten Hepatocyten und Kiemenzellen aus dem Zebrafisch, eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung unter Supplementierung mit S9 Präparaten aus Aroclor-induzierten Ratten, mit einer LOEC von 0.25 mg/L in Hepatocyten und Kiemenzellen. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein typisches Procarcinogen, welches über Cytochrom P450 1A1 und Epoxidhydrolasen zu reaktiven Epoxiden metabolisiert wird. Nur eine isomere Form dieser Metabolite, das *trans-7,8-diol-9,10-Epoxid*, bindet als großes Addukt an die DNA (Walum et al., 1990). Diese Aktivierungsreaktion sowie die daraus resultierende Adduktbildung konnte sowohl *in vivo* für verschiedene Fischarten als auch *in vitro* mit verschiedenen Dauerzelllinien aus Fischen bestätigt werden (Gagné und Blaise, 1995; Sikka et al., 1990, 1991; Smolarek et al., 1987).

Das Vorhandensein großer, sperriger Addukte an der DNA induziert Reparaturmechanismen, in diesem Fall die Nukleotidexcisionsreparatur (Friedberg et al., 1995). Die daraus resultierenden Incisionen zur Entfernung schadhafter DNA-Fragmente können im Comet Assay nachgewiesen werden. Allerdings ist besonders die Nukleotidexcisionsreparatur-Leistung in Fischzellen vergleichsweise gering (Ishikawa et al., 1984; Maccubin, 1994; Walton et al., 1984 a,b,c); dieses führt dann auch zu der deutlich längeren Addukt-Persistenz im Vergleich zu Säugerzellen (Varanasi et al., 1981, 1989). In ähnlicher Weise induzierte auch *2-Acetylaminofluoren* zumindest mit Hepatocyten einen deutlichen, dosisabhängigen Effekt. Im Gegensatz dazu konnte in Kiemenzellen keine DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden. *2-Acetylaminofluoren* war ursprünglich als Insektizid produziert worden, kam aber aufgrund seiner Toxizität und Tumorgenität nicht in den Handel (Verna et al., 1996). *2-AAF* wird über Cytochrom P450 *N*-hydroxyliert, wobei die Isoform CYP1A2 in Säuger-Zellsystemen die höchste

Affinität zeigte (Verna et al., 1996). Die weitere Aktivierung kann über cytosolische Sulfotransferasen laufen und führt schließlich zu den carcinogenen Metaboliten *N*-Hydroxyacetylaminofluoren und 2-Aminofluoren, welche bevorzugt am C 8 und N 2 des Guanins binden (Monteith, 1992; Steward et al., 1995). Hierbei zeigt sich der erste Schritt der Metabolisierung der Ursprungssubstanz in Fischzellen als sehr ineffektiv (James et al., 1994), und zwischen verschiedene Fischarten wurden substantielle Unterschiede in den Metabolisierungsraten von 2-AAF beschrieben (Sikka et al., 1995). Dieses ist vor allem darauf zurückzuführen, daß bei Fischen das Gleichgewicht zwischen konkurrierenden Aktivierungs- (*Metabolit kann mit der DNA und anderen Makromolekülen interagieren*) und Detoxifizierungsreaktionen viel stärker, als beim Säuger, zu detoxifizierbaren Metaboliten verschoben ist (Steward et al., 1995).

**Tab. 36:** Übersicht über die metabolische Aktivierung der ausgewählten Monosubstanzen

	Chemie	Aktivierung <sup>1</sup>	Mechanismus	Reparatur
<b>2-Acetylaminofluoren</b>	Homozyklisches Amin	N-Hydroxylierung durch Cytochrom P450 1A2, weitere Metabolisierung über Sulfotransferasen, Acetylase oder Glucuronidase	Addukte durch instabile Intermediate der Metaboliten	Nukleotid-excision
<b>Benzo[a]pyren</b>	PAH	Epoxidation durch Cytochrom P450 1A1 (Epoxid)	Aktivierung, Adduktbildung durch den Metaboliten <i>trans</i> -7,8-diol-9,10-Epoxid	Nukleotid-excision
<b>Dimethylnitrosamin</b>	Nitrosamin	$\alpha$ -Hydroxylierung durch Cytochrom P450 2E1 und 2A3 (Hydroxylderivate)	Alkylierung der DNA-Basen	DNA-Methyltransferase Basen-excision
<b>Wasserstoffperoxid</b>	Peroxid	Bildung von OH-Radikalen durch Reaktion mit zweiwertigen, komplexierten Eisen-ionen	Reaktive Sauerstoffspezies, Hydroxyradikale, oxidativer Stress	Basen-excision
<b>Nitrofurantoin</b>	Furan-derivat	Nitroreduktion durch verschiedene Nitroreduktasen	Nitroradikale, reaktive Sauerstoffradikale, Hydroxyradikale (unspezifisch)	Basen-excision
<b>N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin</b>	Nitrosamin	Bildung elektrophiler, methylierender Intermediate über Reaktion mit Glutathione-S-transferase	Alkylierung, <i>O</i> - und <i>N</i> -alkylierte DNA-Basen	DNA-Methyltransferase Basen-excision
<b>4-Nitroquinolin-N-oxid</b>	Heterozyklisches Amin	Reduktion durch Nitroreduktase zu Hydroxylaminoderivaten	Addukte durch 4-Hydroxylaminoquinolin- <i>N</i> -Oxid mit starker Destabilisierung der Helix, oxidativer Streß durch reaktive Sauerstoffspezies	Nukleotid-excision Basen-excision
<b>UV C (254 nm)</b>	Strahlung	-	Photoprodukte, Basendimere, DNA-Proteinvernetzungen, Strangbrüche	Photoreaktivierung Nukleotid-excision

<sup>1</sup> überwiegend Säugerdaten

Somit könnte die unterschiedliche Reaktion auf die 2-AAF-Belastung der beiden Zellsysteme Hepatocyten und Kiemenzellen, die über unterschiedliche Enzymausstattung verfügen, das organotrophe Verhalten widerspiegeln, welches für viele aromatische Amine charakteristisch ist. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, daß durch das Fehlen des Cofaktors 3-Phosphoadenosin-5-Phosphosulfat

(PAPS) der beteiligten Sulfotransferase in entsprechenden Zellen keine 2-AAF- induzierten DNA-Schäden nachweisbar waren (Glatt et al., 1995, 1998).

Der Nachweis der genotoxischen Wirkung von *Dimethylnitrosamin* gelang auch nach 20 h nur mit Hepatocyten aus dem Zebrafisch, allerdings war die Reaktion nur recht schwach und zeigte keine Dosis-Wirkungs-Beziehung. *Dimethylnitrosamin* wird über ein weiteres Cytochrom P450, das CYP2E1 metabolisiert und induziert dosis-abhängige DNA-Schäden in humanen Zelllinien, die die entsprechende Isoform des Cytochroms exprimieren, während in bezüglich dieser Isoform nicht kompetenten Zellen nur ein schwaches Signal beobachtet wurde (Barcelo et al., 1998). Die natürliche Enzymsausstattung der untersuchten Primärzellen aus Fischen, wie auch die des verwendeten S9-Präparats aus Aroclor-induzierten Ratten, scheint nur eine geringe Affinität gegenüber DMNA zu besitzen. Dieses deckt sich auch mit den Ergebnissen von Hong und Yang (1985), die in *In vitro*- und *In vivo*-Versuchen mit Ratten zeigen konnten, daß die Aktivierung von DMNA über eine DMNA-Demethylase gesteigert wird. Allerdings ist diese P450-abhängige Monooxygenase nicht über die klassischen P450-Inducer wie Phenobarbital oder Aroclor 1254 induzierbar. Trotzdem korreliert die nur in den Hepatocyten nachgewiesene, schwache DNA-Fragmentierung mit der Eigenschaft von DMNA im *In vivo*-Ansatz bevorzugt Lebertumore zu induzieren (Khudoley, 1984).

Die auf anderem Weg wirkenden Substanzen *4-Nitroquinolin-N-oxid* und *Nitrofurantoin*, die hauptsächlich oxidativen Stress induzieren (Tab. 36), zeigten nach 2 h Belastung einen starken, dosisabhängigen Effekt. Auch nach 20 h Exposition konnten sie noch, wenn auch in leicht schwächerer Ausprägung, im gleichen Konzentrationsbereich nachgewiesen werden (Abb. 29 u. 41). Hier wirken Reparaturprozesse der Schadensausprägung entgegen. *4-Nitroquinolin-N-oxid* war hierbei mit einer LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) von 1.9 µg/L das deutlich stärkste Gentoxin. Die Nachweisgrenze für den genotoxischen Effekt von *4-Nitroquinolin-N-oxid* sowohl bei primären Kiemenzellen als auch primären Hepatocyten aus dem Zebrafisch liegt damit deutlich unter der von Experimenten mit dem Comet Assay mit einer Tumorzelllinie aus der Maus (Kasamatsu et al., 1996) und menschlichen Zelllinien (Speit und Hartmann, 1995), deckt sich aber mit den eigenen Ergebnissen und denen von Helbig et al. (1996) mit RTG-2 Zellen sowie von Weßler et al. (1998) und Erbes et al. (1997) mit aquatischen Einzellern. 4-NQO wird über zelluläre Nitroreduktasen verstoffwechselt, sein hohes genotoxisches Potential läßt sich auf die verschiedenen dabei entstehenden Metabolite zurückführen, die oxidativen Stress induzieren, Addukte mit der DNA bilden und die Helixstruktur destabilisieren können (Harvey und Parry, 1998; Nunoshiba und Demple, 1993; Olive und Johnston, 1997).

*Nitrofurantoin* ist eine Modellsubstanz für Untersuchungen über oxidativen Stress und Redox-Cycling und führte zu ähnlichen Ergebnissen wie *4-Nitroquinolin-N-oxid*, allerdings erst bei Konzentrationen im hohen mg/L-Bereich. Auch *Nitrofurantoin* wird über Nitroreduktasen metabolisiert, der Hauptwirkmechanismus der nachgewiesenen Genotoxizität ist hierbei oxidativer Stress (Babich et al., 1993; Basak und Chatterjee, 1994; Nishimoto et al., 1991; Washburn und Di Giulio, 1988). Die LOEC lag hier für Hepatocyten und Kiemenzellen bei 2.4 mg/L.

*N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* ist ein monofunktionales alkylierendes Gentoxin, das sehr häufig in Untersuchungen über DNA-Schäden eingesetzt wird (Hartmann und Speit, 1995; Olive und Banath, 1996; Pool-Zobel et al., 1995; Yendle et al., 1997). Es induziert DNA-Modifikationen in belasteten Zellen hauptsächlich über die Methylierung nahezu aller Sauerstoff- und Stickstoff-Atome (Slamenova et al., 1997). Die im Comet Assay beobachtete DNA-Fragmentierung ist somit ein Ergebnis von DNA-Glykosylase-Aktivitäten, die über die Excision betroffener Basen alkalilabile Stellen einführen (Friedberg et al., 1995). Diese werden dann entweder über die experimentellen Bedingungen im Comet Assay in Einzelstrangbrüche übersetzt oder aber es werden die auch im Verlaufe der Basenexcision durchgeführten Schnitte detektiert. Nur mit Hepatocyten getestet, zeigte MNNG eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung mit recht einheitlicher Schadensausprägung bei den einzelnen Zellen.

Yang und Duerksen-Hughes (1998) konnten nach MNNG-Belastung eine Induktion von p53 in belasteten Zellen nachweisen, einem Genprodukt, welches bei der Arretierung des Zellzyklus zur Behebung von DNA-Schäden sowie der Induktion der Apoptose eine zentrale Rolle spielt (Harris, 1993, 1996; Hollstein et al., 1998; Kastan, 1996; Lane, 1992). Diese Funktion bestätigte Krause et al. (1997) auch für Fische in Untersuchungen über p53-Mutationen als Auslöser für MNNG-induzierte Tumore beim Medaka (*Oryzias latipes*).

Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zeigte nur nach 2 h Belastung in Primärzellen aus dem Zebrafisch eine deutliche, dosisabhängige DNA-Fragmentierung mit einem sehr variablen Effektmuster in den einzelnen Zellen. Die im Comet Assay beobachtete Genotoxizität ist hierbei auf die Induktion verschiedener radikalischer Reaktionen zurückzuführen.  $H_2O_2$  ist membrangängig und generiert innerhalb der Zelle unterschiedliche reaktive Sauerstoffspezies. Die von diesen angestossenen radikalischen Folgereaktionen oder ihr direkter Angriff auf die DNA führt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie alkalilabilen Stellen (AP-Stellen), wenn der oxidative Stress die zellulären Abwehrmechanismen abgesättigt hat (Kruszewsky et al., 1994; Visvardis et al., 1997). Nach 20 h Exposition konnte kein genotoxisches Signal im Comet Assay nachgewiesen werden, was auf zelluläre Reparatur in Kombination mit der schnellen Abnahme der Belastung durch die Instabilität des  $H_2O_2$ -Moleküls zurückzuführen sein dürfte.

Auch die Belastung primärer Hepatocyten aus dem Zebrafisch mit unterschiedlichen Expositionszeiten gegenüber UV C-Licht führte zu einer klaren Dosis-Wirkungs-Beziehung mit starker DNA-Fragmentierung in den längeren Expositionszeiten 4 min und 8 min. Nach Hagen (1994) sind die Haupteffekte von UV C-Licht auf die Dimerisierungen der DNA Basen, die sogenannten Photoprodukte, und DNA-Proteinvernetzungen. Strangbrüche sind bei niedrigeren Dosen nicht zu erwarten. So führten auch Alapetite et al. (1996), Gedik et al. (1992) und Green et al. (1992) die mit dem Comet Assay dokumentierte DNA-Fragmentierung nach UV C-Belastung in Säugerzellen auf Excisionsreparatur der betroffenen Zellen zurück. Im Gegensatz zu Säugern, wo der Nachweis bisher nicht gelang, sind aus Fischen DNA-Photolyasen bekannt, die über den Prozess der Photoreaktivierung UV-Schäden revertieren (Friedberg et al., 1995). Da für die hier diskutierten Versuche die Entkeimungslampe einer Sterilwerkbank verwendet wurde und die Zellen im Wirkungsbereich dieser Lampe einer hohen Dosis exponiert wurden, kann in diesen Experimenten die Möglichkeit strahlungsinduzierter Strangbrüche nicht ausgeschlossen werden.

Da sich mit Ausnahme von Wasserstoffperoxid mit dieser Expositionszeit sowohl die direkten als auch die indirekt wirkenden Referenzsubstanzen nachweisen ließen, wurde die 20 h-Inkubation in das Standardprotokoll für den Comet Assay mit primären Fischzellen übernommen und auch für die Genotoxizitätsprüfungen der Wasserproben verwendet.

Die im Comet Assay mit primären Fischzellen aufgezeigten LOEC-Werte für die *Monosubstanzen* 2-Acetylaminofluoren, Benzo[a]pyren, Dimethylnitrosamin, Nitrofurantoin sowie 4-Nitroquinolin-N-oxid liegen im Vergleich mit den anderen Testsystemen für Genotoxizitätstests, die im Rahmen des BMBF-Projekts ‚Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächengewässer‘ durchgeführt wurden, im Mittelfeld (siehe Tab. 37). Im allgemeinen zeigten sich die prokaryontischen Genotoxizitätstests hier als sensitiver, allerdings sind die verwendeten Teststämme gentechnisch deutlich verändert, den *Salmonella*-Stämmen im Ames Test wurde zum Beispiel die Fähigkeit zur Reparatur genommen. Demgegenüber stellen Primärzellen oder der Gesamtorganismus ein weitgehend intaktes biologisches System mit einer gewissen Reaktionsbreite dar, so daß, bevor Schadereignisse im Test erkennbar werden, erst zelluläre Abwehrmechanismen überwunden werden müssen. Dieses erschwert natürlich die reine Detektion des Schadereignisses, läßt jedoch schon erste Rückschlüsse auf die Bedeutung des gemessenen Ereignisses zu. Dieser Aspekt wird bei der Steigerung von Nachweisgrenzen in biologischen Systemen häufig vernachlässigt. Denn der Nachweis

von Genotoxizität in einer auch ohne menschliche Einflüsse genotoxischen Umwelt muß, wenn als Kontrolle ein unter optimalen Bedingungen gehälterter Organismus aus dem Labor getestet wird, gewisse qualitative biologische Hürden überwinden, um die Gefahr falsch-positiver Bewertungen zu verringern. Auch hier schließt sich dann die Forderung nach vergleichenden Untersuchungen an, um andererseits die ausreichende Sensitivität des Indikatortests überprüfen zu können (siehe Kapitel 4.6).

---

### **Genotoxizitäts-Testsysteme im BMBF-Projekt:**

#### **Ames Test:**

Mit dem Ames-Test mißt man die Reversion von Histidin-auxotrophen Mutanten des Bakterienstammes *Salmonella typhimurium* his<sup>-</sup>. Im Testansatz wird der Stamm auf Histidin-Mangelnährböden aufgetragen und die Rückmutationen (= Revertanten) zu *Salmonella typhimurium* his<sup>+</sup> über ihr Wachstum auf dem histidinfreien Nährboden erfaßt. Als Maß für die Mutagenität einer Noxe gilt die Anzahl der Revertanten. Die am häufigsten verwendeten Teststämme sind TA98 (zur Erkennung von Substanzen, die Frameshift-Mutationen erzeugen) und TA100 (zur Erkennung von Substanzen, die Basenpaar-Substitutionen erzeugen). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Erdinger (Hygiene-Institut, Universität Heidelberg) sind in Tab. 37 dargestellt.

#### **umu Test:**

Dieser Bakterientest beruht auf der durch Genotoxine induzierten Expression des *umuC* Gens, eines der SOS Reperaturgene in *Salmonella typhimurium*. In einer Variante des *umu*-Testes sind die SOS-Reperaturgene der verwendeten Teststämme mit dem Gen für die zelluläre  $\beta$ -Galactosidase gekoppelt. Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität dient dann als Maß für den Schädigungsgrad der DNA. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Reifferscheid (AMMUG, Universität Mainz (luminometrisch)) und Zipperle (LFU Karlsruhe (DIN)) sind in Tab. 37 zusammengestellt.

#### **Alkalische Filterelution:**

Diese Methode detektiert Einzelstrangbrüche und die Reparaturleistungen der Zelle *in vitro* und *in vivo*. Als Maßstab für eine genotoxische Wirkung dient die Geschwindigkeit, mit der eine Alkali-behandelte, und dadurch einzelsträngige DNA durch Membranporen penetriert. Die Elutionsrate ist dabei abhängig von der DNA-Einzelstranglänge. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Waldmann (AMMUG, Universität Mainz) sind in Tab. 37 dargestellt.

#### **DNA-Aufwindungstest:**

Hierbei werden die Zellen in alkalischem Milieu lysiert und danach die Kerne einer mutagenen Einwirkung (z.B. UV-Licht, ionisierte Strahlung usw.) unterzogen. In Abhängigkeit von der Stärke der Noxe werden die Kerne immer diffuser, das Chromatin beginnt aufzuschmelzen. Nach Anfärben mit Acridinorange kann man doppelsträngige DNA (grüne Fluoreszenz) und einzelsträngige DNA (rote Fluoreszenz) unterscheiden. Als Maß für die Toxizität dient der relative Anteil des Fluoreszenzlichtes. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Hansen (Institut für Ökologie, TU Berlin) sind in Tab. 37 dargestellt.

#### **Unscheduled DNA Synthesis (UDS):**

Diese Methode beruht auf der Reparatur geschädigter DNA mittels zelleigener Reparatursysteme. Dabei wird die Einbaurrate von radioaktiv markierten Nucleotiden mittels einer Autoradiographie bestimmt. Die Exposition der radioaktiv markierten Präparate dauert mehrere Wochen. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Grummt (UBA, Bad Elster) sind in Tab. 37 dargestellt.

#### **Comet Assay:**

In Tabelle 37 sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppen Segner (UFZ Leipzig), Miltenburger (CCR Roßdorf), Obst (Institut für Wasserforschung Mainz) und dieser Arbeit (Zoologie I, Universität Heidelberg) zusammengefaßt.

**Tab. 37:** Untere Nachweisgrenzen (LOEC-Werte) von fünf Monosubstanzen für verschiedene Genotoxizitätstests im BMBF-Projekt ” Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächengewässer”

Testsysteme	Monosubstanzen				
	<i>2-Acetyl-aminofluoren</i>	<i>Benzo[a]-pyren</i>	<i>Dimethyl-nitrosamin</i>	<i>Nitro-furantoin</i>	<i>4-Nitroquino-lin-N-Oxid</i>
<b>Alkalische Filterelution:</b>					
<i>Corbicula fluminea</i>	220	n.g.	70	2.400	5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	n.n.	n.g.	n.n.	n.n.	38
<b>DNA-Unwinding-Assay:</b>					
Fischzelllinie RTG-2	n.n.	5.000	n.n.	125.000	39
Fischzelllinie PLHC-1	n.n.	n.n.	n.n.	250.000	156
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Larve)	n.n.	25	n.n.	312	letal: 78 (24h)
<i>Danio rerio</i> (Larve)	n.n.	n.n.	-	n.n.	625 (1h)
<i>Dreissena polymorpha</i>	20.000	n.n.	10.000	n.n.	800 (24h)
<b>UDS-Test:</b>					
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	5.6	3.7	1.000	n.n	20
<b>AMES-Test:</b>					
<i>Salmonella typhimurium</i>	600	60	-	5	1
<b>umu - Test</b>					
DIN					
<i>Salmonella typhimurium</i>	55.800	157.7	9.300.000	9.3	7.4
luminometrisch					
<i>Salmonella typhimurium</i>	10	250	4.000.000	7	2
<b>Comet Assay</b>					
Fischzelllinie - RTG-2	n.n.	151.4	55.000	31.250	2.4
Fischzelllinie - RTL-W1	n.g.	1211	n.n.	n.g.	40
Säugerzelllinie - V79	1.110.000	75.7	370.000	238.200	76.1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1.000	25.000	10.000	5	5
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	n.n.	n.n.	50	n.n.	10
<i>Danio rerio</i> - in vivo *					
Primärhepatocyten	n.n.	n.n.	7400	n.n	9.5
Kiemenzellen	n.n.	n.n.	n.n.	n.n	9.5
<i>Danio rerio</i> - *					
Primärhepatocyten ohne S9	n.g.	n.g.	n.g.	2.380	1.9
Primärhepatocyten mit S9	2.240	252	74	n.g.	n.g.
<i>Danio rerio</i> - *					
Kiemenzellen ohne S9	n.g.	n.g.	n.g.	2.380	1.9
Kiemenzellen mit S9	2.240	252	74	n.g.	n.g.

Alle Angaben in µg/L.

**n.n.** Genotoxizität nicht nachweisbar

**n.g.** nicht getestet

\*) Teilprojekt 8, Zoologie I, Universität Heidelberg (grau hinterlegt)

#### 4.2.2 Untersuchungen zum Nachweis genotoxischer Substanzen in den Wasserproben von Rhein, Neckar und Elbe im *In vitro*-Ansatz

Vor der Wasserproben-Phase wurden, als interne Labor-Kontrolle, 4 mit der Leitsubstanz *4-Nitroquinolin-N-oxid* aufdotierte Wasserproben getestet. Die Zudotierung wurde entsprechend der Sensitivität des Testsystems vorgenommen und erst nach Auswertung der Testergebnisse decodiert.

Im *In vitro*-Ansatz konnten sowohl die höchst dotierte Probe als auch die Kontrolle eindeutig identifiziert werden, jedoch unterschieden sich die Tail Moment-Werte der beiden mittleren Proben kaum und wurden so bezüglich ihres genotoxischen Potentials falsch eingeschätzt. Auffallend ist das deutlich geringere genotoxische Potential der Wasserproben in Bezug auf ihren Gehalt an *4-Nitroquinolin-N-oxid* im Vergleich zu den Werten aus der Monosubstanztestung (unter Berücksichtigung der Verdünnung mit 50 % Medium und 50 % Wasserprobe). Da die Substanz einer nativen Wasserprobe aus der Weißen Elster zudotiert worden war, besteht die Möglichkeit einer geringeren Bioverfügbarkeit durch Adsorption an Partikel im Wasser oder Reaktionen mit anderen Wasserinhaltsstoffen. Auch ist *4-Nitroquinolin-N-oxid* keine sehr stabile Substanz, so daß bis zur Bearbeitung der Proben aufgrund der mikrobiologischen Kontamination der Proben möglicherweise bereits ein Teil der Substanz abgebaut war.

Zwischen Februar 1997 und Januar 1998 wurden im monatlichen Wechsel 4 Wasserproben vom Rhein und 3 Wasserproben von der Elbe im Comet Assay mit Primärzellkulturen aus der Leber des Zebrafischs sowie exemplarisch mit Kiemenprimärzellen in bis zu 3 Durchgängen getestet. Nur nach entsprechender *In vitro*-Indikation erfolgte zusätzlich eine *In vivo*-Prüfung mit dem Zebrafisch.

Die überwiegende Anzahl der untersuchten Wasserproben zeigte im Comet Assay mit Primärzellen und 20 h Exposition unter S9-Supplementierung keine Genotoxizität; lediglich die Oktoberproben von der Elbe sowie eine Rheinprobe aus Karlsruhe vom März 1997 waren eindeutig positiv. Die Einzelergebnisse belegen, daß das Testprotokoll Comet Assay mit Primärzellen aus dem Zebrafisch in Kombination mit dem verwendeten Expositionsschema zu reproduzierbaren Ergebnissen führt: Positiv-/Negativ-Ergebnisse waren selten, in der Regel konnte das zuerst vorliegende Resultat in den Wiederholungen belegt werden.

Die Bewertung der vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Genotoxizität in der Wasserprobe erweist sich jedoch als schwierig, da es vergleichbare Untersuchungen in der Literatur zum jetzigen Zeitpunkt nicht gibt. Bisher sind erst in ersten Ansätzen Untersuchungen zum Screening von Umweltproben mit Genotoxizitäts-Kurzzeittests durchgeführt worden (Reifferscheid et al., 1991); bei vielen Untersuchungen handelt es sich jedoch um industrielle und kommunale Einleitungen bzw. um Schwebstoffextrakte (Claxton et al., 1998; Kosz Vnenchak und Rokosz, 1997; Vahl et al., 1997; White und Rasmussen, 1998; White et al., 1998) und nicht um native Wasserproben. Weitere Arbeitsgruppen befinden sich in der Validierungsphase der angewendeten Assays (Gauthier, 1996; Le Curieux et al., 1994). Zur besseren Bewertung der Ergebnisse aus dem Comet Assay wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit vergleichende Tests (*akut und chronisch*) mit verschiedenen biologischen Endpunkten mit Monosubstanzen im Niedrigdosisbereich sowie Wasserproben durchgeführt.

Im Gegensatz zu den nativen Wasserproben aus Rhein und Elbe zeigten die Wasserproben aus dem Sanierungsgebiet der Gaswerke Düsseldorf einen deutlichen genotoxischen Effekt, der sich im Falle der August-Probe noch bis zu einer 1:10-Verdünnung nachweisen ließ. Die unverdünnten Proben wiesen zudem eine deutlich cytotoxische Wirkung auf. Durch die reproduzierbaren Effekte in einer Verdünnungsreihe konnte gezeigt werden, daß man mit isolierten Hepatocyten aus Fischen auch in geringeren Konzentrationen Genotoxizität nachweisen kann. Der Nachweis von DNA-Schäden nach Inkubation mit derartig stark kontaminierten Proben ist jedoch nicht als repräsentativ für Genotoxizitätsbestimmungen in nativen Wasserproben in unserer Umwelt anzusehen.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, inwieweit mit einem Kurzzeit-Genotoxizitätstest noch Effekte in Oberflächengewässern wie Rhein, Elbe und Neckar bei sich weiter verbessernder Wasserqualität überhaupt möglich sind. Hier liegt wohl das Potential von Bioassays wie dem Comet Assay mit Fischzellen und Fischen wohl eher in der Detektion und Charakterisierung von Schadereignissen. Bei den isolierten Primärzellen im *In vitro*-Ansatz sowie den Fischen im *In vivo*-Ansatz handelt es sich ja um Testsysteme mit einer gewissen Reaktionsbreite auf die Einwirkung genotoxischer Noxen. Aufgrund ungeschädigter Reparaturmechanismen muß die Schädigung des Organismus erst ein erhöhtes Niveau erreichen, um überhaupt mit dem Assay detektiert werden zu können. Hierin liegt deshalb auch die Bedeutung derartiger Verfahren, da die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den intakten Organismus mit deutlich weniger Annahmen verbunden ist. Wie die eigenen Freilanduntersuchungen zeigen ist die Abbildung synergistischer und akkumulativer Effekte, wie sie in der Umwelt auftreten können in Labor-*In vitro*-Experimenten allerdings nicht möglich.

### 4.3 *In vivo*-Untersuchungen

#### 4.2.1 *In vivo*-Untersuchungen mit den Monosubstanzen

Der Zebraäbrbling (*Danio rerio*) ist ein geeigneter Modellfisch für toxikologische Prüfungen an Fischen, da der Platzbedarf zur Zucht und zur Durchführung der Experimente sehr gering ist. Es werden auch für *In vivo*-Experimente nur geringe Mengen Testgut (750 mL) pro Versuch benötigt, was das Volumen von Wasserproben und die Abwassermenge von Substanzprüfungen gering hält. Aufgrund seiner leichten Haltung und Nachzucht avancierte der Zebraäbrbling zu einer der am besten untersuchten Fischarten in der biologischen Forschung (Collodi, 1992). Es existieren zahlreiche Zuchtstämme, die genetisch gut untersucht bzw. verändert sind, so daß man für toxikologischen Studien auf viele Vergleichsdaten und Tiere mit bekannten Stoffwechseleigenschaften zurückgreifen kann (Collodi, 1992; Streisinger, 1984).

Die Ergebnisse aus der dreitägigen Belastung mit 2-Acetylaminofluoren ergaben für diese Substanz keine DNA-schädigende Wirkung auf Leber- und Kiemenzellen von *Danio rerio*. Die im Comet Assay nach *In vivo*-Exposition nachgewiesenen Effekte traten in Kiemenzellen nur einmal bei einer Konzentration von 11,0 mg/L auf und waren aufgrund der schwankenden Toxizitätsgrenze nicht reproduzierbar. Auch die in Hepatocyten aufgetretenen DNA-Schäden waren nur sehr gering, nicht konzentrationsabhängig und traten nahe der Toxizitätsgrenze auf, weshalb Sekundäreffekte durch die angegriffene Konstitution der Tiere nicht auszuschließen sind. Unterstützt wird diese Theorie durch die Ergebnisse der *In vitro*-Untersuchungen an Hepatocyten und Kiemenzellen von *Danio rerio*, die zeigen, daß erst durch eine exogene Aktivierung mit S9-Präparaten in Kombination mit einer deutlichen Verlängerung der Expositionszeit von 2 h auf 20 h die genotoxische Wirkung von 2-Acetylaminofluoren zumindest in Hepatocyten induziert werden konnte.

Leber- und Kiemenzellen von *Danio rerio* wiesen nach 3 d *In vivo*-Exposition mit 2,5-10,0 mg/L Benzo[a]pyren keine mit dem Comet Assay nachweisbaren DNA-Schäden auf. Obwohl (Buchmann et al., 1993) die starke Induktion von P-450 Isozymen durch 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin in *Danio rerio* beschrieben, korrelierte dies nicht mit der von Hsu und Deng (1996) (Hsu und Deng, 1996) nachgewiesenen geringen Adduktbildung in der Leber. Eine mögliche Schlußfolgerung hieraus wäre, daß *Danio rerio* offensichtlich über ein Cytochrom P-450-System verfügt, welches gegenüber Benzo[a]pyren zu unspezifisch ist, um nachweisbare DNA-Schäden in Zeiträumen von Tagen zu verursachen. Um die ausbleibende Reaktion im *In vivo*-Ansatz mit Benzo[a]pyren näher zu untersuchen, wurden 6 Zebraäbrlinge 5 Tage vor Beginn der Belastung mit 0,252 mg / L Benzo[a]pyren mit 15

mg/kg  $\beta$ -Naphthoflavon vorinduziert, um die Biotransformationsenzyme der Fische schon vor Beginn des Experiments zu stimulieren. Hiermit sollte näher beleuchtet werden, ob die ausbleibende Reaktion im Comet Assay mit der geringen DNA-Reparaturkapazität von Fischen (Maccubbin 1994) oder aber einer möglichen geringen Biotransformationskapazität bzw. -induktion assoziiert ist. Im Gegensatz zu den *In vivo*-Experimenten ohne Vorinduktion, in denen mit dem Comet Assay keine genotoxischen Effekte detektiert werden konnten, zeigten in diesem Experiment zumindest 2 Fische signifikant erhöhte Tail Moment-Werte im Vergleich zu allen drei Kontrollfischen.

Dies Ergebnis deutet in Übereinstimmung mit den *In vitro*-Befunden, in denen mit exogener Metabolisierung durch Säuger-S9-Präparate gearbeitet wurde, darauf hin, daß das Cytochrom P450-System des Zebrafisches wohl nur eine geringe, aber doch induzierbare Metabolisierungskompetenz gegenüber *Benzo[a]pyren* besitzt. Die im Gegensatz zu Säugerzellen gering ausgeprägte Fähigkeit zur Excisionsreparatur (Maccubbin, 1994), die als Hauptreparaturweg zur Eliminierung großer Addukte an der DNA anzusehen ist (Waters et al., 1992), und damit der zugrundeliegende Mechanismus ist, der die Detektion von DNA-Fragmentierung im Comet Assay ermöglicht, dürfte aber auch in diesem Experiment für den geringen Effekt verantwortlich sein. Hierbei könnte auch die Wahl des Induktors ein deutlicheres Ergebnis verhindert haben, denn (Collodi et al., 1994) konnten in Zebrafischzellen TCDD -induzierbares, der 1A1-Isoform der Regenbogenforelle homologes P450 nachweisen; im Gegensatz zu diesem ließ es sich aber nicht über einen weiteren typischen Induktor, das  $\beta$ -Naphthoflavon, induzieren.

Andererseits kann *Benzo[a]pyren* auch über Konkurrenzreaktionen wie die Glucuronsäure-, Glutathion- sowie Sulfatkonjugation detoxifiziert werden. Sikka et al. (1991) konnten am Amerikanischen Katzenwels (*Ameiurus nebulosus*) zeigen, daß sich diese Konkurrenzreaktion erst nach längerer Exposition der Tiere in Richtung Aktivierung/Adduktbildung verschiebt, somit wären die drei Tage Exposition der Zebrafische aus dieser Sicht zu kurz. (Hooftman, 1981; Hooftman und Vink, 1981) konnten im Hundsfisch (*Umbra pygmaea*) sowie im Prachtgrundkärpfling (*Notobranchius rachowi*) Chromosomenaberrationen nach *In vivo*-Belastung mit *Benzo[a]pyren* nachweisen, allerdings zeigte sich ein deutlicher zeitlicher Anstieg mit der höchsten Aberrationsrate erst nach sechs Tagen. In diese Richtung weisen auch die Comet Assay-Ergebnisse aus dem Life-Cycle-Experiment mit *Benzo[a]pyren*, hier konnten DNA-Schäden nach chronischer Belastung von Zebrafischen mit *Benzo[a]pyren* im ng/L-Bereich nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den hier aufgeführten Gründen trägt auch die geringe Fähigkeit von Fischen zur Nukleotid-Excisionsreparatur (Maccubbin, 1994) (*nachweisbar im Comet Assay als indirektes Maß für die Adduktbildung*) dazu bei, daß im Comet Assay mit *Danio rerio in vivo* keine Effekte nachzuweisen sind. Hier könnte das  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling zum direkten Nachweis der Addukte Klarheit verschaffen (Gupta, 1996; Hsu und Deng, 1996; Mu und Sancar, 1997). Im *In vitro*-Ansatz mit exogener S9-Aktivierung aus einem Säuger konnten in diesem Konzentrationsbereich mit *Benzo[a]pyren* tatsächlich deutliche Effekte aufgezeigt werden.

Die im Comet Assay mit *Danio rerio* in Hepatocyten nachgewiesenen DNA-Strangbrüche nach Exposition gegenüber *Dimethylnitrosamin* sind auf AP-Stellen im Zuge der Basen-Excisionsreparatur zurückzuführen, da vom O<sup>6</sup>-Methylguanin, einem der häufigsten Alkylierungsprodukte der DMNA-Belastung, kein Einfluß auf die DNA-Integrität bekannt ist. Die unterschiedliche Sensitivität von Geweben gegenüber DMNA ist bereits nachgewiesen worden und wird vor allem mit der metabolischen Kapazität des jeweiligen Cytochrom P450-Systems korreliert (Kerklaan et al., 1983). Das organotrope Verhalten von DMNA wurde auch in den *In vitro*-Untersuchungen bestätigt, Hepatocyten wiesen nach DMNA-Belastung DNA-Schäden auf, in Kiemenzellen konnte mit den gleichen Konzentrationen kein Effekt erzielt werden. *In vivo* weist die Leber ebenfalls DNA-Schäden auf. Dieses deckt sich mit Ergebnissen von Hsu und Deng (1996), die die größere metabolische Kapazität der Leber von Zebrafisch-

blingen im Vergleich zu anderen Geweben *in vivo* beschreiben, sowie mit den histologischen Untersuchungen von Khudoley (1984) zur bevorzugten Tumorinduktion durch DMNA-Belastung in der Leber von Fischen.

*Nitrofurantoin* zeigte bis 40,0 mg/L keine genotoxische Wirkung auf Leber- und Kiemenzellen von *Danio rerio* nach *In vivo*-Exposition über 3 d. Hierbei sind Adaptionsprozesse der belasteten Zellen an ein erhöhtes Level reaktiver Sauerstoffspezies und Nitroradikale denkbar, ebenso wie mögliche Ausscheidungswege des Organismus, die im *In vitro*-Ansatz in der Zellkultur nicht realisierbar sind. Da oxidativer Streß aufgrund der Überlastung der ihm entgegenwirkenden Enzymsysteme wie z.B. Katalase oder Superoxid-Dismutase entsteht (Di Guiseppi und Fridovich, 1990) ist ein Gleichgewicht zwischen metabolischer Aktivierung und Entgiftung in *Danio rerio* denkbar.

*4-Nitroquinolin-N-oxid* erwies sich auch *in vivo* als die am stärksten genotoxische Substanz im Comet Assay. 9,5 µg/L erzeugten in Leber und Kieme deutliche DNA-Schäden. Diese nicht zellspezifische Wirkung wurde schon in *In vitro*-Untersuchungen bei Expositionszeiten ab zwei Stunden nachgewiesen. Die positiven Ergebnisse nach kurzer Expositionszeit sprechen für eine ursächliche Beteiligung des oxidativen Stresses am Wirkungsmodus von *4-Nitroquinolin-N-oxid*, welches aber auch Addukte an der DNA bildet, wie Harvey und Parry (1998) nach Belastung von Muscheln nachweisen konnte. Die im allgemeinen schlechte Fähigkeit von Fischen zur Excisionsreparatur (Maccubin, 1994) und der doppelte Aktivierungsweg von *4-Nitroquinolin-N-oxid* kann als Ursache der hohen Genotoxizität bei vergleichsweise niedrigen Belastungskonzentrationen angesehen werden.

#### 4.3.2 Untersuchungen zum Nachweis genotoxischer Substanzen in Wasserproben im *In vivo*-Ansatz

Die Untersuchungen von sechs nativen Wasserproben lieferten erste Erkenntnisse über die Anwendbarkeit des *In vivo*-Testsystems im Biomonitoring. Zwei Wasserproben (Rhein bei Karlsruhe, Sanierungsgebiet der Gaswerke Düsseldorf) verursachten DNA-Schäden nach dreitägiger *In vivo*-Belastung von *Danio rerio* in den Hepatocyten, wobei die Sanierungsprobe wegen ihrer starken Verschmutzung 1:3 verdünnt wurde und als ein Sonderfall der Prüfung von Oberflächengewässern angesehen werden muß. Auch Alink et al. (1980) und Hooftman und Vink (1981) konnten in Wasserproben aus dem Unterlauf des Rheins in den Niederlanden nach *In vivo*-Belastung von *Umbra pygmaea* Genotoxizität feststellen. Allerdings hat sich die Wasserqualität des Rheins in den letzten 20 Jahren deutlich verbessert (Den Besten, 1995). Die Kiemenzellen wiesen in denselben Versuchen keine DNA-Schäden auf, was die Bedeutung der metabolischen Kapazität der Leber unterstreicht. Die leichte - aber nicht statistisch signifikante - Erhöhung der *Tail Moment*-Werte der Kiemenzellen nach der Belastung mit der Sanierungsprobe könnte auf die Nachweisbarkeit von sehr hohen Belastungen hindeuten, es scheint aber auch bei hohen Belastungen sinnvoller, die auf Gentoxine sensitiver reagierenden Hepatocyten für *In vivo*-Prüfungen zu verwenden.

Die im *In vitro*-Ansatz positiven Elbe-Proben vom Oktober 1997 zeigten *in vivo* keine genotoxischen Effekte auf Hepatocyten und Kiemenzellen. Dieses läßt sich mit den Ergebnissen aus den Monosubstanzprüfungen korrelieren, in denen sich der *In vitro*-Ansatz als deutlich sensitiver gegenüber den meisten Monosubstanzen erwiesen hatte. Der Vergleich zwischen *In vivo*- und *In vitro*-Ansatz zeigt somit, daß das *In vitro*-Experiment deutliche Vorteile hat, denn neben der deutlich höheren Sensitivität spielen auch die geringeren Probenvolumina und der niedrigere Zeitaufwand für die Eignung als Routinetest eine wesentliche Rolle. Trotzdem bleibt der *In vivo*-Ansatz als exemplarisch durchgeführter Test eine wertvolle Ergänzung, besonders unter dem Gesichtspunkt der Ergebnisinterpretation und der Beurteilung des Gefährdungspotentials *in vitro* positiver Proben für den Organismus.

#### **4.2.1 Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Zebraabräblingen aus einem Life-Cycle Experiment mit 4-Nitroquinolin-N-oxid und Benzo[a]pyren**

In einem Life-Cycle Test mit dem Zebraabräbling und 4-Nitroquinolin-N-oxid konnten schließlich Diekmann et al. (1998) zeigen, daß sich bei einer 10 fach höheren Konzentration als die der Nachweisgrenze im Comet Assay mit Fischzellen deutliche Effekte auf der Populationsebene chronisch belasteter Tiere einstellten. Primärzellen aus Tieren der Belastungskonzentrationen 0,3, 0,9, 2,7 und 8,1 µg/L konnten im Comet Assay auf DNA-Schäden getestet werden und zeigten dosis-abhängige DNA-Fragmentierung. Auch weitere Genotoxizitätstests wie die Alkalische Filterelution, der Mikrokern Test sowie der UDS-Test (*U*nscheduled *D*NA *s*ynthesis) wurden mit Tieren aus diesem Experiment durchgeführt und zeigten vergleichbare Resultate (Diekmann et al., 1998). Die nächsthöhere Konzentration im Life-Cycle (24 µg/L) konnte nicht untersucht werden, da es hier bereits zu einem Populationseinbruch kam. Die *In vitro*-Nachweisgrenze für 4-Nitroquinolin-N-oxid mit den untersuchten Fischzellen liegt bei 1,9 µg/l und *in vivo* bei 9,5 µg/L, bei 24 µg/L überlebten in den beiden Parallelen im Life Cycle nur 12 % bzw. 22 % der belasteten Tiere den Life Cycle Test (Diekmann et al., 1998).

Ein weiterer Life-Cycle mit Benzo[a]pyren zeigte ebenfalls leichte Effekte in den untersuchten Primärzellen im Comet Assay, die tatsächlichen Ist-Konzentrationen waren aber sehr gering (*höchste Ist-Konzentration: 193 ng/L*), und eine biologische Wirkung auf der Populationsebene war nicht zu erkennen (Diekmann et al., 1998). Dies kann aber als ein erster Hinweis auf die Wichtigkeit von chronischen Tests und *In situ*-Untersuchungen (*siehe hierzu auch Kapitel XX: Freilanduntersuchungen*) im Umweltscreening verstanden werden, denn Benzo[a]pyren konnte *In vitro* in seiner Wirkung erst bei 252 µg/L und *in vivo* nach 72 h Exposition gar nicht nachgewiesen werden.

Generell ist eine vergleichende Bewertung der Ergebnisse schwierig, da es zu Genotoxinen und Life-Cycle Experimenten praktisch keine Daten gibt. Für die vorliegende Arbeit mit dem Comet Assay und Primärzellen erwiesen sich diese Versuche jedoch als sehr wertvoll, da sie eine deutliche Korrelation zwischen positiven Comet Assay-Daten und biologischen Effekten auf der Populationsebene zeigen konnten, und dies bei Konzentrationen, die im Comet Assay nicht zu weit von der Nachweisgrenze entfernt sind.

#### **4.4 Vergleich verschiedener Endpunkte in der Auswertung des Comet Assays**

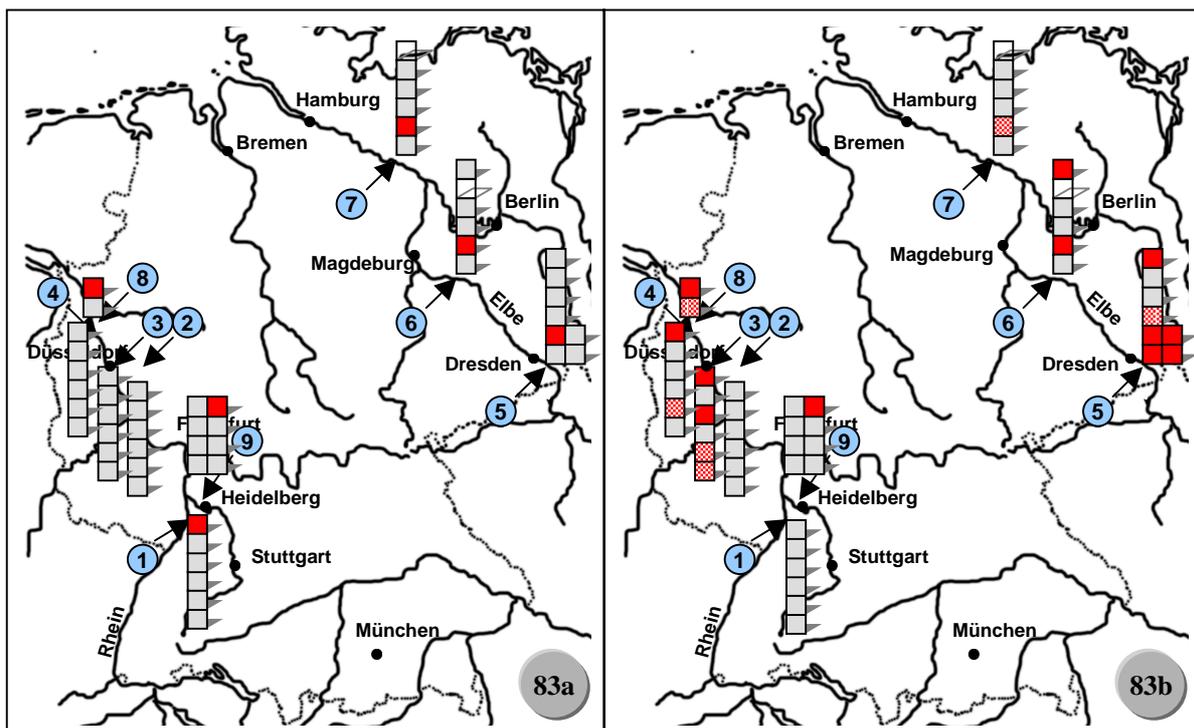
In den letzten Jahren hat sich als Endpunkt der Auswertung des Comet Assays das Tail Moment durchgesetzt, eine Entwicklung, die nur durch die Verbreitung Computer-gestützter digitaler Auswertesysteme möglich wurde. Zu Beginn der Entwicklung des Comet Assays Ende der 80'iger Jahre wurde die Schweiflänge (Tail Length) gemessen, ein Endpunkt, der sich auch mit Hilfe des Okularmikrometers ohne weitere technische Ausstattung am Fluoreszenzmikroskop bestimmen läßt. Während der Endpunkt Tail Length nur die Länge des Schweifes erfaßt, geht in den Wert Tail Moment über die Fluoreszenzintensität im Schweif auch die Häufigkeit der Interaktion genotoxisches Agens - DNA mit ein. Die statistischen Kenngrößen Mittelwert, Standardabweichung und Median zeigten allerdings, daß bei den gleichen, zufällig ausgewählten Datensätzen die Tail Moment-Werte eine viel höhere Streuung aufwiesen als die Tail Length-Werte.

Die erneute statistische Auswertung der Monosubstanz-Untersuchungen mit dem Endpunkt Tail Length erbrachte keine Unterschiede in den LOEC-Daten (*L*owest *O*bserved *E*ffect *C*oncentration) zur standardmäßigen Auswertung mit dem Endpunkt Tail Moment.

Bei der erneuten Auswertung der Wasserproben, hier kam es bei der Auswertung mit dem Endpunkt Tail Moment häufiger zu geringen, nicht signifikanten Unterschieden zwischen den Kontrollen und

den mit der entsprechenden Wasserprobe belasteten Zellen, zeigten sich aber deutliche Unterschiede (siehe Abb. 83): die Auswertung nach Tail Length erbrachte 12 positive und 8 positiv verdächtige Wasserproben im Gegensatz zu 6 positiven Befunden mit dem Endpunkt Tail Moment. Vergleichende Untersuchungen zur Auswertung verschiedener Endpunkte wurden zwar schon durchgeführt (Ashby et al., 1995; Böcker et al., 1997; Durand und Olive, 1997), hierbei standen aber technische Fragen bzw. Grundlagenuntersuchungen im Vordergrund. Trotzdem ist für die routinemäßige Anwendbarkeit und für die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse auch die Standardisierung der Auswertung und ihrer Parameter für die Akzeptanz und Durchführbarkeit sowie für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung.

Die unterschiedliche Bewertung der Wasserproben-Daten mit den beiden Endpunkten Tail Moment und Tail Length begründet sich hierbei hauptsächlich auf die unterschiedlichen mathematischen Eigenschaften der erhaltenen Werte. Während der Meßwert Tail Length (Median Kontrollen zwischen 17 – 19 µm) vergleichsweise groß erscheint, ist das Produkt aus Tail Length und Fluoreszenzintensität, das Tail Moment in der Regel sehr klein (Median Kontrollen zwischen 0 u 1). Weiterhin wird die Schweiflänge in der verwendeten Konfiguration des Auswertesystems von Kopfmitte bis Schweifende gemessen, ein großer Teil des erhaltenen Wertes wird hierbei über die recht konstante Zellgröße bestimmt.



**Abb. 83:** Ergebnisse der Untersuchungen von nativen Wasserproben aus Rhein, Elbe, Wupper und Neckar mit dem Comet Assay und primären Hepatocyten aus dem Zebraäbrbling. Vergleich der beiden Endpunkte Tail Moment (83 a) und Tail Length (83 b). Wasserproben in mindestens 2 Durchgängen getestet, bei widersprüchlichen Ergebnissen wurde ein dritter Durchgang getestet. *Grau:* kein genotoxisches Signal meßbar; *rot:* in 2 Durchgängen positiv, *rot gemustert:* ein positiver und ein negativer Durchgang (*nur Tail Length, da Wasserproben mit dem Endpunkt Tail Moment bewertet wurden und dort zweimal negativ waren; die parallel erhobenen Tail Length-Daten konnten erst nachträglich statistisch bearbeitet werden*). ① Karlsruhe, ② Trinkwasserreservoir Wahnbachtalsperre, ③ Köln, ④ Düsseldorf, ⑤ Schmilka, ⑥ Dessau/Mulde, ⑦ Schnackenburg, ⑧ Wupper, ⑨ Neckar unterhalb Heidelberg.

Die gemessenen Unterschiede zwischen einzelnen Zellen sind hierbei vergleichsweise viel größer bezüglich des Endpunkts Tail Moment (kleinen Wert) als beim Endpunkt Tail Length (großen Wert).

Dies drückt sich auch in den viel größeren Standardabweichungen der Tail Moment-Daten aus. Somit sind bei der Auswertung der Daten mit dem Endpunkt Tail Length aufgrund der geringen Variabilität der Rohdaten schon sehr kleine Unterschiede statistisch signifikant.

Da diese Methode einerseits bei gleicher Länge des Kometenschweifens unterschiedliche Intensitäten in der Fluoreszenz des Schweifens als Ausdruck verschiedener Belastungsintensitäten nicht berücksichtigt, und andererseits sehr empfindlich reagiert, erscheint die Verwendung des Endpunktes Tail Moment, besonders unter dem Gesichtspunkt biologischer Relevanz, als weiterhin gerechtfertigt. Allerdings muß in diesem Zusammenhang auch daraufhingewiesen werden, daß die auf der Grundlage der Cometlänge positiven Wasserproben durch Auswertung des Parameters *Tail Length* durchweg von den stärker belasteten Standorten stammten.

#### 4.5 Nachweis von DNA-Schäden an Freilandfischen aus dem Neckar mit dem Comet Assay

Der Comet Assay sollte in einer weiteren Versuchsreihe als Indikator-test zur Detektion genotoxischer Einflüsse auf Fische aus dem Neckar herangezogen werden. Der Neckar wurde als Untersuchungs-gewässer ausgewählt, da es zu diesem Fluß und seiner durch vielfältige Belastungen geprägten Ge-schichte gute Referenzdaten gibt (Müller, 1986, 1991, 1992; Müller et al., 1993); in den 70er Jahren galt er als ungewöhnlich stark belastetes Gewässer (Förstner und Müller, 1974). 1972 erstmalig vom Institut für Sedimentforschung in Heidelberg (Müller, 1992) durchgeführte Untersuchungen über die Schwermetallbelastung der Tonfraktion der Sedimente wichtiger Fließgewässer der Bundesrepublik Deutschland wiesen den Neckar als den am höchsten mit Cadmium, Chrom und Nickel belasteten Fluß aus (Banat et al., 1972). In den Jahren 1979, 1985 und 1990 erneut durchgeführte Untersuchungen zeigten, daß die Schwermetallbelastung der Neckarsedimente insgesamt stark zurückgegangen war (Müller et al., 1993). Dieser Rückgang vollzog sich vor allem zwischen 1972 und 1985 als Folge des verstärkten Baus und Ausbaus industrieller wie kommunaler Kläranlagen im gesamten Neckar-Einzugsgebiet. Der heutige, biologisch-ökologische Zustand des Neckars z.B. bei Eberbach wird je-doch noch immer als kritisch betrachtet (Gewässergüteklasse II-III). Neben der Belastung durch Wel-lenschlag bei Schiffsverkehr, thermische Belastung durch Kraftwerksanlagen und Schleusenbetrieb weisen verschiedene chemisch-physikalische Parameter zum Teil auf noch immer hohe stoffliche Be-lastungen hin (Geier, 1994). Anhand eines mit Zelllinien durchgeführten Cytotoxizitätstests ließ sich *in vitro* ein toxisches Potential im Sediment und Porenwasser einer Flachwasserzone bei Eberbach feststellen (Geier, 1994), eventuelle Auswirkungen auf die Biozönose müßten hierbei allerdings noch abgeklärt werden. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, daß eine Verbesserung der Sedimentqualität nicht die in den Stauhaltungen zur Ablagerung gelangten und dort verbliebenen Altsedimente mit ein-bezieht. Diese enthalten neben hohen Konzentrationen an Schwermetallen überdies auch hohe Kon-zentrationen an polychlorierten Dioxinen und Furanen (Müller, 1992). Ob bei einer Resuspendierung z.B. die durch einsetzendes Hochwasser stoßweise Freisetzungen und Mobilisierung dieser Schadstof-fe bedenkliche Auswirkungen auf Organismen zu erwarten sind, bleibt weiterhin ungeklärt.

Der heutiger Fischbestand des Neckars beläuft sich auf 35 Arten (Ulrich, 1991). Bei den Probenahmen mit dem Senknetz war 1996 der Gründling (*Gobio gobio*) mit cirka 11.5 % vertreten, das Rotauge (*Rutilus rutilus*) hielt einen Anteil von 18.3 %, 1998 waren es 24.8 % für den Gründling und 10,7 % für das Rotauge. Insgesamt konnten 1996 13 und 1998 17 Arten nachgewiesen werden. Das vorgefun-dene Artenspektrum vor allem aus Jungfischen von Fischarten mit unterschiedlichen Lebensrauman-sprüchen läßt keine Rückschlüsse auf eine Belastung des Lebensraumes zu. Auch die nachgewiesenen Arten und der allgemeine Zustand der vermessenen Rotaugen aus der 1996 durchgeführten Untersu-chung zu cytopathologischen Veränderungen in Leber und Kieme zeigte wenig Auffälligkeiten

(Schnurstein, 1996). Die cytologische Untersuchung zeigte allerdings ein anderes Bild: 15 % der einjährigen Rotaugen wiesen Veränderungen der Leber auf, die auf Tumorstufen hindeuten (Schnurstein, 1996). Diese als *Spongiosis hepatis* beschriebenen Störungen des Leberparenchyms konnten in verschiedenen Studien mit deutlich kontaminierten Standorten korreliert werden (Couch, 1991; Moore und Myers, 1994).

Die nach den *In vitro*-Vorversuchen beobachteten Effekte bei Belastung von isolierten Primärzellen aus Gründling und Rotauge mit den Monosubstanzen ließen einen Vergleich mit dem Zebrafisch zu. Während für *4-Nitroquinolin-N-oxid* ähnliche Nachweisgrenzen ermittelt werden konnten, zeigten sich für *Benzo[a]pyren* doch deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Arten. (Ericson et al., 1999) wiesen in der Adduktpersistenz von PAHs in Fischen auf deutliche Artunterschiede hin. Nach den *In-situ*-Experimenten konnten für alle drei Fischarten (Gründling, Rotauge und Bachforelle) statistisch signifikante Unterschiede in der Effektausprägung in den Primärzellen der Freilandfische gegenüber der Kontrolle dokumentiert werden. Hierbei wurden die Labortiere am Fangtag mit auf die Freilandexkursion genommen, um für alle Versuchsgruppen vergleichbare Stressbedingungen zu schaffen. Nach Pottinger und Calder (1995) ist der Faktor Stress eine häufig übersehene Größe, gerade bei stressempfindlichen Untersuchungsobjekten wie Fischen, und kann deutliche Konsequenzen für die Ergebnisse aus Toxizitätsuntersuchungen haben.

Neben den Kiemenzellen gehörten bei den Freilandtieren die Darmzellen zu den am meisten geschädigten Geweben. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von Streit (1990), der die Wirkung von Umweltchemikalien auf aquatische Organismen entweder durch äußerem Kontakt, z.B. an empfindlichen Membranen (Kiemen), oder aber nach einer Akkumulation in speziellen Körperhöhlen beobachtete. Er konnte für das Pestizid Atrazin (Herbizid) nachweisen, daß die Aufnahme primär über Körperoberflächen wie die Kiemen erfolgt. Bei seinen Ergebnissen zeigte die Leber, obwohl nur über den Umweg Kieme-Blut-Leber kontaminierbar, als stark fetthaltiges Organ nach den Kiemen den gleichen Kontaminationswert wie das Außenmilieu. Daß der Gastrointestinaltrakt in Säugern wie in Fischen ebenfalls zu den Hauptzielorganen kanzerogen und mutagen wirkender Agentien wie *Benzo[a]pyren*, heterocyclischen Amininen und Furanderivaten gehört, belegen zahlreiche neuere mit dem Comet Assay durchgeführten Experimente (Buchmann et al., 1993; Lemaire et al., 1992; Sasaki, et al., 1998; Sasaki, 1997). Hsu und Deng (1996) konnten zeigen, daß sich bei Belastung von Zebrafischen mit geringen Konzentrationen von *Benzo[a]pyren* Addukte hauptsächlich in der DNA der Darmzellen nachweisen ließen. Auch die altersabhängige Zunahme der genotoxischen Effekte bei dreijährigen Rotaugen stimmen mit Ergebnissen von Streit (1990) überein, der für Cadmium-Konzentrationen in Flußnapfschnecken (*Ancylus fluviatilis*) die höhere Belastung älterer Individuen beobachten konnte, diese altersabhängige Schadstoff-Akkumulation zeigte sich auch für Säugetiere. Eine Akkumulation dieser Schadstoffe im Gewebe und die daraus resultierende chronische Belastung und Schädigung von Organen ist also durchaus denkbar, da die genotoxikologische Wirkung von Xenobiotika entweder auf der Beeinträchtigung spezieller Strukturen beruht oder in einer allgemeinen, andauernden Stressreaktion resultiert (Streit, 1990). In letzterem Fall ist vor allem der Faktor Zeit als maßgeblich für die Toxizität einer Substanz zu betrachten.

Inwieweit diese Ergebnisse Rückschlüsse auf die momentane Gewässerqualität des Neckars und den Gesundheitszustand der Tiere zulassen ist fraglich. Aufgrund der vielfältigen und wechselhaften Schadstoffquellen denen die Fische in ihrem aquatischen Lebensraum ausgesetzt sind, ist es nicht möglich, einfache Wirkungs- und Wechselbeziehungen zwischen nachgewiesenen Xenobiotika und dem Belastungszustand der Tiere aufzustellen. Jedoch belegen auch die in früheren Arbeiten (Schnurstein, 1996) nachgewiesenen cytopathologischen Schäden an Jungfischen der Generation 1+ für den Neckar nach wie vor eine deutlich vorhandene Kontamination.

Im Gegensatz zu den Freilandfischen, die zumindest in Kiemen- und/oder Darmzellen häufig DNA-Schäden aufwiesen, konnte bis auf eine Ausnahme in den *in vitro* untersuchten Wasserproben keine Genotoxizität festgestellt werden. Hierbei muß allerdings auch daraufhin gewiesen werden, daß das Ausmaß der Schadensausprägung in den Primärzellen der Freilandfische zwar statistisch signifikant erhöht, aber nur in Ausnahmefällen als starkes Signal zu bezeichnen war. Gerade in diesem Bereich der Schadensdetektion müssen nun vermehrt Anstrengungen unternommen werden, diese in ihrer biologischen Bedeutung zu charakterisieren (*siehe hierzu auch Mikronukleus Test 4.6.1, sowie die Life-Cycle Ergebnisse, 4.6.4*).

Während die größeren Vorfluter durch deutliche Verbesserungen der Abwasserentsorgung über industrielle und kommunale Kläranlagen in den letzten Jahren erheblich entlastet wurden sind kleinere Fließgewässer durch Zuleitung von bereits geklärtem Abwasser aus industriellen und kommunalen Bereichen noch häufig überlastet. In trockenen Sommern kann die Wasserführung dann hauptsächlich aus geklärten Abwässern bestehen, ein Verdünnungseffekt im Vorfluter ist dann nicht mehr gegeben. Dieses deutete sich am Beispiel der Bachforellen aus dem Forellenbach bei Waldhilsbach an. In diesem unabhängigen Versuch wurden drei Wildfänge unterhalb der Einleitungsstelle einer Kläranlage für ein Klinikum am Königsstuhl entnommen und mit Kontrolltieren aus dem Labor im Comet Assay verglichen. Auch in diesem Experiment konnten deutliche DNA-Schädigungen bei den Freilandtieren nachgewiesen werden. Ähnliches konnte auch für Stichlinge aus dem Kraichbach beobachtet werden. Im Unterschied zu den bisher Untersuchungen an Rotaugen und Gründlingen aus dem Neckar sowie den Bachforellen zeigten die Kiemenzellen als direkt exponierte Zellen im Grad der DNA-Fragmentierung keine Unterschiede zur Kontrolle, während die Hepatocyten einen deutlichen DNA-Schaden aufwiesen. Dieses kann als ein Hinweis auf indirekt wirkende und/oder lipophile genotoxische Substanzen verstanden werden, den die Entgiftungs- und Metabolisierungsprozesse laufen vor allem in der Fischleber ab; weiterhin finden sich in den Hepatocyten von verschiedenen Fischen häufig größere Fettdepots.

## **4.6 Vergleichende Untersuchungen zur genotoxischen Belastung von Fischen**

### **4.2.1 Mikrokern-Untersuchungen**

Der Mikronukleus-Test ist ein häufig eingesetzter Test zur Erfassung des genotoxischen Potentials von Chemikalien und Umweltproben in Tieren, Pflanzen sowie Zellkulturen (Abend et al., 1996; Albertini und Kirsch-Volders, 1997; Albertini, et al., 1997; Ashby and Beije, 1985; De Stoppelaar, et al., 1997; Eckl and Raffelsberger, 1997; Ellahuene, 1997; Fenech, et al., 1997; Gauthier, 1996; Grant, 1994; Hermine, et al., 1997; Ma, et al., 1996; Moore, et al., 1996; Surallés and Natarajan, 1997); ein Schwerpunkt ist hierbei der Einsatz mit Fischen im Biomonitoring der aquatischen Umwelt (Al Sabti, 1986, 1995; Al Sabti and Metcalfe, 1995; Belpaeme, et al., 1996, 1997; De Flora, et al., 1993; Deventer, 1996; Poongothai, et al., 1996; Rao and Neheli, 1996; Sugg, 1996). Wie in der nebenstehenden Abb. 84 skizziert, entstehen Mikrokerne durch Kondensation von Chromosomenbruchstücken oder auch von ganzen Chromosomen im Cytoplasma, nachdem sie nach erfolgter Kernteilung nicht in den entsprechenden Tochterkern mit aufgenommen wurden (Al Sabti, 1995). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung sollte geklärt werden, ob sich das Phänomen DNA-Strangbruch, welches im Comet Assay gemessen wird, in weiteren genotoxisch relevanten Endpunkten manifestiert. Aus diesem Grund wurden die Substanzen *4-Nitroquinolin-N-oxid* (4-NQO), *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* (MNNG) und *Benzo[a]pyren* in den auch im Comet Assay verwendeten Konzentrationen und mit einer Expositionszeit von 20 h mit RTG-2 Zellen getestet.

Alle 3 Substanzen induzierten in unterschiedlichem Ausmaß die Bildung von Mikrokernen. Während für 4-NQO ab 19 µg/L eine reproduzierbar signifikante Erhöhung festgestellt werden konnte, zeigten die MNNG-belasteten Zellen erhöhte Werte, die aber statistisch nicht signifikant waren. Da sich in diesen Untersuchungen recht hohe Standardabweichungen ergaben, kann hier die geringe Zahl an Versuchswiederholungen (n = 2) dafür verantwortlich zeichnen. *Benzo[a]pyren* konnte nur in einem Versuch getestet werden, die belasteten Zellen zeigten hier eine deutliche Zunahme an Mikrokernen. Babich et al. (1990) zeigten in ihren Experimenten die Eignung von permanenten Fischzelllinien, am Beispiel der BG/F-Zellen aus Flossengewebe eines amerikanischen Sonnenbarsches (*Lepomis macrochirus*) für Genotoxizitätsuntersuchungen mit dem Mikrokern Test auf. Die Induktion von Mikrokernen in RTG-2 Zellen durch *Benzo[a]pyren* konnten auch Kohlpoth et al. (1999) in ihren Untersuchungen zeigen, allerdings ergaben sowohl die mikroskopisch wie auch fließcytometrisch ausgewerteten Versuche in diesen Experimenten ungewöhnlich hohe Mikrokern-Inzidenzen.

Für alle getesteten Substanzen konnte darüberhinaus bei einer Verringerung der Teilungsaktivität in den belasteten Zellgruppen eine deutliche Zunahme aberranter Zellteilungsstadien als mögliche Vorläuferstadien, die zur Ausbildung eines Mikrokerns führen, beobachtet werden. Nach 4 NQO-Belastung konnte auch eine Häufung von Chromosomen-Brücken in der Anaphase beobachtet werden; derartige aberrante Teilungsstadien führen zum Absterben der betroffenen Zellen (Hagen 1994). Diese Beobachtungen konnten im Verlauf der vorliegenden Studie nicht näher quantifiziert werden, sie stellen aber sehr wohl auch ein potentiell zu erfassenden Endpunkt in gentoxikologischen Untersuchungen dar. Im Gegensatz zu dem ‚Durchgangsphänomen‘ Strangbruch als Endpunkt im Comet Assay stellt der Verlust von Chromosomenbruchstücken oder sogar ganzen Chromosomen, wie im Mikronukleus Test beobachtet, einen irreparablen genetischen Schaden, mit möglicherweise schwerwiegenden Folgen sowohl für die betroffenen somatischen Zellen als auch als möglicher vererbbarer Schaden dar, falls dieses Ereignis in den Keimzellen auftritt.

Da die Mikrokern-Untersuchungen nur in deutlich weniger Versuchswiederholungen getestet werden konnten, ist, bei den vorhandenen hohen Standardabweichungen in biologischen Testsystemen, ein exakter Sensitivitätsvergleich mit den Comet Assay-Daten nicht möglich. Einzig für 4-NQO konnten drei Wiederholungen durchgeführt werden. Die Nachweisgrenze von 19 µg/L liegt relativ nahe bei der LOEC von 1.9 µg/L für den Comet Assay. Die jeweils höchste getestete Konzentration für 4-NQO und MNNG (keine Cytotoxizität nach 20 h im Comet Assay) zeigte nach 20 h Belastung mit folgender 72 h Postinkubation in gentoxin-freiem Medium, über 90 % der Zellen in Apoptose ähnlichen Stadien (siehe Abschnitt 4.6.2).

Der Mikrokern Test wurde vergleichend auch mit den Freilandtieren durchgeführt, die im Comet Assay auf DNA Schäden in primären Hepatocysten, Kiemen- und Darmzellen untersucht wurden. Beson-

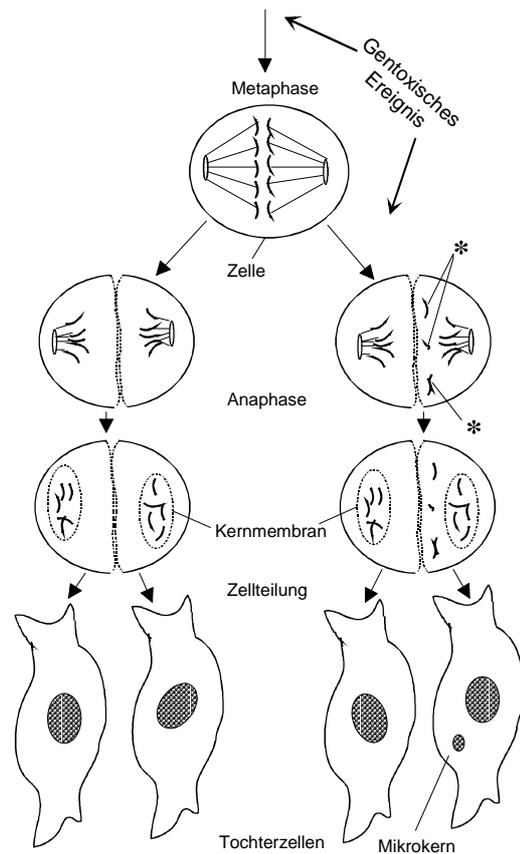


Abb. 84: Schematische Darstellung der Entstehung von Mikrokernen im Rahmen einer Zellteilung. \*) Chromosomen / -fragment ohne Kontakt zum Spindelapparat. Nach Al-Sabti, (1995) verändert.

ders in *In vivo*-Studien wurde der Mikrokern Test verstärkt eingesetzt (Belpaeme et al., 1996; Bolognesi et al., 1999; Lehmann, 1989). Hierfür wurden die kernhaltigen, reifen Erythrocyten dieser Fische verwendet. Nach den vorliegenden Ergebnissen zeigten sowohl die Rotaugen als auch die Gründlinge aus dem Neckar signifikant erhöhte Mikronukleus-Frequenzen. De Flora et al. (1993) konnten in Untersuchungen die Induktion von Mikrokernen in Erythrocyten aus Fischen belasteter italienischer Flüsse nachweisen und mit der Induktion von Entgiftungsenzymsystemen sowie der Mutagenität von Gallenflüssigkeit dieser Tiere im Ames Test korrelieren. Poongothai et al. (1996) konnten einen signifikanten Anstieg der Mikrokernrate in Erythrocyten verschiedener heimischer Cichliden, Labyrinthfischen und Channidae aus den Kläranlagen-Ausläufen zeigen, während Amerikanische Katzenwelse (*Ictalurus punctatus*) aus den Kühlwasserteichen von Tschernobyl zwar erhöhte DNA-Strangbruchraten mit der DNA-Aufwindungstest zeigten, allerdings keine im Vergleich zu den Kontrolltieren veränderten Mikrokern-Raten (Sugg, 1996).

Sowohl die untersuchten einjährigen Rotaugen als auch die heterogenere Gruppe der Gründlinge aus dem Neckar zeigten eine hohe Variabilität innerhalb der untersuchten Gruppen. Auch Burgeot et al. (1996) konnten in Blutzellen aus Muscheln des gleichen Standorts in einer Biomonitoring-Studie entlang der französischen Mittelmeerküste hohe interindividuelle Variabilitäten in der Mikrokern-Ausprägung feststellen. Hierbei spielen Alter, Geschlecht, Ernährungszustand sowie das Migrationsverhalten der untersuchten Arten eine wichtige Rolle. Besonders bei den untersuchten Fischen aus dem Neckar, die unterhalb der Kläranlage Neckarhausen entnommen wurden, sind unterschiedliche Belastungsausprägungen aufgrund verschiedenen Migrationsverhaltens auch in einer bezüglich des Alters so homogenen Gruppe wie die der einjährigen Rotaugen durchaus möglich. Weiterhin sind auch unterschiedliche Reparatur- und Adaptationskapazitäten in den genetisch unterschiedlichen Individuen einer Art ein wichtiger Faktor, der zu der beobachteten Variabilität beitragen kann (Sugg, 1996). Andere Methoden der *In situ*-Überwachung wie das Einbringen von gewässerfremden Tieren in Käfigen würde zwar eine exaktere Exposition (sowohl räumlich wie auch zeitlich) genau definierter Individuen zulassen, die Belastung eines frei lebenden Individuums kann damit aber nur unvollständig abgebildet werden. Auch über den Einfluß von Adaptationsprozessen der belasteten Tiere an die neue Umgebung sowie über stressinduzierte Veränderungen durch die Käfighaltung ist wenig bekannt, wobei pathologische Veränderungen wie bakterielle Flossenfäule oder die Fischtuberkulose bekanntermaßen häufig stressinduziert sind (Amlacher, 1992).

Auch wenn sich aufgrund der testspezifischen Aufarbeitungen der direkte Vergleich Comet Assay-Primärzellen und Mikrokern-Häufigkeit-Erythrocyten in einem Individuum letztendlich nicht völlig schlüssig führen läßt (*die Primärzellen aus 3 Individuen wurden für einen Comet Assay Ansatz gepoolt*), zeigte sich doch eine deutliche Übereinstimmung zwischen den Befunden aus den beiden Genotoxizitätstest für die beiden Freilandfischarten Rotauge und Gründling sowie ihre entsprechenden Labor-Kontrollgruppen: die erhöhten DNA-Strangbruchraten korrelieren mit einer erhöhten Mikrokernrate.

Weiterführende Arbeiten zur Auswirkung auf die genetische Integrität solcher mit Indikatortests als genotoxisch belastet eingestufte Populationen, wären dringend notwendig, um den Stellenwert und die Aussagekraft der Indikatortests zu validieren und einen möglichen Handlungsbedarf fundiert begründen zu können.

#### **4.2.1 Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen von belasteten RTG - Zellen**

Die Vorversuche zur Etablierung des Mikronukleus Tests mit RTG-2 Zellen zeigten nach dreitägiger Exposition mit den im Comet Assay getesteten Konzentrationen von *4-Nitroquinolin-N-oxid*, daß bei

den mit 1.9 mg/L belasteten Zellen deutliche morphologische Veränderungen unter Auflösung des Monolayers beobachtet werden konnten; vergleichbare Symptome traten nach 5 Tagen auch bei der Konzentration 190 µg/L auf. In den Belastungsgruppen 1.9 µg/L und 19 µg/L konnten keine Veränderungen im Vergleich mit den Kontrollzellen festgestellt werden. In den Untersuchungen mit dem Comet Assay mit einer Expositionszeit von 20 h konnte im Fluoresceindiacetat-Assay nach Strauss (1991) bis zur Konzentration von 1.9 mg/L keine Cytotoxizität festgestellt werden, es traten jedoch vermehrt Kometenformen auf, die in der Literatur als Apoptose-Marker beschrieben wurden (Fairbairn et al., 1995; Gopalakrishna und Khar, 1995; Olive et al., 1993).

Die Apoptose ist eine Form des Zelltods, bei der die betroffenen Zellen eine aktive Rolle in dem Prozess übernehmen und damit das umgebende Gewebe schonen (Williams, 1991). Im Gegensatz dazu kommt es beim Absterben der Zellen über Nekrose zur Lyse der Zellen und damit zu eventuellen Beeinträchtigungen des umgebenden Gewebes. Bei einer massiven Belastung kommt es zur Nekrose; geringerer Stress mit der Möglichkeit einer zellulären Antwort führt zur Apoptose (Cotter und Al Rubeai, 1995). Trump et al., (1997) weisen auf eine andere Terminologie hin, in dem sie der Apoptose die Oncose gegenüberstellten, während die degenerativen Zellveränderungen der späten Stadien beider Prozesse als Nekrose bezeichnet wurden. Da in der vorliegenden Studie nur die Folgen einer im Comet Assay dokumentierten Genotoxizität beleuchtet werden sollten und keine mechanistischen Untersuchungen zum Phänomen Zelltod durchgeführt wurden, wird die alte Terminologie beibehalten.

Die Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung vielzelliger Organismen, beispielsweise durch morphogenen Zelltod bei der Gewebedifferenzierung in der Embryogenese, im physiologisch bedingten Zellturnover eines Gewebes sowie in der Selektion der aktiven Zellen des Immunsystems (Sgonc und Gruber, 1998). Im adulten Gewebe wird Homeostasis erreicht, wenn die Raten von Zellproliferation und Apoptose ausbalanciert sind. Eine Veränderung im Kontrollmechanismus der Apoptose ohne kompensatorischen Ausgleich in der Proliferation der betroffenen Zellen kann Krankheiten begünstigen, die auf unzureichenden (z.B. Krebs) oder exzessiven Zelltod (z.B. AIDS) zurückzuführen sind (Briehl et al., 1997). Auch nach Belastung mit cancerogenen Substanzen konnte die Induktion von Apoptose in Geweben zur Beseitigung geschädigter Zellen nachgewiesen werden (Bisgaard et al., 1996).

Der Prozeß der Apoptose ist morphologisch gekennzeichnet durch ein Schrumpfen der betroffenen Zellen, zunehmende cytoplasmatische Dichte, Chromatin-Kondensation vor allem im Randbereich des Kerns, Kernzerfall und schließlich das ‚Blebbing‘, der Zerfall der betroffenen Zellen in apoptotische Körper (Sgonc und Gruber, 1998). Als biochemischer Indikator hat sich der Nachweis der charakteristischen ‚Leiter‘-Struktur nach elektrophoretischer Analyse hervorgerufen durch die internucleosomale DNA-Fragmentierung durchgesetzt (Catchpole und Stewart, 1995; Harms-Ringdahl et al., 1996).

Auch in der Zellkultur, die in den letzten Jahrzehnten in immer größerem Umfang auch kommerziell genutzt wird, spielt die Apoptose eine wichtige, häufig unterschätzte Rolle (Singh, et al., 1996). Denn es konnte gezeigt werden, daß Zellen in Kultur, die mildem äußerem Stress ausgesetzt wurden, nicht über Nekrose sterben, sondern aktiv den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten (Cotter und Al Rubeai, 1995).

RTG-2 Zellen, die mit 1.9 mg/L 4-Nitroquinolin-N-oxid für 3 Tage belastet wurden (*Konzentration nicht cytotoxisch im Kurzzeittest über 20h*), zeigten licht- und elektronenmikroskopisch die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen, die auf den programmierten Zelltod hindeuten (Abb. 85). Weiterhin hatten sich Zell-Zell-Kontakte sowie der geschlossene Monolayer weitgehend aufgelöst. Im Gegensatz zur *In vivo*-Situation kommt es in der Zellkultur nicht zur Phagozytose der oberflächenmarkierten apoptotischen Zellen / Körper sondern zur Lyse dieser Apoptose-Stufen, auch als sekundäre Nekrose bezeichnet (Cejna et al., 1994). Dies konnte auch bei den belasteten RTG-2 Zellen beob-

achtet werden: nach Chromatinkondensation, Kernfragmentierung, RER-Wirbelbildung und Ausbildung apoptotischer Körper folgte die völlige Auflösung der zellulären Strukturen (Abb. 85). Lichtmikroskopisch zeigte sich auch, daß der Weg über die Zellfragmentierung („Blebbing“), hierdurch entstehen kleinere, einfacher phagozytische apoptotische Körper, nur von einem kleinen Teil (< 10%) der betroffenen Zellen durchlaufen wurde. Der Hauptteil der Zellen durchlief nach Abkugeln und Schrumpfung keine Gestaltänderungen mehr, die Kernmorphologie veränderte sich aber weiter stark bis zur Fragmentierung des Kerns. Bei diesem Prozeß werden zum Teil auch weitere Membranbestandteile bzw. Organellenreste mit in die Kernhülle inkorporiert (Bildtafel 9, Abb. 9.3). Hierbei scheint die Kondensation des Chromatins, wie auf den Bildtafeln 4 und 7 (Abb. 7.2) dokumentiert, die Veränderungen der Kernform zu bedingen.

Auch der Nukleolus tritt als homogene, deutlich abgegrenzte Struktur auf. Arends et al. (1990) konnten an Thymocyten aufzeigen, daß die Chromatinkondensation sowie Änderungen der Kern- und Nukleolus-Morphologie mit der selektiven Aktivierung von Endonukleasen in Zusammenhang stehen. Ultrastrukturell fällt die im Vergleich zur Kontrolle deutliche Proliferation der Peroxisomen auf, was als eine mögliche zelluläre Antwort auf oxidativen Stress interpretiert werden kann. Briehl et al. (1997) konnten in Untersuchungen zur Bedeutung der oxidativen Stresses für die Induktion des programmierten Zelltods zeigen, daß die Supplementierung von belasteten Zellen mit Antioxidantien die Apoptose-Rate herabsetzt und andererseits Stoffe, die das zelluläre Abwehrkapazität gegen reaktive Sauerstoffspezies herabsetzen, Apoptose induzieren.

Für einen aktiven Prozess, ausgelöst durch genotoxischen Stress (*4-Nitroquinolin-N-oxid ist ein starker Induktor oxidativen Stresses und bildet auch Addukte an der DNA*), spricht auch die Beobachtung, daß in der nächsthöheren untersuchten Konzentration mit 19 mg/L die Zellen ohne morphologische Veränderungen abstarben, lichtmikroskopisch war kein Gestaltwechsel oder Kernveränderungen zu beobachten, elektronenmikroskopisch konnten wenige Zellen mit völlig aufgelöster zellulärer Organisation nachgewiesen werden. Wie von Cotter und Al-Rubeai (1995) beschrieben, ist den Zellen aufgrund einer massiven - hier genotoxischen - Belastung eine Reaktion nicht mehr möglich. Schon beim Ernten der Zellen zeigte sich, daß die enzymatische Ablösung über Trypsinierung nicht notwendig war, sondern der komplette Monolayer sich ohne Abkugeln der einzelnen Zellen allein durch leichte mechanische Scherkräfte vom Untergrund ablösen ließ. Im Gegensatz zu CHO-Zellen (*Dauerzelllinie aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters*), bei denen Brezden et al. (1997) eine Auflösung des Monolayers durch programmierten Zelltod der einzelnen Zellen 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz beobachteten, zeigten die konfluent gewachsenen RTG-2 Kontrollzellen kein derartiges Verhalten. Sie können bei angemessenem Mediumwechsel über einen längeren Zeitraum als ausgewachsener Monolayer gehalten werden.

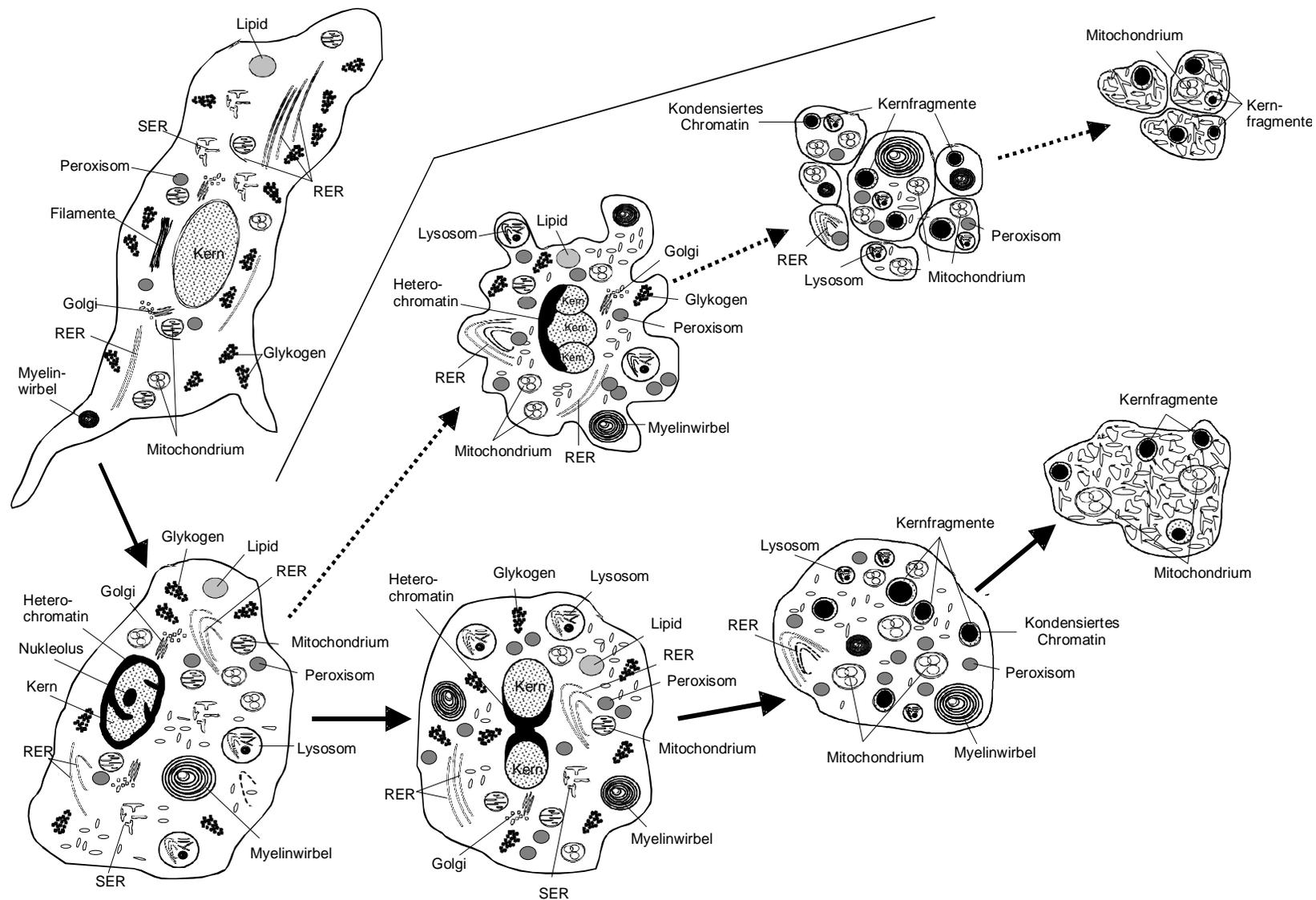
Nekrotische Zellen, die durch unregelmäßige Chromatinverdichtungen im Kern, geringe Gestaltänderung aber völlige Auflösung der zellulären Organisation mit anschließendem Verlust der Membrantegrität charakterisiert sind (Sgonc und Gruber, 1998) konnten in geringem Umfang auch nach Belastung mit 4-NQO und MNNG nachgewiesen werden, die überwiegende Anzahl der Zellen wies aber apoptotische Veränderungen auf. Wie auf Bildtafel 4 (Abb. 4.7 a, b) zu sehen, induziert auch die Belastung mit 40 mg/L *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* drastische Veränderungen, so z.B. sehr starke cytoplasmatische Kondensation und Ausbildung großer Vakuolen.

Zusammenfassend kann eine Induktion des programmierten Zelltods durch die genotoxische Belastung von RTG-2 Zellen festgestellt werden. Die hohe genotoxische Kurzzeit-Belastung über 20 h, mit 1.9 mg/L 4-NQO und 40 mg/L MNNG, führt bei negativen Cytotoxizitäts-Ergebnissen zu starker DNA-Fragmentierung im Comet Assay und bei Langzeitbelastung zur Induktion der Apoptose in den belasteten Zellkulturen. Auch Blankenship (1997) konnten in Untersuchungen mit CHO-Zellen zei-

gen, daß die Zellen relativ hohe genotoxische Belastungen, zumindest bei 24 h Exposition, tolerieren können, ohne daß direkte Cytotoxizität nachweisbar wäre.

Im Ablauf des programmierten Zelltods, wie er, schematisch in Abb. 85 dargestellt, für RTG-2 Zellen unter Belastung mit hohen Konzentrationen des Genotoxins *4-Nitroquinolin-N-oxid* beobachtet wurde, zeigten sich allerdings auch Unterschiede zur *In vivo*-Situation. Diese Form der Eliminierung von geschädigten oder nicht mehr benötigten Zellen ist im Zellverband des Vielzelllers entstanden. In der Zellkultur gehen apoptotische Stadien in eine sekundäre Nekrose über, das Bild wird deutlich variabler. Die *in vivo* beobachtete Membranintegrität der apoptotischen Zellen bis zur letztendlichen Phagozytose durch Zellen des Immunsystems oder benachbarte Zellen wird als ein Schutzmechanismus vor entzündlichen Gewebereaktionen angesehen (Harms-Ringdahl et al., 1996). Wie die Bildtafel 5 zeigt, läßt die Anfärbung der Kerne mit Ethidiumbromid auf Membranschäden schließen, da dieser DNA-Farbstoff normal nicht membrangängig ist. Da es sich bei der Apoptose aber um ein feststehendes Programm handelt, welches in Interaktion mit der Umgebung, einem Gewebe, abläuft und diese Interaktion in der Zellkultur-Umgebung nicht in gleichem Umfang gegeben ist, sind verschiedene Übergangsformen zwischen Apoptose und Nekrose denkbar. Denn trotz offensichtlicher Membranschädigungen sind andere Merkmale der Apoptose wie marginalisiertes Heterochromatin, Schrumpfen der Zellen, Kernfragmentierung und ‚Blebbing‘ deutlich erkennbar und zeigen einen aktiven Prozess an, der noch von den Zellen gesteuert wird. Eine weitere Erhöhung der Substanzbelastung führte dann zum Absterben der Zellen ohne jegliche beobachtbare morphologische, aktive Stoffwechselprozesse bedingende Reaktionen.

Zumindest für die Belastung von RTG-2 Zellen mit *4-Nitroquinolin-N-oxid* konnte damit gezeigt werden, daß sich die häufig beschriebene, auf Apoptose deutende Kometenform mit sehr kleinem Kopf und großem, fächerförmigem Schweif (Bildtafel 1, Abb. 1.6) (Fairbairn et al., 1995; Godard, 1997; Gopalakrishna und Khar, 1995; Olive et al., 1993) mit der Induktion apoptotischer Prozesse bei verlängerter Expositionszeit deckt.



**Abb. 85:** Schematische Darstellung struktureller Veränderungen von RTG-2 Zellen nach genotoxischer Belastung mit 1.9 mg/L 4-Nitroquinolin-N-oxid für 3 Tage; das gleiche Bild läßt sich nach 5 Tagen auch für die Belastungskonzentration 190 µg/L zeigen. Durchgezogener Pfeil: Hauptweg von > 90% der Zellen; punktierte Pfeillinie: Blebbing regelmäßig aber nur bei wenigen Zellen (< 10%). RER: Rauhes Endoplasmatisches Retikulum; SER: Glattes Endoplasmatisches Retikulum.

#### **4.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Leber und Kieme von Zebra­bärblingen aus einem Life-Cycle Experiment mit 4-Nitroquinolin-N-oxid**

Aus dem von Dipl.-Biol. M. Diekmann aus der AG Nagel der Hydrobiologie der TU Dresden durchgeführten Life-Cycle mit Zebra­bärblingen mit der gentoxischen Substanz *4-Nitroquinolin-N-oxid* konnten parallel zu den Tieren, die im Comet Assay untersucht wurden auch jeweils ein Männchen und ein Weibchen pro Konzentration für elektronenmikroskopische Untersuchungen herangezogen werden. Hierbei wurden Leber und Kiemen der exponierten Fische licht- und elektronenmikroskopisch auf cytopathologische und ultrastrukturelle Veränderungen untersucht. Nach (Braunbeck, 1998) sind cytopathologische Untersuchungen an Hepatocyten aus Fischen geeignet subletale Belastungen zu diagnostizieren und um Aussagen zum möglichen Wirkmechanismus machen zu können. Die Leber wurde als Monitororgan gewählt, da sie im Stoffwechsel der Wirbeltiere und hier besonders in der Bioakkumulation und –transformation aufgenommener Schadstoffe eine zentrale Rolle einnimmt (Goksoyr und Husoy, 1998; Goksoyr and Förlin, 1992; Quabius, 1998; Stegeman und Lech, 1991). Ein weiteres Zielorgan bei Fischen ist in dieser Hinsicht die Kieme, denn über dieses Organ gelangt ein großer Teil der im Wasser gelösten Schadstoffe in den Organismus; mögliche cytopathologische Veränderungen sollten sich somit in der Kieme manifestieren (Dutta et al., 1993; Mallat, 1985; Riji John und Jayabalan, 1993). Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Tiere wurde auf die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen bezüglich bestimmter Parameter verzichtet, sondern nur cytologische Parameter erfaßt, in denen sich die belasteten Tiere in ihrer Gesamtheit von der Kontrolle unterschieden. Diese Untersuchung wurde für die Hepatocyten nach Geschlechtern getrennt durchgeführt, da Fische ultrastrukturell einen deutlichen Geschlechtsdimorphismus aufweisen (Braunbeck et al., 1990; Phromkunthong et al., 1995) und damit geschlechtsspezifische Reaktionen zu erwarten sind. Das Leberparenchym der weiblichen Belastungstiere zeigte deutlich mehr Makrophagen als die Kontrolle, z.T. konnten große Makrophagennester beobachtet werden. Dieses wird als unspezifische Reaktion auf Belastung mit verschiedenen Xenobiotika beschrieben (Braunbeck, 1998; Braunbeck und Völkl, 1993; Gerundo, 1991; Spazier et al., 1992). Weiterhin fanden sich Parenchymstörungen mit großflächigen Fasereinlagerungen, was als Begleiterscheinung von entzündlichen Reaktionen angesehen wird, denn Gerüste von Fibrinfasern, deren Bildung durch die Entzündung induziert wurde, begrenzen dann die Läsionen (Roberts und Schlotfeldt, 1985). Es handelt sich um eine unspezifische Reaktion entweder auf bakterielle Infektionen oder auf durch Schadstoffwirkung induzierte Entzündungsherde.

Ultrastrukturell zeigten die Hepatocyten der weiblichen Tiere eine Vermehrung des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums (RER) und des Golgi-Apparats, was als eine Vergrößerung des Proteinbiosyntheseapparats verstanden werden kann. Weiterhin zeigte das RER immer wieder deutliche Fragmentierungen, Dilatationen sowie beginnende Wirbelbildung, Symptome, die nach Belastung mit unterschiedlichen Schadstoffen beobachtet werden können (Braunbeck 1992; Braunbeck, 1992). Hierbei handelt es sich um Veränderungen zur Vergrößerung der Membranflächen des RER, ein Adaptationsversuch an veränderte, stressinduzierte Bedingungen. Weiterhin konnte eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (SER) festgestellt werden. Da auf den Membranen des SER Enzymsysteme der Biotransformation lokalisiert sind, kann eine Proliferation des SER mit einer Induktion der Biotransformation in Zusammenhang gebracht und konnte in verschiedenen Belastungsexperimenten nachgewiesen werden (Arnold und Braunbeck, 1994; Braunbeck und Völkl, 1991). Ein weiterer unspezifischer Parameter zellulären Stresses ist das gehäufte Vorkommen lysosomaler Elemente. Bei der Untersuchung der Hepatocyten aus den belasteten Männchen fiel eine deutliche Zunahme der Heterochromatinmenge im Zellkern auf. *4-Nitroquinolin-N-oxid* kann nach endogener Metabolisie-

rung über oxidativen Stress (Nunoshiba und Demple, 1993) und Adduktbildung (Harvey und Parry, 1998) mit der DNA interagieren. Nach Réz (1986) kann eine Erhöhung des Heterochromatingehalts als eine Inaktivierung des Zellkerns betrachtet werden. Zumindest ist eine Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität des Zellkerns durch die belastungsinduzierten DNA-Schäden denkbar. Auch wenn sie das Niveau der Kontrollzellen deutlich übersteigt, so ist die Zunahme marginalisierten Heterochromatins in diesen Zellen nicht mit der Chromatinkondensation in den belasteten RTG-2 Zellen vergleichbar. Das Rauhe Endoplasmatische Retikulum (RER) zeigte vermehrt stark dilatierte Zisternen. Als weitere ultrastrukturelle Veränderungen ist, vergleichbar den weiblichen Tieren, bei den männlichen Zebrafischarten eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (SER) zu erkennen. Auch das vermehrte Vorkommen von Makrophagen sowie von Fasereinlagerungen konnte bei den männlichen Tieren beobachtet werden.

Die Kiemen zeigten ein variables, allerdings geschlechtsunabhängiges Bild. Während die Kontrollen morphologisch recht einheitlich waren, konnten bei den belasteten Tieren beiderlei Geschlechts neben kontroll-ähnlichen Bereichen immer wieder Areale mit vielen nekrotischen Zellen, abgehobenem Epithel sowie eingewanderten Makrophagen beobachtet werden. Derartige Stress-Symptome konnten in vielen Belastungsstudien nachgewiesen werden (Barker, 1994; Dutta et al., 1993; Lacroix et al., 1993; Mueller, 1991; Temmink et al., 1983). Nikl und Farrell (1993) zeigten, daß die beobachteten Veränderungen bei verstärkter Ausprägung die Fitness der untersuchten Tiere herabsetzen können. Zusammenfassend zeigten die belasteten Tiere beider Geschlechter deutliche Anzeichen zellulären Stresses, ausgelöst durch die Belastung mit dem Gentoxin *4-Nitroquinolin-N-oxid*. Das Leberparenchym ist deutlich heterogener, Makrophagen, als unspezifische Abwehrzellen sowie Parenchymstörungen traten vermehrt auf, und auch ultrastrukturell zeigten die Zellen der belasteten Tiere Unterschiede zur Kontrolle, die bei den männlichen Tieren stärker ausgeprägt waren. Ebenso zeigten die Kiemen beider Geschlechter Stresssymptome, die die Fitness der betroffenen Individuen aufgrund erschwerter Sauerstoffaufnahme vermindern können. Diese beobachteten Effekte nach chronischer Belastung mit 4-NQO traten in Konzentrationsbereichen auf, die nahe der Nachweisgrenze im Comet Assay mit 20 h Belastung lagen. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die biologische Bedeutung des genotoxischen Signals DNA-Strangbruch im Comet Assay, denn cytopathologische und ultrastrukturelle Veränderungen nach Langzeitbelastung sowie geringe DNA-Schäden im Kurzzeittest treten bei vergleichbaren 4-NQO-Konzentrationen auf. Weitere ultrastrukturelle und cytopathologische Studien nach chronischer Belastung mit auf anderen Wegen wirkenden genotoxischen Substanzen wären wichtig, um die Auswirkungen des Indikators ‚DNA-Strangbruchs‘ weiter zubeleuchten.

#### **4.2.1 Untersuchungen zur Embryo- und Early-Life-Stage-Toxizität der im Comet Assay untersuchten Gentoxine mit dem Zebrafischarten**

Zur weiteren biologischen Charakterisierung der im Comet Assay mit primären Fischzellen nachgewiesenen Effekte nach Belastung mit genotoxischen Substanzen wurden *2-Acetylaminofluoren*, *Benzo[a]pyren*, *Dimethylnitrosamin*, *Nitrofurantoin*, *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin*, *4-Nitroquinolin-N-oxid* sowie *UV C Licht* in den gleichen Konzentrationsbereichen auf mögliche teratogene (*keimschädigende*) Effekte im Embryotoxizitäts-Test mit dem Zebrafischarten nach (Schulte und Nagel, 1994) überprüft.

Der Life Cycle Test mit verschiedenen Organismen, also die kontinuierliche Belastung von Tieren ab dem Embryonalstadium der Generation x bis mindestens zu dem aus der Generation x + 1, wird allgemein als das ultimative Verfahren zur sicheren Abschätzung von NOEC-Konzentrationen (*no observable effect concentration*) toxischer Substanzen in der Umwelt angesehen. Allerdings ist der Zeitaufwand gerade bei der Untersuchung von Wirbeltieren wie Fischen mit 6 - 12 Monaten sehr hoch.

(McKim, 1985). Da sich die Embryonal- und Larvalentwicklung von Fischen in Life-Cycle Tests als besonders sensibles Fenster zur Erfassung toxischer Effekte erwiesen hat, ist sie mittlerweile ein wichtiges Testelement zur Erfassung des umweltgefährdenden Potentials von Chemikalien (Van Leeuwen et al., 1990). Vergleichende Untersuchungen zeigten deutliche Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen der Auswirkungen von Chemikalien auf adulte Fische unter den vom Chemikaliengesetz (§ 7 ChemG) geforderten Bedingungen und den Ergebnissen aus Tests zur Embryotoxizität mit dem Zebraärbli (Friccius et al., 1995). Ähnliches konnte auch für den Vergleich kompletter Life-Cycle Experimente mit dem Early-Life Stage dokumentiert werden (McKim, 1985). Da der Embryotoxizitätstest nach Schulte und Nagel (1994) nach 48 h noch vor dem Schlupf der Tiere beendet wird (*nach dem derzeit gültigen Tierschutzgesetz muß dieser Versuch damit noch nicht als Tierversuch deklariert und genehmigt werden*), der Zeitpunkt des Schlupfes sowie der Zustand der geschlüpften Larven aber weitere wichtige Parameter in der Abschätzung einer Belastung sind, wurde der Test auf die Early-Life Stage-Phase bis 96 h ausgedehnt. Der Schlupf wird in der Regel über das Zusammenspiel des ‚hatching enzymes‘ Chorionase mit erhöhtem Innendruck, Muskelkontraktionen sowie aktiver Wasseraufnahme durch den Embryo ausgelöst. Hier können Umweltfaktoren und Schadstoffe diesen vielschichtigen Prozess auf unterschiedlichen Wegen beeinflussen (Dave und Xiu, 1991).

Von den sieben getesteten Gentoxinen zeigten 3 keine oder nur geringe Wirkung auf die Embryonal- und Larvalentwicklung des Zebraärbli innerhalb der ersten 96 h. In Übereinstimmung mit den *In vivo*-Daten zur Induktion von DNA-Schäden im Comet Assay, wo die *Benzo[a]pyren*-Belastung zu keiner DNA-Fragmentierung führte, zeigte dieses Gentoxin auch keine Effekte auf die Embryo-Larvalentwicklung des Zebraärbli. Übereinstimmend konnten Petersen und Kristensen (1998) ebenfalls keine Effekte von *Benzo[a]pyren* auf die Larvalentwicklung von *Danio rerio* aufzeigen. Allerdings wiesen sie eine deutliche Bioakkumulation dieser lipophilen Substanz schon im Ei nach. Aufgrund der in verschiedenen Studien nachgewiesenen geringeren metabolischen Kapazität embryonaler und larvalen Stadien im Vergleich zum adulten Tier (Binder und Stegeman, 1984; Goksoyr et al., 1991) muß hier jedoch prospektiv von einem latentem Gefährdungspotential ausgegangen werden. Auch wenn nach McKim (1985) Early-Life Stage Untersuchungen in den meisten Fällen sehr gute Übereinstimmung mit chronischen Langzeittests zeigten, so handelt es sich bei *Benzo[a]pyren* um eine der Substanzen, bei denen erst Langzeituntersuchungen Klarheit über das mögliche toxische/genotoxische Potential *in vivo* erbringen können.

Ähnliches gilt auch für *Dimethylnitrosamin*, das nur schwache Reaktionen *in vitro* und *in vivo* im Comet Assay (*signifikant erhöhte, aber insgesamt geringe DNA-Fragmentierung*) induzierte; dies weist auf die geringe Affinität des Fisch P450-Systems zu diesem Gentoxin hin (*die im Säuger höchste Affinität zu DMNA zeigt die Isoform P4501A2, die bisher im Fisch nicht nachgewiesen wurde* (Steward et al., 1995)). Die Induktion von Lebertumoren nach Langzeitbelastung (Khudoley, 1984) zeigt auch hier, daß geringe Effekte in Kurzzeittests wie den beschriebenen Comet Assays oder dem Early-Life Stage, in dem nur in hohen Konzentrationen toxische Effekte zu beobachten waren (Tab. 38), deutliche Konsequenzen bei chronischer Belastung anzeigen können.

*Nitrofurantoin* zeigte deutliche Effekte im *In vitro*-Comet Assay, allerdings erst in hohen mg/L-Konzentrationen. *In vivo* konnte keine DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden und auch im Early-Life Stage zeigten sich Effekte erst nahe der Löslichkeitsgrenze. Das oxidative Potential und die DNA-schädigende Wirkung von *Nitrofurantoin* konnte zwar in verschiedenen Studien *in vitro* und *in vivo* bei Fischen gezeigt werden (Babich et al., 1993; Nishimoto et al., 1991; Washburn und Di Giulio, 1988), Daten zu Ergebnissen aus Life Cycle Untersuchungen fehlen jedoch leider.

**Tab. 38:** LC 50-Konzentrationen der getesteten Gentoxine in mg/L nach 48 h und 96 h nach Befunden aus Embryo-Larval-Untersuchungen am Zebrafisch (*Danio rerio*)

Substanz	48 h	96 h
<i>Benzo[a]pyren</i>	25.2 (10 %)**	25.2 (10 %)
<i>Dimethylnitrosamin</i>	740 (25 %)	740 (25 %)
<i>Nitrofurantoin</i>	720 (30 %)	720 (60 %)
<i>2-Acetylaminofluoren</i>	0.32*	0.22
<i>N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin</i>	0.8	0.9
<i>4-Nitroquinolin-N-oxid</i>	0.63	0.27
<i>UV C Licht (254 nm)</i>	105 sec***	105 sec

\* LC 50 in mg/L

\*\* keine LC 100 erreicht, maximales Schadenslevel in (%) in der höchsten getesteten Konzentration

\*\*\* im Unterschied zur Substanztestung wurde die Embryonalentwicklung nach einer einzelnen Dosis UV C Licht auf die befruchteten Eier untersucht.

Im Gegensatz zu den besprochenen Substanzen zeigten die nächsten 4 genotoxischen Noxen starke Effekte im Early Life Stage Test mit dem Zebrafisch. Trotz der unterschiedlichen Wirkmechanismen Adduktbildung (2-AAF), Alkylierung der DNA-Basen (MNNG), oxidativer Stress und Adduktbildung (4-NQO) sowie Photodimerisierung und Strangbrüche (UV C Licht) zeigten sich ähnliche Auswirkungen auf die Entwicklung der belasteten Tiere (Bildtafel 23 u. 24). Da die genotoxische Wirkung von 2-AAF auf der metabolischen Aktivierung durch zelluläre Enzymsysteme beruht und diese Aktivierungsreaktion im Fisch nur recht gering ausgeprägt ist, überraschte die starke Reaktion der Embryonen auf die Belastung mit 2-AAF. Während der Embryonalentwicklung im Ei bis 48 h induzierte die Substanz eine Ja / Nein-Antwort, d.h. entweder ein Absterben des Embryos oder aber eine auch mikroskopisch unauffällige Entwicklung. Im Early-Life Stage konnte dann eine dosisabhängige Verringerung der Schlupfrate zwischen 48 h und 72 h festgestellt werden, deutlich verspätet schlüpfende Larven zeigten alle starke Verkrümmungen in der Längsachse. Da auch in den *In vivo*-Untersuchungen zum Comet Assay mit adulten Zebrafischen eine starke akute Toxizität für 2-Acetylaminofluoren beobachtet werden konnte, muß von der Existenz weiterer Aktivierungs- und/oder Wirkmechanismen im Fisch ausgegangen werden. Diese Toxizität konnte im *In vitro*-Ansatz mit primären Zellen aus dem Zebrafisch allerdings nicht abgebildet werden, da sich bis zur Löslichkeitsgrenze (223 mg/L) keine Cytotoxizität nach 20 h Belastung feststellen ließ. MNNG, 4-NQO sowie UV C Licht induzierten eine Vielzahl beobachtbarer Effekte, in diesen Fällen kann aufgrund der direkten Wirkungsweise auch in Embryonen mit geringer metabolischer Kompetenz von einer genotoxischen Wirkung ausgegangen werden.

Im Gegensatz zu 2-AAF zeigte sich bei keiner der drei Schadstoffe MNNG, 4-NQO und UV C eine ausgeprägte Ja / Nein-Antwort, vielmehr führte die Belastung verstärkt zu aberranten Formen. In den höheren Konzentrationen bzw. in den längeren Expositionszeiten (UV C) kam es bei allen 3 Toxinen zu deutlichen Entwicklungsstörungen, wie einer ungerichteten Zellteilung ohne Anlage von Somiten, unterbleibender Cephalisation, gestörter Epidermisentwicklung, retardierter Entwicklung und großen Oedemen. Der größte Teil dieser betroffenen Embryonen lebte allerdings bei Testende noch, diese Tiere wurden aber aufgrund der erheblichen Mißbildungen als letal geschädigt eingestuft. Die betroffenen Larven zeigten deutliche morphologische Übereinstimmungen mit aberranten Formen, die in einem großangelegten Screening mit dem Zebrafisch zur Aufklärung der genetischen Basis der

Entwicklung von Wirbeltieren erzeugt wurden (Brand et al., 1996; Chen et al., 1996; Kane et al., 1996; Mullins et al., 1996; Odenthal et al., 1996; Stainier et al., 1996; Van Eeden et al., 1996). Diese Mutationen wurden durch Behandlung der elterlichen Keimzellen mit Mutagenen eingeführt, detaillierte Beschreibungen des Projekts können Driever et al. (1996) und Haffter et al. (1996) entnommen werden.

Elonen et al. (1998) konnte deutliche Deformationen und Oedembildungen nach Belastung mit verschiedenen Konzentrationen von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in verschiedenen Fischarten nachweisen, ebenso wie Bruggeman et al. (1998) in den Larven des Krallenfroschs, *Xenopus laevis*, nach UV B-Bestrahlung. Mißbildungen beobachtete auch Cameron et al. (1996) in der Embryonalentwicklung pelagischer Eier von Fischen aus deutlich verschmutzten Bereichen der Nordsee. Für die untersuchten Gentoxine 2-AAF, MNNG, 4-NQO sowie UV C lag hierbei der LC 50 um den Faktor 10-100 über der Nachweisgrenze des Comet Assays *in vitro* mit Primärzellen. Hiermit kann, wie in Tabelle 39 gezeigt, ein Comet Assay-Bild mit mittlerem Schädigungsgrad für 4 gentoxische Noxen mit sehr deutlichen Effekten in der Embryo-Larvalentwicklung eines Fisches korreliert werden. Damit zeigt in dieser Untersuchung der Laborparameter DNA-Fragmentierung in mittleren Schädigungsbereich ein deutliches ökotoxikologisches Potential. Für 4-NQO zeigte sich schließlich auch eine gute Übereinstimmung mit den Daten aus dem Life Cycle Test mit Zebraquärlingen (Diekmann et al., 1998).

#### 4.7 Zusammenführung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Etablierung der Einzelzellelektrophorese (Comet Assay) mit Primärzellen aus Fischen als ein mögliches Testverfahren zur Überprüfung des genotoxischen Potentials von Oberflächen- und Trinkwasser. Erste Untersuchungen mit der Dauerzellelinie RTG-2 sowie Primärzellen aus dem Zebraquärling zeigten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der Reaktion von Fischzellen und Säugerzellen auf die Belastung mit bekannten Gentoxinen im Comet Assay (*das Testprotokoll wurde hauptsächlich mit menschlichen Zellen erarbeitet*). Eine Konsequenz war die Verlängerung der Expositionszeit auf 20 h, eine für einen DNA-Strangbruchtest ungewöhnlich lange Zeit. Nur so konnten auch die indirekt wirkenden Gentoxine 2-Acetylaminofluoren, Benz[*a*]pyren sowie Dimethylnitrosamin nachgewiesen werden.

Parallel zu den *In vitro*-Untersuchungen wurde mit den gleichen Gentoxinen auch ein *In vivo*-Versuchsprotokoll erarbeitet. Mit diesen Standardprotokollen wurde dann mit primären Hepatocyten und Kiemenzellen in einem Jahrgang Wasserproben von Rhein und Elbe sowie Zusatzproben von Wupper und Neckar getestet.

Erwartungsgemäß zeigte der überwiegende Anteil der Wasserproben kein genotoxisches Potential. Durch die computergestützte Vermessung der Kometen ist die Aufnahme mehrerer Parameter möglich, der statistische Vergleich der beiden Endpunkte Tail Moment (*zur Zeit Standard*) und Tail Length (*historischer Parameter*) erbrachte eine deutlich erhöhte Anzahl positiver Wasserproben mit dem Parameter Schweiflänge (*Tail Length*). Der biologisch sinnvollere Parameter, da in das Produkt Tail Moment neben der Schweiflänge auch die Fluoreszenzintensität im Schweif (als Maß für die Intensität des DNA Schadens) eingeht, bleibt aber das Tail Moment.

Aus den durchgeführten *In vitro*- und *In vivo*-Untersuchungen zum Comet Assay mit Primärzellen aus dem Zebraquärling lassen sich die folgenden Ergebnisse ableiten:

- Der Comet Assay mit Primärzellen aus Fischen ist ein schnell durchführbarer Genotoxizitätstest, mit dem sich das DNA-schädigende Potential von Einzelstoffen und Umweltproben auf dem Organisationsniveau der Wirbeltiere reproduzierbar nachweisen läßt.

- Der Einsatz kompetenter Zellen auf einem hohen Organisationsniveau (Primärzellkulturen aus Wirbeltieren) erschwert aufgrund vorhandener Schutzmechanismen und Reparatursysteme den Nachweis genotoxischer Effekte an sich, erleichtert aber die Bewertung der Befunde.
- Die Möglichkeit des *In vitro*-/*In vivo*-Vergleichs im System Wirbeltier vereinfacht die Übertragung der Befunde aus den *In vitro*-Prüfungen auf den gesamten Organismus.
- Die *In vitro*-Prüfungen zeigten gegenüber den *In vivo*-Prüfungen eine höhere Empfindlichkeit sowohl für die ausgewählten Referenzsubstanzen als auch für die getesteten Wasserproben. Daher scheint der *In vitro*-Ansatz, nicht zuletzt auch wegen des reduzierten Tierverbrauchs und geringeren zeitlichen Aufwandes, als Routinetest besser geeignet zu sein als das *In vivo*-Experiment.
- Die Vorinduktion von Zebraäbrlingen mit  $\beta$ -Naphthoflavon erhöht zwar die Sensitivität des *In vivo*-Assays, ist aber unter dem Aspekt der Praktikabilität in Routine-Prüfungen nicht zu empfehlen und mit dem Tierschutzgedanken nur schlecht zu vereinbaren.
- Die Primärkulturen der Hepatocyten reagieren bei *In vitro*-Expositionen in den meisten Fällen mit ähnlicher Empfindlichkeit wie die Primärkulturen der Kiemenzellen; bedingt durch ihre höhere metabolische Kompetenz läßt sich mit den Hepatocyten aber ein breiteres Spektrum an genotoxischen Substanzen nachweisen.
- Bei der Untersuchung der nativen Wasserproben in den Jahren 1997 und 1998 zeigte die überwiegende Mehrzahl der Proben kein genotoxisches Potential. Aufgrund der sich stetig verbessernder Wasserqualität unserer Flüsse erscheint es daher fraglich, ob sich in einem Kurzzeit-Screening-Test mit intakten, reaktionsfähigen Systemen Genotoxizität nachweisen läßt.
- Kiemenzellen sind aufgrund der geringeren Zellzahl pro Fisch sowie aufgrund ihrer geringeren Größe für eine *In vitro*-Exposition weniger geeignet als Hepatocyten. Für Routineuntersuchungen sind daher Hepatocyten vorzuziehen.
- Für die Untersuchung von *In vivo*-Schäden durch genotoxische Substanzen erscheint eine Untersuchung der Kiemenzellen und eventuell weiterer Zellsysteme sinnvoll, da diese aufgrund der unmittelbareren Exposition möglicherweise eine schnellere Reaktion erwarten lassen.
- Bei einer Expositionszeit von 20 h nimmt die *In vitro*-Prüfung einer Substanz oder Umweltprobe (*Bearbeitung von acht Konzentrationen bzw. Verdünnungen*) mit isolierten Hepatocyten aus dem Zebraäbrling 2 Tage in Anspruch.
- Bei der Verwendung von Primärkulturen für den *In vitro*-Comet Assay zeigte sich eine bisweilen beträchtliche Variabilität in Zellausbeute und Qualität der Zellen. Zweifellos ist eine gewisse Routine in der Isolation und Behandlung der Zellen eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung des Comet Assays mit isolierten Fischzellen.

Der Mikrokern Test (Mikronukleus Test) wurde mit RTG-2 Zellen und den Gentoxinen *Benzo[a]pyren*, *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* und *4-Nitroquinolin-N-oxid* etabliert und durchgeführt, um die Ergebnisse aus dem Comet Assay mit einem weiteren geontoxischen Endpunkt vergleichen zu können. In diesem Vergleich erwies sich der Comet Assay als sensitiver, erhöhte Mikrokernraten waren aber bereits in Konzentrationen nachweisbar, die im Comet Assay nur zu leichten DNA-Schäden führten (siehe Tab. 39). Dieser Nachweis von ultimativen Erbgutveränderungen (*das im Mikrokern enthaltene Erbgut ist für die betroffene Zelle und eventuelle Tochterzellen verloren*) im niedrigen Konzentrations-/Wirkbereich des Comet Assays ist ein wichtiges Kriterium zur Validierung des Indikatortests Comet Assay mit dem Endpunkt DNA-Strangbruch, einem an sich reparablen, ‚transitorischen‘ Effekt.

Als ein weiterer wichtiger Aspekt für den Einsatz des Comet Assays im aquatischen Bereich wurden *In situ*-Untersuchungen durchgeführt, bei denen Primärzellen aus Freilandfängen auf DNA-Schäden

untersucht wurden. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden die im Labor gehaltenen Kontrolltiere von Rotaugen und Gründlingen einem vergleichbaren Fang- und Transportstress ausgesetzt wie die im Neckar gefangenen Tiere. Daneben wurden Primärzellkulturen aus Leber und Kieme von Gründlingen und Rotaugen auch mit den Modellsubstanzen *Benzo[a]pyren* und *4-Nitroquinolin-N-oxid* belastet: die Ergebnisse dieser Expositionsversuche zeigten eine vergleichbare Reaktion der Zellen auf genotoxische Belastungen wie die der Zebraäbrlingszellen.

Im Gegensatz zu den *in vitro* getesteten Wasserproben, die in der Mehrzahl ohne Befund waren, zeigten die Primärzellen der Freilandfische aus dem Neckar sowie von Bachforellen und Stichlingen aus kleineren Vorflutern aus dem Raum Heidelberg sehr häufig signifikant größere DNA-Fragmentierung als die entsprechenden Zellen der Tiere aus der Laborhaltung. Hierbei zeigten die untersuchten Kiemen- und Darmzellen sogar häufiger positive Befunde als die Hepatocyten. Übereinstimmend hiermit zeigte die Gruppe der untersuchten Freilandtiere auch eine signifikant erhöhte Mikrokernrate in Erythrocyten. Hieraus lassen sich folgende Schlußfolgerungen ableiten:

- Für den Einsatz zur Prüfung genotoxischer Einflüsse auf Tiere aus dem Freiland erscheint der Comet Assay hervorragend geeignet; sind keine Manipulationen der Zellen in Zellkultur notwendig, reichen sehr geringe Mengen ( $1 \times 10^5$  Zellen) zur Durchführung eines Assays.
- Untersuchungen an verschiedenen Fischpopulationen aus dem Freiland deuten auf die Gegenwart genotoxischer Substanzen im natürlichen Ökosystem hin. Positive Befunde im Comet Assay lassen sich mit dem Mikrokern-Test bestätigen. Weiterführende Untersuchungen im Freiland sind daher dringend gefordert.
- Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand ist der Comet Assay mit Primärzellen für *In vitro*-Untersuchungen mit nativen Wasserproben eher ungeeignet: die Wasserproben zeigen im Kurzzeittest *in vitro* überwiegend keine Genotoxizität, die Freilandfische sind in der Mehrzahl der Untersuchungen sowohl im Comet Assay als auch im Mikronukleus Test leicht, aber signifikant positiv. Hier besteht dringender Klärungsbedarf.

Die Belastung von Fischen mit niedrigen, umweltrelevanten Konzentrationen von Gentoxinen wurde in 2 Life Cycle Experimenten mit *Benzo[a]pyren* und *4-Nitroquinolin-N-oxid* (4-NQO) am Institut für Hydrobiologie der TU Dresden untersucht. Hierbei konnten in unter Schadstoffeinfluß aufgewachsenen, adulten Fischen mit dem Comet Assay DNA-Schäden in Hepatocyten und Kiemenzellen nachgewiesen werden. Die ultrastrukturelle Untersuchung von Leber und Kieme zeigte für die untersuchten Belastungstiere aus dem 4-NQO-Versuch deutliche Anzeichen zellulären Stresses.

- Auch in Life Cycle Untersuchungen mit genotoxischen Substanzen, in denen umweltrelevante Konzentrationen getestet werden, ist der Nachweis von Genotoxizität mit dem Comet Assay und Primärzellen möglich.
- Vergleichende ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten deutliche Anzeichen zellulären Stresses. Hier sind weitere Untersuchungen zur Cytopathologie unterschiedlicher Gentoxine mit verschiedenen Wirkmechanismen nötig, da bei der 4-NQO-Belastung die beobachteten Veränderungen schon nahe der Nachweisgrenze im Comet Assay *in vitro* auftraten.

Die im Comet Assay mit Primärzellen aus dem Zebraäbrbling getesteten 7 genotoxischen Substanzen 2-Acetyaminofluoren (2-AAF), *Benzo[a]pyren* (BP), *Dimethylnitrosamin* (DMNA), *Nitrofurantoin* (NF), *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* (MNNG), *4-Nitroquinolin-N-oxid* (4-NQO) sowie UV C Licht wurden auch auf ihr teratogenes Potential im Early-Life Stage Test mit dem Zebraäbrbling untersucht. Hierbei zeigten 3 Substanzen kaum Effekte: BP wird im Embryo hauptsächlich in Fettdepots gespeichert mit möglichen fatalen Konsequenzen für die weitere Entwicklung. DMNA ist ein potentes Cancerogen, wird aber im Fisch kaum metabolisiert und scheint nur in chronischen Langzeituntersu-

chungen anzuschlagen. Gegen den von Nitrofurantoin induzierten oxidativen Stress scheinen Fische sich auch schon in der Embryonalentwicklung schützen zu können.

Die Belastung mit den Gentoxinen *2-Acetyaminofluoren* (2-AAF), *N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin* (MNNG), *4-Nitroquinolin-N-oxid* (4-NQO) sowie UV C Licht hatte drastische Konsequenzen für die Embryonalentwicklung des Fisches. Diese Substanzen haben sehr unterschiedliche Wirkmechanismen: Adduktbildung nach P450-Aktivierung (2-AAF), Alkylierung der DNA-Basen (MNNG), oxidativer Stress und Adduktbildung nach Aktivierung über cytosolische Nitroreduktasen (4-NQO) sowie Induktion von Photoprodukten und Strangbrüchen (UV C). Dennoch zeigten sie alle sehr steile Dosis-Wirkungs-Beziehungen und eine hohe Rate von Mißbildungen in den mittleren Konzentrationen. Die betroffenen Larven wiesen hierbei deutliche morphologische Ähnlichkeiten mit Entwicklungsmutanten aus genetischen Screenings auf. Die ermittelten LC 50-Konzentrationen entsprachen Testkonzentrationen im Comet Assay, die bereits deutliche DNA-Schäden induzierten. Bei diesen Konzentrationen ist dann die Entwicklung der Population auch schon massiv gestört, denn 50 % der sich entwickelnden Larven sterben ab oder sind so massiv mißgebildet, daß auch diese unter dem Aspekt der individuellen Fitness als nicht lebensfähig angesehen werden müssen. Die Folgerungen aus diesen Experimenten sind:

- Early Life Stage-Untersuchungen zur Genotoxizität sind ein wichtiger Parameter, um die Auswirkung einer Belastung auf sensitive Stadien der Entwicklung eines Organismus zu diagnostizieren. In der vorliegenden Studie sind massive Mißbildungen und Letalität die Konsequenz aus der Belastung mit mittleren Konzentrationen unterschiedlich wirkender Gentoxine, die im *In vitro*-Kurzeittests wie dem Comet Assay mit Primärzellen bereits deutlich positive Resultate erzeugen.
- Im Bereich Genotoxizität können Early-Life Stage-Untersuchungen keine chronischen Untersuchungen ersetzen: DMNA zeigt im Fisch in Kurzeittest nur geringe Auswirkungen, in Langzeituntersuchungen induziert diese Substanz Lebertumore; BP blieb bis zur Löslichkeitsgrenze ohne deutliche Auswirkungen, die Akkumulation in embryonalem Fettgewebe konnte aber in anderen Untersuchungen gezeigt werden.

Konzentrationen der Gentoxine 4-NQO und MNNG, die im Comet Assay mit Primärzellen und Dauerzelllinien (RTG-2) sehr starke DNA-Fragmentierung induzierten, führten nach mehrtägiger Belastung von RTG-2 Zellen zu apoptotischen Veränderungen in den betroffenen Zellen. Dieses konnte sowohl licht- wie auch elektronenmikroskopisch gezeigt werden. DNA-Schäden induzieren über eine Stoffwechsellkaskade ein Arretieren des Zellzyklus, der DNA-Schaden kann behoben werden, bevor es zu einer Zellteilung kommt. Ist der DNA Schaden aber zu massiv, kann der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet werden, dessen morphologische Ausprägung bei den untersuchten RTG-2 Zellen beobachtet werden konnte. Daß die festgestellten morphologischen Veränderungen einem aktiven Prozess zugrunde liegen, zeigte die Beobachtung, daß in der nächst höheren Konzentration die Zellen ohne Veränderungen von Zellgestalt und Kernmorphologie abstarben; die Zellen lösten sich flächig vom Substrat ab. Die im Comet Assay in diesen Konzentrationen beobachtete sehr starke DNA-Fragmentierung konnte allerdings nur in *In vitro*-Untersuchungen beobachtet werden (Tab. 39), für einen Organismus scheint eine derartige Belastung aufgrund der massiven Genotoxizität oder sekundärer Toxizitätseffekte nicht tolerierbar. Dieses zeigen auch die dreitägigen *In vivo*-Versuche: aufgrund akuter Toxizität lagen die möglichen Testkonzentrationen immer deutlich unter den *In vitro*-Konzentrationen für die betreffenden Substanzen.

Der Comet Assay mit Fischen und Fischzellen ist ein Genotoxizitätstest, der aufgrund seiner leichten Adaptierbarkeit an unterschiedliche Zelltypen sowie der Möglichkeit von *In vitro*-*In vivo*-Vergleichen im Umweltmonitoring flexibel einsetzbar ist. Der Vergleich mit weiteren Untersuchungen im Umfeld

der Genotoxizität wie Mikrokern-Untersuchungen, vergleichende Freilanduntersuchungen, ultrastrukturelle Untersuchungen belasteter Organismen, Early-Life Stage Tests sowie Untersuchungen zu zellulären Veränderungen nach Belastungen mit hohen Konzentrationen von Genotoxinen zeigt, daß die mit dem Comet Assay abgebildeten Effekte im Bereich vielfältiger biologisch faßbarer Wirkungen liegen. Weitere Untersuchungen gerade zu ultrastrukturellen Veränderungen unter chronischer Niedrig-Dosis-Belastung wären allerdings wünschenswert.

Da mit diesem Test wie auch mit weiteren Genotoxizitätstests wie den Bakterientests (*Ames-*, *umu* Test), DNA-Reparaturtests wie dem UDS Test, anderen Strangbruchtests (*Alkalische Filterelution*, *DNA-Aufwindungstest*) sowie cytogenetischen Tests (*Chromosomenaberrationstest*, *Mikrokern Test*) nicht alle genotoxischen Substanzen in ausreichender Sensitivität nachgewiesen werden können, ist die Erstellung einer Testbatterie für das Umweltscreening unumgänglich. Im Rahmen einer Testbatterie ist der Comet Assay mit Fischzellen allerdings ein wichtiger und praktikabler Indikatorntest für den Nachweis von Genotoxizität im aquatischen Bereich.

Die Korrelation zwischen biologischen Wirkungen aus genotoxischen Belastungen wie der Mikronukleus-Induktion, drastischen Mißbildungen in der Embryonalentwicklung, Cytopathologie und ultrastrukturellen Veränderungen sowie Induktion von Apoptose mit verschiedenen Stufen der DNA-Fragmentierung im Comet Assay zeigen eine biologisch sinnvolle Abbildung in einer, wenn auch artifiziellen Einteilung der Comet Assay-Ergebnisse in Schädigungsintensitäten (Tab. 39):

Die untersuchten biologischen Wirkungsparameter gruppieren sich in der Regel im angezeigten mittleren Schädigungsbereich. Daraus lassen sich zwei Schlüsse ableiten:

- (1) der Comet Assay kann als Indikatorntest verwendet werden, da im Bereich der Nachweisgrenze für verschiedene Substanzen keine weiteren biologischen Effekte mit deutlicher Ausprägung beobachtet werden konnten;
- (2) die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse erscheint gering, da biologische Effekte mit Auswirkung bis auf der Populationsebene in einem mittleren Schädigungsbereich beobachtet werden konnten.

Die verschiedenen Teilaspekte der vorliegenden Studie haben gezeigt, daß ein positives genotoxisches Signal im Comet Assay mit Primärzellen aus Fischen über ausreichend biologische Bedeutung verfügt, um beim Einsatz im Umweltmonitoring den Einsatz weiterer biologischer Testsysteme zur Charakterisierung des Schadereignisses und gegebenenfalls chemischer Analytik im Rahmen einer Testbatterie zu rechtfertigen. Allerdings sollten auch schon auf der Stufe der reinen Indikation genotoxischer Potentiale in Umweltproben unterschiedliche Genotoxizitätstests zum Einsatz kommen, da sich mit keinem Einzeltest das komplexe Gemisch unterschiedlichster Stoffgruppen in Umweltproben hinsichtlich möglicher Gefährdungspotentiale ausreichend abbilden läßt. Eine Kombination mit einem sensitiven Bakterientest (*Ames-*, *umu* Test) wäre durchaus denkbar.

**Tab. 39:** Charakterisierung des Endpunktes DNA Fragmentierung aus dem Comet Assay mit Fischzellen unter Zuhilfenahme vergleichender Untersuchungen zur Genotoxizität

Kometen - Form	Korrespondierende Tail Moment-Werte *	<i>In vitro</i> -Belastung mit 4-NQO **	Ergebnisse aus weiteren Untersuchungen mit dem Comet Assay	Ergebnisse aus vergleichenden Untersuchungen zur Charakterisierung der Comet Assay-Befunde
	Kontrollen <b>0 - 1</b>	Kontrollzellen	→ Indirekt wirkende Monosubstanzen nach 2 h Exposition → Mehrzahl der Wasserproben	
	Nachweisgrenze <b>0.9 - 1.9</b>	2 µg/L 4-NQO	→ Nachweisgrenze Monosubstanzen → Positive Wasserproben → Freilandfänge	→ Ultrastrukturelle Veränderungen in Leber und Kieme der 4-NQO-Life Cycle-Fische *** → Mikrokerne in Freilandfischen
	Leichte DNA-Schäden <b>2 - 5</b>	20 µg/L 4-NQO	→ Maximale DNA-Fragmentierung in Zellen aus den Life-Cycle-Fischen	→ Populationsrelevante Effekte im 4-NQO – Life Cycle → Nachweis Mikrokerne <i>In vitro</i> nach 20 h Exposition mit Monosubstanzen (4-NQO, MNNG, BP)
	Deutliche DNA-Schäden <b>6 - 15</b>		→ Maximale DNA-Schädigung in <i>In vivo</i> -Untersuchungen	→ LC 50 im Early Life Stage mit 2-AAF, MNNG, 4-NQO, UV C
	Starke DNA-Schäden <b>16 - 45</b>	190 µg/L 4-NQO		→ Induktion apoptotischer Veränderungen in RTG 2 Zellen nach 120 h Exposition
	Sehr starke DNA-Schäden <b>&gt; 46</b>	1.900 µg/L 4-NQO	→ Maximale DNA-Schädigung im <i>In vitro</i> -Ansatz	→ Induktion apoptotischer Veränderungen in RTG 2 Zellen nach 72 h Exposition

\* Tail Moment – Intervalle aus den Ergebnissen der Monosubstanz – Untersuchungen

\*\* 4-NQO (*4-Nitroquinolin-N-oxid*) als Modellsubstanz ausgewählt, bei der Einteilung wurden die Ergebnisse mit den weiteren getesteten Genotoxinen 2-AAF (*2-Acetylaminofluoren*), BP (*Benzo[a]pyren*), DMNA (*Dimethylnitrosamin*), MNNG (*N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin*), NF (*Nitrofurantoin*) und UV C Licht berücksichtigt.

\*\*\* Zebraabrlinge aus dem Life-Cycle Experiment von Dipl.-Biol. M. Diekmann, AG Nagel, TU Dresden.

Weiterer Forschungsbedarf besteht im Vergleich von Umweltproben im *In vitro*-Ansatz mit *in situ*-exponierten Organismen aus dem überprüften Gebiet, denn die hier vorgestellten Experimente wiesen in Freilandtieren deutlich häufiger genotoxische Signale nach als in den *in vitro* untersuchten Wasserproben. Hier deuten sich, unabhängig vom verwendeten Testsystem, eventuell die Grenzen des *In vitro*-Ansatzes im Umweltmonitoring an, da denkbar ist, daß sich akkumulative und synergistische Effekte komplexer Stoffgemische im Kurzzeittest nur unvollständig nachweisen lassen. Auch eine Ausweitung vergleichender cytopathologischer und ultrastruktureller Untersuchungen von Zellen und Organismen unter genotoxischer Belastung erscheint angezeigt. Ebenso wären vergleichender Untersuchungen zum Einfluß genotoxischer Belastungen auf die genetische Integrität der belasteten Zellpopulationen sowie Organismen mit Hilfe moderner molekularbiologischer Methoden wünschenswert. Abschließend kann der Comet Assay mit Dauer- und Primärzellen aus Fischen als ein wertvolles Werkzeug im Rahmen einer Testbatterie zur Ermittlung genotoxischer Effekte in der aquatischen Umwelt empfohlen werden.



## Zusammenfassung

In den Untersuchungen zum Comet Assay mit Fischen und Fischzellen im Rahmen der vorliegenden Studie stand die Etablierung des Systems mit primären Hepatocyten und Kiemenzellen aus dem Zebraärbing (*Danio rerio*) sowie der Vergleich der genotoxischen Wirkung *in vivo* und *in vitro* im Vordergrund. Erste Grundlagenuntersuchungen zur Optimierung des Versuchs-Protokolls für den Einsatz mit Fischzellen wurden mit der Dauerzelllinie RTG-2 aus der Gonade der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) vorgenommen.

In der einer **ersten Phase** der Comet Assay-Untersuchungen wurden die Primärzellkulturen mit bekannten, unterschiedlich wirkenden Gentoxinen belastet. Hierbei wurde die optimale Expositionszeit von 20 h ermittelt; mit dieser ließen sich die weitaus meisten Gentoxine in nicht-cytotoxischen Konzentrationen nachweisen. Im Vergleich mit *In vivo*-Belastungen über 3 Tage erwies sich der *In vitro*-Ansatz als deutlich sensitiver. Allerdings konnten in Primärzellen aus Zebraärblingen, die in Life-Cycle Experimenten mit umweltrelevanten Konzentrationen bekannter Gentoxine belastet worden waren (M. Diekmann, TU Dresden) DNA Schäden mit dem Comet Assay nachgewiesen werden.

Mit dem erarbeiteten Versuchsprotokoll wurden in einer **zweiten Phase** über eineinhalb Jahre monatlich Wasserproben von verschiedenen Deutschen Flüssen untersucht. Erwartungsgemäß konnte nur in wenigen untersuchten Proben ein genotoxisches Signal nachgewiesen werden. Eine Untersuchung zum Einfluß des ausgewerteten Endpunkts zeigte deutliche Unterschiede auf: im Vergleich zum routinemäßig ausgewerteten Tail Moment wurden mit dem Endpunkt Tail Length (*Schweiflänge*) deutlich mehr Wasserproben positiv bewertet. Da bei der Verwendung der Schweiflänge ein wichtiges qualitatives Kriterium zur Einschätzung der Schadensintensität, nämlich die Häufigkeit der Interaktion Gentoxin-DNA über die Fluoreszenzintensität im Schweif, unberücksichtigt bleibt, wurde am Endpunkt Tail Moment festgehalten. Im Gegensatz zu den *In vitro*-Testungen ergaben Freilanduntersuchungen gehäuft leichte DNA Schäden sowie erhöhte Mikronukleus-Raten in Fischen aus den untersuchten Gewässern und zeigten hier die Grenzen von Kurzzeit-*In vitro*-Tests auf.

Nach Abschluß der Untersuchungen zur Eignung des Comet Assays als Routine-Screeningtest wurde in der **dritten Phase** dieser Studie der Versuch unternommen, mit vergleichenden Untersuchungen zu anderen biologischen Endpunkten erste Antworten zu biologischen Relevanz des an sich reparablen Endpunkts DNA-Strangbruch im Comet Assay mit Fischen und Fischzellen zu ermitteln:

Der Mikronukleus Test wurde mit RTG-2 Zellen etabliert und verschiedene Gentoxine getestet. Im Vergleich erwies sich der Comet Assay als sensitiver, erhöhte Mikrokernraten waren aber bereits in Konzentrationen nachweisbar, die im Comet Assay nur zu leichten DNA-Schäden führten.

Auch in Life-Cycle Untersuchungen mit genotoxischen Substanzen, in denen umweltrelevante Konzentrationen getestet werden, ist der Nachweis von Genotoxizität mit dem Comet Assay und Primärzellen möglich. Vergleichende ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten deutliche Anzeichen zellulären Stresses sowie cytopathologische Effekte.

In Early-Life-Stage Untersuchungen mit den im Comet Assay getesteten genotoxischen Substanzen wiesen die betroffenen Larven des Zebraärbings deutliche Ähnlichkeiten mit Entwicklungsmutanten aus genetischen Screenings auf. Die ermittelten LC 50-Konzentrationen entsprachen Testkonzentrationen im Comet Assay, die bereits deutliche DNA-Schäden induzierten. Hierbei ist dann die Entwicklung der Population auch schon massiv gestört, denn 50 % der sich entwickelnden Larven sterben ab oder sind so massiv mißgebildet, daß auch diese unter dem Aspekt der individuellen Fitness als nicht lebensfähig angesehen werden müssen.

Starke Schweifbildung mit deutlicher Reduktion des ‚Kometenkopfes‘ durch hohe Gentoxin-Konzentrationen nach *In vitro*-Kurzzeitbelastung konnten mit der Induktion apoptotischer Prozesse nach dreitägiger Exposition korreliert werden.

Der Vergleich mit weiteren Untersuchungen im Umfeld der Genotoxizität wie Mikrokern-Untersuchungen, vergleichende Freilanduntersuchungen, ultrastrukturelle Untersuchungen belasteter Organismen, Early-Life Stage Tests sowie Untersuchungen zu zellulären Veränderungen nach Belastungen mit hohen Konzentrationen von Gentoxinen zeigte, daß die mit dem Comet Assay abgebildeten Effekte im Bereich vielfältiger biologisch faßbarer Wirkungen liegen. Abschließend kann der Comet Assay mit Dauer- und Primärzellen aus Fischen als ein wertvolles Werkzeug im Rahmen einer Testbatterie zur Ermittlung genotoxischer Effekte in der aquatischen Umwelt empfohlen werden.



## 6 Literatur

- Abend, M., A. Rhein, K.P. Gilbertz und D. Van Beuningen (1996) Evaluation of a modified micronucleus assay, *Int J Radiat Biol*, 69, 717-727.
- Abt, G., H. Vaghef, E. Gebhart, C.V. Dahlgren und B. Hellman (1997) The role of N-acetylcysteine as a putative radioprotective agent on X-ray-induced DNA damage as evaluated by alkaline single-cell gel electrophoresis, *Mutat Res*, 384, 55-64.
- Ade, P., M.G. Banchelli Soldaini, M.G. Castelli, E. Chiesara, F. Clementi, R. Fanelli, E. Funari, G. Ignesti, A. Marabini, M. Orunesu, S. Palermo, R. Pirisino, A. Ramundo Orlando, R. Rizzi, V. Silano, A. Viarengo und L. Vittozzi (1984) Biochemical and morphological comparison of microsomal preparations from rat, quail, trout, mussel, and water flea, *Ecotoxicol Environ Saf*, 8, 423-46.
- Al Sabti, K. (1995) An *in vitro* binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish, *Mutat Res*, 335, 109-20.
- Al Sabti, K. und C.D. Metcalfe (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutat Res*, 343, 121-35.
- Alapetite, C., A. Benoit, E. Moustacchi und A. Sarasin (1997) The comet assay as a repair test for prenatal diagnosis of Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy, *J Invest Dermatol*, 108, 154-9.
- Alapetite, C., T. Wachter, E. Sage und E. Moustacchi (1996) Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and gamma-rays, *Int J Radiat Biol*, 69, 359-69.
- Albertini, S. und M. Kirsch-Volders (1997) Summary and conclusions on the MNT in vitro and implication on testing strategies, *Mutat Res*, 392, 183-185.
- Albertini, S., B. Miller, A.A. Chetelat und F. Locher (1997) Detailed data on in vitro MNT and in vitro CA: industrial experience, *Mutat Res*, 392, 187-208.
- Alf, A. (1991) Die biologisch-ökologische Zustandsentwicklung des Neckars seit 1970, *Heidelberger Geowiss Abh: 3. Neckarsymposium*, 48, 74-84.
- Alink, G.M., E.M.H. Frederix-Wolters, M.A. Van der Gaag, J.F.J. Van de Kerckhoff und C.L.M. Poels (1980) Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water, *Mutat Res*, 78, 369-374.
- Amlacher, E. (1992) *Taschenbuch der Fischkrankheiten: Grundlagen der Fischpathologie*, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- Anderson, D., T.W. Yu, J. Wright und C. Ioannides (1998) An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients, *Mutat Res*, 398, 151-61.
- Anderson, S.L. und G.C. Wild (1994) Linking genotoxic responses to reproductive success in ecotoxicology, *Environ Health Perspect*, 102, 9-12.
- Andreoli, C., P. Leopardi und R. Crebelli (1997) Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites, *Mutat Res*, 377, 95-104.
- Ankley, G.T., J.E. Tietge, D.L. Defoe, K.M. Jensen, G.W. Holcombe, E.J. Durhan und S.A. Diamond (1998) Effects of ultraviolet light and methoprene on survival and development of *Rana pipiens*, *Environ Tox Chem*, 17, 2530-2542.
- Applegate, L.A. und R.D. Ley (1988) Ultraviolet radiation-induced lethality and repair of pyrimidine dimers in fish embryos, *Mutat Res*, 198, 85-92.

- Arends, M.J., R.G. Morris und A.H. Wyllie (1990) Apoptosis. The role of the endonuclease, *American J Pathol*, 136, 593-608.
- Arlett, C.F., J.E. Lowe, S.A. Harcourt, A.P.W. Waugh, J. Cole, L. Roza, B.L. Diffey, T. Mori, O. Nikaido und M.H.L. Green (1993) Hypersensitivity of human lymphocytes to UV-B and solar irradiation, *Cancer Res*, 53, 609-614.
- Arnold, H. und T. Braunbeck (1994) Disulfoton as a major toxicant in the Rhine chemical spill at Basle 1986: acute and chronic studies with eel and rainbow trout, in: R. Müller and R. Lloyd (Eds.), *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*, Fishing News Books, Blackwell, pp. 75-87.
- Ashby, J. und B. Beije (1985) Concomitant observations of UDS in the liver and micronuclei in the bone marrow of rats exposed to cyclophosphamide or 2- acetylaminofluorene, *Mutat Res*, 150, 383-92.
- Ashby, J., H. Tinwell, P.A. Lefevre und M.A. Browne (1995) The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment, *Mutagenesis*, 10, 85-90.
- Babich, H., M.R. Palace und A. Stern (1993) Oxidative stress in fish cells: *in vitro* studies, *Arch Environ Contam Toxicol*, 24, 173-8.
- Babich, H., S.H. Goldstein und E. Borenfreund (1990) *In vitro* cyto- and genotoxicity of organomercurials to cells in culture, *Toxicol Letters*, 50, 143-149.
- Baltaci, V., N. Aygun, D. Akyol, A.E. Karakaya und S. Sardas (1998) Chromosomal aberrations and alkaline comet assay in families with habitual abortion [In Process Citation], *Mutat Res*, 417, 47-55.
- Banat, K., U. Förstner und G. Müller (1972) Schwermetalle in Sedimenten von Donau, Rhein, Ems, Weser und Elbe im Bereich der Bundesrepublik Deutschland, *Naturwissenschaften*, 59, 525-528.
- Barcelo, S., K. Mace, A.M.A. Pfeifer und J.K. Chipman (1998) Production of DNA strand breaks by N-nitrosodimethylamine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in THLE cells by expressing human CYP isoenzymes and inhibition of sulforaphane, *Mutat Res*, 402, 111-120.
- Barker, D.E. (1994) Anomalies in sculpins (*Myoxocephalus* spp.) sampled near a pulp and paper mill, *Arch Environ Contam Toxicol*, 26, 491-496.
- Basak, J. und S.N. Chatterjee (1994) Induction of adaptive response by nitrofurantoin against oxidative DNA damage in some bacterial cells, *Mutat Res*, 321, 127-32.
- Bauer, E., R.D. Recknagel, U. Fiedler, L. Wollweber, C. Bock und K.O. Greulich (1998) The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square ( $\chi^2$ ) not a gaussian distribution, *Mutat Res*, 398, 101-10.
- Belpaeme, K., K. Delbeke, L. Zhu und M. Kirsch-Volders (1996) Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay., *Mutagenesis*, 11, 485-492.
- Belpaeme, K., K. Cooreman und M. Kirsch-Volders (1997) Use of the comet assay and the micronucleus test in fish for biomonitoring of the aquatic environment, *Mutat Res*, 379, 130.
- Belpaeme, K., K. Cooreman und M. Kirsch-Volders (1998) Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish, *Mutat Res*, 415, 167-84.
- Bignami, M., M. Terlizese, A. Zijno, A. Calcagnile, G. Frosina, A. Abbondandolo und E. Dogliotti (1987) Cytotoxicity, mutations and SCEs induced by methylating agents are reduced in CHO cells expressing an active mammalian O6-methylguanine- DNA methyltransferase gene, *Carcinogenesis*, 8, 1417-21.

- Bihari, N., R. Batel und R.K. Zahn (1992) Fractionation of DNA from marine invertebrate (*Maja crispata*, *Mytilus galloprovincialis*) haemolymph by alkaline elution, *Comp Biochem Physiol*, 102B, 419-424.
- Binder, R.L. und J.J. Stegeman (1984) Microsomal electron transport and xenobiotic monooxygenase activities during the embryonic period of development in the killifish, *Fundulus heteroclitus*, *Toxicol Appl Pharmacol*, 73, 432-443.
- Binkova, B., J. Lewtas, I. Miskowa, P. Rössner, M. Cerna, G. Mrackova, K. Peterkova, J. Mumford, S. Meyer und R. Sram (1996) Biomarker studies in Northern Bohemia, *Environ Health Perspect*, 104, 591-597.
- Bisgaard, H.C., P. Nagy, E. Santoni-Rugiu und S.S. Thorgeirsson (1996) Proliferation, apoptosis, and induction of hepatic transcription factors are characteristics of the early response of biliary epithelial (oval) cells to chemical carcinogens, *Hepatology*, 23, 62-70.
- Black, J.J. und P.C. Baumann (1991) Carcinogens and Cancers in Freshwater Fishes, *Environ Health Perspect*, 90, 27-33.
- Blankenship, L.J., D.L. Carlisle, J.P. Wise, Sr., J.M. Orenstein, L.E. Dye III und S.R. Patierno (1997) Induction of apoptotic cell death by particulate lead chromate: differential effects of vitamin C and E on genotoxicity and survival, *Toxicol Appl Pharmacol*, 146, 270-280.
- Böcker, W., T. Bauch, W.U. Müller und C. Streffer (1997) Image analysis of comet assay measurements, *Int J Radiat Biol*. 1997 Oct, 72, 449-60 ISSN: 0955-3002.
- Bol, S.A., H. van Steeg, J.G. Jansen, C. Van Oostrom, A. de Vries, A.J. de Groot, A.D. Tate, H. Vrieling, A.A. van Zeeland und L.H. Mullenders (1998) Elevated frequencies of benzo(a)pyrene-induced Hprt mutations in internal tissue of XPA-deficient mice, *Cancer Res*, 58, 2850-6.
- Bolognesi, C., E. Landini, P. Roggieri, R. Fabbri und A. Viarengo (1999) Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies, *Environ Mol Mutagen*, 33, 287-292.
- Bone, Q. und N.B. Marshall (1985) *Biologie der Fische*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Brand, M., C.-P. Heisenberg, R.M. Warga, F. Pelegri, R.O. Karlstrom, D. Beuchle, A. Picker, Y.-J. Jiang, M. Furutani-Seiki, F. J. M. van Eeden, M. Granato, P. Haffter, M. Hammerschmidt, D.A. Kane, R.N. Kelsh, M.C. Mullins, J. Odenthal und C. Nüsslein-Volhard (1996) Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis, *Dev*, 123, 129-142.
- Braunbeck, T. (1989) *Cytopathologische Veränderungen in der Fischleber durch Umweltchemikalien: Beiträge zur Ökotoxikologie*, PhD-thesis, Zoologie I, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, pp. 329.
- Braunbeck, T., P. Burkhardt-Holm und V. Storch (1990) Liver pathology in eels (*Anguilla anguilla*, L.) from the Rhine river exposed to the chemical spill at Basle in November 1986, *Limnologie aktuell*, 1, 371-392.
- Braunbeck, T., G. Görge, V. Storch und R. Nagel (1990) Hepatic steatosis in zebrafish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to gamma-hexachlorocyclohexane, *Ecotox Environ Saf*, 19, 355-374.
- Braunbeck, T. und A. Völkl (1991) Induction of biotransformation in the liver of eel (*Anguilla anguilla* L.) by sublethal exposure to dinitro-o-cresol: an ultrastructural and biochemical study, *Ecotox Environ Saf*, 21, 109-127.
- Braunbeck, T. (1992) *Umweltcytologie - zelluläre Reaktionen zum Nachweis einer Schadstoffbelastung von Organismen*, Ruperto Carola, 44.

- Braunbeck, T. und V. Storch (1992) Senescence of hepatocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in primary culture - an ultrastructural study, *Protoplasma*, 170, 138-159.
- Braunbeck, T. und A. Völkl (1993) Toxicant-induced cytological alterations in fish liver as biomarkers of environmental pollution? A case-study on hepatocellular effects of dinitro-*o*-cresol in golden ide (*Leuciscus idus melanotus*), in: T. Braunbeck, W. Hanke and H. Segner (Eds.), *Fish in ecotoxicology and ecophysiology*, VCH, Weinheim, pp. 55-80.
- Braunbeck, T., T. Berbner, U. Bieberstein, L. Erdinger, V. Geier, H. Hoolert, E. Leist, N. Rahman und J. Zipperle (1995) Toxikologische und ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung verschiedener Kompartimente in Fließgewässern mit Hilfe eines mehrstufigen Prüfsystems mit Zellkulturen aus Fischen., *Proceedings zum 3. Statuskolloquium des Projektes "Angewandte Oekologie"*, PAÖ, pp. 345-358.
- Braunbeck, T. (1998) Cytological alterations in fish hepatocytes following *in vivo* and *in vitro* sublethal exposure to xenobiotics - structural biomarkers of environmental pollution, in: T. Braunbeck, D.E. Hinton and B. Streit (Eds.), *Fish ecotoxicology*, Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, pp. 61-140.
- Brezden, C.B., R.A. McClelland und A.M. Rauth (1997) Apoptosis and 1-methyl-2-nitroimidazole toxicity in CHO cells., *Brit J Cancer*, 76, 180-188.
- Briehl, M.M., A.F. Baker, L.M. Siemankowski und J. Morreale (1997) Modulation of antioxidant defenses during apoptosis, *Oncol Res*, 9, 281-285.
- Bruggeman, D.J., J.A. Bantle and C. Goad (1998) Linking teratogenesis, growth, and DNA photodamage to artificial ultraviolet B radiation in *Xenopus laevis* larvae, *Environ Tox Chem*, 17, 2114-2121.
- Buchmann, A., R. Wannemacher, E. Kulzer, D.R. Buhler und K.W. Bock (1993) Immunohistochemical localization of the cytochrome P450 Isozymes LMC2 and LM4B (P4501A1) in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin- treated zebrafish (*Brachydanio rerio*), *Toxicol Appl Pharmacol*, 123, 160-169.
- Burgeot, T., S. Woll und F. Galgani (1996) Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French coasts, *Mar Pollut Bull*, 32, 39-46.
- Burkhardt-Holm, P., T. Braunbeck und V. Storch (1990) Auswirkung der beim Sandoz-Unfall 1986 in den Rhein gelangten Chemikalien auf die Ultrastruktur des Darmes von Aalen., in: R. Kinzelbach and G. Friedrich (Eds.), *Biologie des Rheins.*, pp. 393-404.
- Burkhardt-Holm, P., Y. Oulmi, A. Schroeder, V. Storch und T. Braunbeck (1999) Toxicity of 4-chloroaniline in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*): II. Cytopathology and regeneration of liver and gills after prolonged exposure to waterborne 4-chloroaniline, *Arch Environ Contam Toxicol*, 37, 85-102.
- Cameron, P., J. Berg und H. von Westernhagen (1996) Biological effect monitoring of the North sea employing fish embryological data, *Environ Monitor Assess*, 40, 107-124.
- Canova, S., P. Degan, L.D. Peters, D.R. Livingstone, R. Voltan und P. Venier (1998) Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene, *Mutat Res*, 399, 17-30.
- Catchpole, D.R. und B.W. Stewart (1995) Formation of apoptotic bodies is associated with internucleosomal DNA fragmentation during drug-induced apoptosis, *Experimental Cell Research*, 216, 169-177.
- Cavalieri, E.L., E.G. Rogan, P.D. Devanesan, P. Cremonesi, R.L. Cerny, M.L. Gross und Bodell, W.J. (1990) Binding of benzo[a]pyrene to DNA by cytochrome P-450 catalyzed one-electron oxidation in rat liver microsomes and nuclei., *Biochemistry*, 29, 4820-4827.

- Cejna, M., G. Fritsch, D. Printz, R. Schulte-Hermann und W. Bursch (1994) Kinetics of apoptosis and secondary necrosis in cultured rat thymocytes and S.49 mouse lymphoma and CEM human leukemia cells, *Biochem Cell Biol*, 72, 677-685.
- Chen, J.-N. et al. (1996) Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish, *Dev*, 123, 293-302.
- Claxton, L.D., V.S. Houk und T.J. Hughes (1998) Genotoxicity of industrial wastes and effluents, *Mutat Res*, 410, 237-43.
- Clements, C., S. Ralph und M. Petras (1997) Genotoxicity of selected herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay, *Environ Mol Mutagen*, 29, 277-288.
- Coccia, P., M. Salmona, L. Diomedea, C. L., L. Mariani and M. Romano (1988) Liver DNA alkylation after a single carcinogenic dose of dimethylnitrosamine to newborn and adult CFW Swiss Mice, *Chem.-Biol. Interactions*, 68, 259-271.
- Collodi, P., Y. Kamei, T. Ernst, C. Miranda, D.R. Buhler und D.W. Barnes (1992) Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues, *Cell Biol Toxicol*, 8, 43-61.
- Collodi, P., C.L. Miranda, X. Zhao, D.R. Buhler und D.W. Barnes (1994) Induction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) P450 *in vivo* and in cell culture, *Xenobiotica*, 24, 487-493.
- Cotter, T.G. und M. Al Rubeai (1995) Cell death (apoptosis) in cell culture systems, *Trends in Biotechnology*, 13, 150-155.
- Couch, J.A. (1991) Spongiosis hepatitis: chemical induction, pathogenesis and possible neoplastic fate in a teleost fish model, *Tox Pathol*, 19, 237-250.
- Dave, G. and R.Q. Xiu (1991) Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 21, 126-134.
- De Flora, S., L. Viganò, F. D'Agostini, A. Camoirano, M. Bagnasco, C. Bennicelli, F. Melodia und A. Arillo (1993) Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed *in situ* to polluted river water, *Mutat Res*, 319, 167-177.
- De Flora, S., M. Bagnasco und P. Zanicchi (1991) Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea, *Mutat Res*, 258, 285-320.
- De Flora, S., P. Zanicchi, C. Bennicelli und A. Arillo (1982) Influence of liver S-9 preparations from rats and rainbow trout on the activity of four mutagens, *Toxicol Lett*, 10, 345-9.
- De Stoppelaar, J.M., B. de Roos, G.R. Mohn und B. Hoebee (1997) Analysis of DES-induced micronuclei in binucleated rat fibroblasts: comparison between FISH with arat satellite I probe and immunocytochemical staining with CREST serum, *Mutat Res*, 392, 139-149.
- Den Besten, P.J., C.A. Schmidt, M. Ohm, M.M. Ruys, J.W. van Berghem und C. van den Guchte (1995) Sediment quality assessment in the delta of rivers Rhine and Meuse based on field observations, bioassays, and food chain implications, *J Aquat Ecosys Health*, 4, 257-270.
- Den Engelse, L., B.G.J. Froot, R.-J. Brij und A.D. Tate (1983) The induction of chromosomal damage in rat hepatocytes and lymphocytes: II. Alkylation damage and repair of rat-liver DNA after diethylnitrosamine, dimethylnitrosamine, and ethylmethanesulphonate in relation to clastogenic effects., *Mutat Res*, 107, 153-166.
- Devaux, A., M. Pesonen und G. Monod (1997) Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes., *Toxicol in vitro*, 11, 71-79.
- Devaux, A. (1998) Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*), *Mar Environ Res*, 46, 257-262.

- Deventer, K. (1996) Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *Brachydanio rerio* by means of single cell gel electrophoresis., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56, 911-918.
- Dhillon, V.S. und I.K. Dhillon (1995) Genotoxicity evaluation of estradiol, *Mutat Res*, 345, 87-95.
- Di Guiseppi, J. und I. Fridovich (1990) The toxicology of molecular oxygen, *CRC Crit Rev Toxicol*, 12, 315-342.
- Diekmann, M., V. Hultsch, J. Máthé, A. Seitz, P. Waldmann, R.K. Zahn, M. Conrad, J. Markl und R. Nagel (1998) Ökotoxikologische Bewertung von genotoxischen Effekten - dargestellt am Beispiel von Fischen, Institut für Hydrobiologie, Dresden, pp. 112.
- Ditton, H.J. und L. Erdinger (1994) Untersuchung mutagener und genotoxischer Umwelteinflüsse, Teil 1., *Bioforum*, 17, 350-355.
- Dizdaroglu, M. (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin, *Mutat Res*, 275, 331-342.
- Djomo, J.E., V. Ferrier, L. Gauthier, C. Zoll-Moreux und J. Marty (1995) Amphibian micronucleus test *in vivo*: evaluation of the genotoxicity of some major polycyclic aromatic hydrocarbons found in a crude oil, *Mutagenesis*, 10, 223-226.
- Driever, W. et. al. (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish, *Dev*, 123, 37-46.
- Durand, R.E. und P.L. Olive (1997) The comet assay: Alternatives for quantitative analysis, *Mutat Res*, 379, 130-131.
- Dutta, H.M., C.R. Richmonds und T. Zeno (1993) Effects of diazinon on the gills of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*, *J Environ Path Toxicol Oncol*, 12, 219-227.
- Eckl, P.M. und I. Raffelsberger (1997) The primary rat hepatocyte micronucleus assay: general features, *Mutat Res*, 392, 117-124.
- Eisenbrand, G. und W. Köhl (1994) *N*-Nitrosoverbindungen, in: H. Marquardt und S.G. Schäfer (Eds.), *Lehrbuch der Toxikologie*, B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, pp. 481-491.
- Ellahuene, M., F. Dalessandro, P. Gonzalez-Hormazabal, M. Farfán, M. Orelana-Valdebenito und L.P. Pérez-Alzola (1997) Comparison between the alkaline single-cell gel (comet) assay and the micronucleus test in mice treated with different doses of methyl methanesulfonate, *Mutation Research*, 379, 132.
- Elonen, G.E., R.L. Spehar, G.W. Holcombe, R.D. Jonson, J.D. Fernandez, R.J. Erickson, J.E. Tietge und P.M. Cook (1998) Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to seven freshwater fish species during early life-stage development, *Environ Tox Chem*, 17, 472-483.
- Erbes, M., A. Weßler und U. Obst (1997) The use of the comet assay in an unicellular green alga for the measurement of genotoxic potential and masking effects of humic substances, *Mutat Res*, 379, 132.
- Erbes, M., A. Weßler, U. Obst und A. Wild (1997) Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis, *Environ Mol Mutagen*, 30, 448-458.
- Ericson, G., E. Noaksson und L. Balk (1999) DNA adduct formation and persistence in liver and extrahepatic tissues of northern pike (*Esox lucius*) following oral exposure to benzo[a]pyrene, benzo[k]fluoranthene and 7H-dibenzo[c,g]carbazole, *Mutat Res*, 427, 135-145.
- Fadlallah, S., M. Lachapelle, K. Krzystyniak, C. Cooper, F. Denizeau, F. Guertin und M. Fournier (1994) O6-methylguanine-DNA adducts in rat lymphocytes after *in vivo* exposure to *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), *Int. J. Immunopharmac.*, 16, 583-591.

- Fahrig, R. (1994) Genotoxizität, in: H. Marquardt and S.G. Schäfer (Eds.), Lehrbuch der Toxikologie, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, pp. 106-123.
- Fairbairn, D.W., P.L. Olive und K.L. O'Neill (1995) The comet assay: a comprehensive review, *Mutat Res*, 339, 37-59.
- Falter, R. und H.F. Schöler (1994) Determination of methyl-, ethyl-, phenyl- and total mercury in Neckar river fish, *Chemosphere*, 29, 1333-1338.
- Fenech, M., G. Perepetskaya und L. Mikhalevich (1997) A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations - experiences from the Chernobyl catastrophe, *Environ Mol Mutagen*, 30, 112-118.
- Förstner, U. und G. Müller (1974) Schwermetalle in Flüssen und Seen als Ausdruck der Umweltverschmutzung, .
- Freeman, S.T., A.D. Blackett, D.C. Monteleone, S. R.B., B.M. Sutherland und J.C. Sutherland (1986) Quantitation of radiation-, chemical-, or enzyme-induced single strand breaks in nonradioactive DNA by alkaline gel electrophoresis: application to pyrimidine dimers, *Anal Biochem*, 158, 119-129.
- Friccius, M., C. Schulte, U. Ensenbach, A. Seel and R. Nagel (1995) Der Embryotest mit dem Zebraäbrbling - eine neue Möglichkeit, *Vom Wasser*, 84, 407-418.
- Friedberg, E.C., G.C. Walker und W. Siede (1995) DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington, D.C, pp 698.
- Friedrich, G. (1990) Das Plankton als Indikator des Rheins, *Limnologie aktuell*, 1, 181-187.
- Gagné, F. und C. Blaise (1995) Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes, *Environ Toxicol Water Qual*, 10, 217-229.
- Galiègue-Zouitina, S., B. Bailleul und M.-H. Loucheux-Lefebvre (1985) Adducts from *in vivo* action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide in rats and from *in vitro* reaction of 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide with DNA and polynucleotides., *Cancer Res*, 45, 520-525.
- Gauthier, J.M., H. Dubeau und E. Rassart (1999) Induction of micronuclei *in vitro* by organochlorine compounds in beluga whale skin fibroblasts, *Mutat Res*, 439, 87-95.
- Gauthier, L. (1996) The amphibian micronucleus test, a model for *in vivo* monitoring of genotoxic aquatic pollution, *Alytes (Paris)*, 14, 53-84.
- Gedik, C.M., S.W.B. Ewen and A.R. Collins (1992) Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 313-320.
- Geier, V. (1994) Das Modellvorhaben "Flachwasserzone" im Hinblick auf die Förderung der limnischen und terrestrischen Fauna, Msc-thesis, Zoology I, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, pp. 202.
- Gerundo, N. et .al. (1991) Pathological effects of repeated doses of malachite green: a preliminary study, *J Fish Disease*, 14, 521-532.
- Gichner, T. and Plewa M.J. (1998) Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants, *Mutat Res*, 401, 143-152.
- Gichner, T., O. Ptacek, D.A. Stavreva and M.J. Plewa (1999) Comparison of DNA damage in plants as measured by single cell gel electrophoresis and somatic leaf mutations induced by monofunctional alkylating agents, *Environ Mol Mutagen*, 33, 279-286.
- Glatt, H., I. Bartsch, A. Czich, A. Seidel und C. N. Falany, (1995) Salmonella strains and mammalian cells genetically engineered for expression of sulfotransferases, *Toxicol Lett*, 82/83, 829-834.
- Glatt, H., I. Bartsch, S. Christoph, M. W. Coughtrie, C. N. Falany, M. Hagen, R. Landsiedel, U. Pabel, D. H. Phillips, A. Seidel und Y. Yamazoe, (1998) Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems, *Chem Biol Interact*, 109, 195-219.

- Godard, T., L. Poulain, E. Deslandes, C. Vigneux, P. Lebailly, F. Duigou, C. Staedel, A. Ben Youssef, J.M. Poul, F. Sichel und P. Gauduchon (1997) Detection of staurosporine- and etoposide-induced apoptosis on CHO cells with the comet assay, *Mutat Res*, 379, 130.
- Goksoyr, A., T.S. Solberg und B. Serigstad (1991) Immunochemical detection of cytochrome P4501A1 induction in cod larvae and juveniles exposed to a water soluble fraction of North Sea crude oil, *Mar Poll Bull*, 22, 122-127.
- Goksoyr, A. und L. Förlin (1992) The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring, *Aquat Toxicol*, 22, 287-311.
- Goksoyr, A. und A.-M. Husoy (1998) Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish, in: T. Braunbeck, D.E. Hinton and B. Streit (Eds.), *Fish ecotoxicology*, Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, pp. 165-202.
- Goldspink, C.R. (1979) The population density, growth rate and production of roach *Rutilus rutilus* (L.) in Tjeukemer, The Netherlands, *J Fish Biol*, 15, 473-498.
- Gopalakrishna, P. und A. Khar (1995) Comet assay to measure DNA damage in apoptotic cells., *J. Biochem. Biophys. Meth*, 30, 69-73.
- Grant, W.F. (1994) The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens., *Mutat Res*, 310, 175-185.
- Green, M.H.L., J.E. Lowe, S.A. Harcourt, P. Akinluyi, T. Rowe, J. Cole, A.V. Anstey und C.F. Arlett (1992) UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: A potential diagnostic technique., *Mutat Res, DNA repair*, 273, 137-144.
- Griffith, J. und W.B. Riggan (1989) Cancer mortality in U.S. counties with hazardous waste sites and ground water pollution, *Arch Environ Health*, 44, 69-74.
- Gupta, R.C. (1996) <sup>32</sup>P-Postlabelling for detection of DNA adducts, in Pfeifer, G.P. (ed.) *Technologies for detection of DNA damage and mutations*, Plenum Press, New York, pp. 441.
- Haffter, P. et. al. (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*, *Dev*, 123, 1-36.
- Hagen, U. (1994) Strahlungen, in: H. Marquardt and S.G. Schäfer (Eds.), *Lehrbuch der Toxikologie*, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, pp. 630-649.
- Haggerty, H.G. und M.P. Holsapple (1990) Role of metabolism in DMN-induced immunosuppression., *Toxicol*, 63, 3-6.
- Haiber, G. und H.F. Schöler (1994) Identification of di-o,o'-Cl- mono-o-Cl and non-o-Cl-substituted PCB congeners in Neckar river fish, *Chemosphere*, 28, 1913-1919.
- Harms-Ringdahl, M., P. Nicotera und I.R. Radford (1996) Radiation induced apoptosis., *Mutation Research*, 366, 171-179.
- Harris, C.C. (1993) p53: At the crossroad of molecular carcinogenesis and risk assessment., *Science*, 262, 1980-1981.
- Harris, C.C. (1996) p53 tumor suppressor gene: At the Crossroads of Molecular Carcinogenesis, Molecular Epidemiology, and Cancer Risk Assessment., *Environ Health Perspect*, 104, 435-439.
- Hartmann, A. und G. Speit (1995) Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchange., *Mutat Res*, 346, 49-56.
- Hartmann, A., H. Fender und G. Speit (1998) Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the comet (single-cell gel) assay, *Environ Mol Mutagen*, 32, 17-24.
- Harvey, J.S. und J.M. Parry (1998) The analysis of DNA adduct formation, removal and persistence in the common mussel *Mytilus edulis* exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide, *Mutat Res*, 399, 31-42.

- Harvey, J.S., B.P. Lyons, T.S. Page, C. Steward und J.M. Parry (1999) An assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in selected invertebrate and vertebrate species, *Mutat Res*, 441, 103-114.
- Hasspieler, B.M., G.D. Haffner und K. Adeli (1997) Roles of DT diaphorase in the genotoxicity of nitroaromatic compounds in human and fish cell lines, *J Toxicol Environ Health*, 52, 137-48.
- Hayashi, M., T. Ueda, K. Uyeno, K. Wada, N. Kinoshita, K. Saotome, N. Tanaka, A. Takai, Y.F. Sasaki, N. Asano, T. Sofuni und Y. Ojima (1998) Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms, *Mutat Res*, 399, 125-33.
- Helbig, R., A. Sokolowski und H.G. Miltenburger (1996) UDS-Test und Comet Assay mit Fisch- und Säugetierzelllinien, BMBF: Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächengewässer, Darmstadt, pp. 19.
- Helma, C., P. Eckl, E. Gottmann, F. Kassie, W. Rodinger, H. Steinkellner, C. Windpassinger, R. Schulte-Hermann und S. Knasmüller (1998) Genotoxic and ecotoxic effects of groundwaters and their relation to routinely measured chemical parameters, *Environ Sci Technol*, 32, 1799-1805.
- Helma, C., S. Knasmüller und R. Schulte-Hermann (1994) Die Belastung von Gewässern mit genotoxischen Substanzen: 1. Methoden zur Prüfung der Genotoxizität, *Z. Umweltchem. Ökotox.*, 6, 277-288.
- Hendriks, A.J., H. Pieters und J. De Boer (1998) Accumulation of metals, polycyclic (halogenated) aromatic hydrocarbons, and biocides in zebra mussel and eel from the Rhine and Meuse rivers, *Environ Tox Chem*, 17, 1885-1898.
- Hermine, T., N.J. Jones und J.M. Parry (1997) Comparative induction of micronuclei in repair-deficient and -proficient Chinese hamster cell lines following clastogen or aneugen exposures, *Mutat Res*, 392, 151-163.
- Hofer, R. und R. Lackner (1995) *Fischtoxikologie - Theorie und Praxis*, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- Hoffmann, D. und E.L. Wynder (1994) Aktives und passives Rauchen, in: H. Marquardt and S.G. Schäfer (Eds.), *Lehrbuch der Toxikologie*, B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, pp. 589-605.
- Hollstein, M., G. Moeckel, M. Hergenroth, B. Spiegelhalder, M. Keil, G. Werle-Schneider, H. Bartsch und J. Brickmann. (1998) On the origins of tumor mutations in cancer genes: insights from the p53 gene, *Mutat Res*, 405, 145-154.
- Holme, J.A., U. Haddeland, K. Haug und G. Brunborg (1999) DNA damage induced by the drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone (MX) in mammalian cells *in vitro* and in mice, *Mutat Res*, 441, 145-153.
- Hong, J. und C.S. Yang (1985) The nature of microsomal *N*-nitrosodimethylamine demethylase and its role in carcinogen activation, *Carcinogenesis*, 6, 1805-1809.
- Hooftman, R.N. (1981) The induction of chromosome aberrations in *Notobranchius rachowi* (Pisces: Cyprinodontidae) after treatment with ethyl methanesulfonate or benzo[a]pyrene, *Mutat Res*, 91, 347-352.
- Hooftman, R.N. und G.J. Vink (1981) Cytogenetic effects on the eastern mudminnow, *Umbra pygmaea*, exposed to ethyl methanesulfonate, benzo[a]pyrene and river water, *Ecotoxicol Environ Saf*, 5, 261-269.
- Hose, J.E. und E.D. Brown (1998) Field applications of the piscine anaphase aberration test: lessons from the Exxon Valdez oil spill, *Mutat Res*, 399, 167-178.
- Hsu, T. und F.-Y. Deng (1996) Studies on the susceptibility of various organs of zebrafish (*Brachydanio rerio*) to benzo[a]pyrene-induced DNA adduct formation, *Chemosphere*, 33, 1975-1980.

- Ichikawa, S. (1992) *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its response to ionizing radiations and chemical mutagens, and some synergistic effects found, *Mutat Res*, 270, 3-22.
- IKSR (1999) Internationale Kommission zum Schutz des Rheins vor Verschmutzung, <http://www.iksr.org/iksr/welcome.html>.
- Ishikawa, T., P. Masahito und S. Takayama (1984) Usefulness of the medaka, *Oryzias latipes*, as a test animal: DNA repair processes in medaka exposed to chemical carcinogens, *Natl Cancer Inst Monogr*, 65, 35-43.
- James, M.O., W.E. Hawkins und W.W. Walker (1994) Phase 1 and phase 2 biotransformation and carcinogenicity in medaka and guppy, *Aquat Toxicol*, 28, 79-95.
- Jatzek, H.-J. (1990) Beitrag zur Struktur und vergleichende Untersuchungen des Makrozoobenthos des Rheins aus den Jahren 1980, 1982 und 1987 im Bereich der BASF AG, *Limnologie aktuell*, 1, 217.
- Jones, K.H. und J.A. Senft (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide, *J Histochem Cytochem*, 33, 77-79.
- Jurado, J., E. Alejandro-Duran und C. Pueyo (1994) Mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium* strains possessing both the His reversion and Ara forward mutation systems and different levels of classical nitroreductase or O-acetyltransferase activities, *Environ Mol Mutagen*, 23, 286-93.
- Kane, D.A. et al. (1996) The zebrafish early arrest mutants, *Dev*, 123, 57-66.
- Karnovsky, M.J. (1971) Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy, *J Cell Biol*, 51, 146A.
- Kasamatsu, T., K. Kohda und Y. Kawazoe (1996) Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay, *Mutat Res*, 369, 1-6.
- Kastan, M.B. (1996) Signalling to p53: where does it all start?, *BioEssays*, 18, 617-619.
- Keane, B., M.K. Smith und S.H. Rogstad (1998) Genetic variation in red raspberry (*Rubus idaeus* L.; Rosaceae) from sites differing in organic pollutants compared with synthetic tandem repeat DNA probes, *Environ Tox Chem*, 17, 2027-2034.
- Kerklaan, P., S. Bouter und G. Mohn (1983) Activation of nitrosamines and other carcinogens by mouse-liver S9, mouse hepatocytes and in the host-mediated assay produces different mutagenic responses in *Salmonella* TA1535, *Mutat Res*, 110, 9-22.
- Khudoley, V.V. (1984) Use of aquarium fish, *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*, as test species for evaluation of nitrosamine carcinogenicity, *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 65, 64-70.
- King, C.M. (1974) Mechanisms of reaction, tissue distribution and inhibition of arylhydroxamic acid acyltransferase, *Cancer Res*, 34, 1503-1515.
- Klaude, M., S. Eriksson, J. Nygren und G. Ahnström (1996) The comet assay: mechanisms and technical considerations, *Mutat Res*, 363, 89-96.
- Klein, W. and R. Debus (1994) Ökotoxikologie, in: H. Marquardt and S.G. Schäfer (Eds.), *Lehrbuch der Toxikologie*, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, pp. 748-757.
- Knasmüller, S. et al. (1998) Investigations on genotoxic effects of groundwater from the Mittendorfer Senke and from the vicinity of Wiener Neustadt, *Wien Klin Wochenschr*, 110, 824-833.
- Kohlpoth, M., B. Rusche und M. Nüsse (1999) Flow cytometric measurement of micronuclei in a permanent fish cell line as a possible screening test for the genotoxicity of industrial waste waters, *Mutagenesis*, 14, 397-402.
- Koppen, G. und K.J. Angelis (1998) Repair of X-ray induced DNA damage measured by the comet assay in roots of *Vicia faba*, *Environ Mol Mutagen*, 32, 281-285.

- Koppen, G. und L. Verschaeve (1996) The alkaline comet assay test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells., *Mutat Res*, 360, 193-200.
- Kosz Vnenchak, M. und K. Rokosz (1997) The "comet" assay for detection of potential genotoxicity of polluted water, *Folia Biol Krakow*. 1997, 45, 153-156.
- Krause, M.K., L.D. Rhodes und R.J. Van Beneden (1997) Cloning of the p53 suppressor gene from the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and evaluation of the mutational hotspots in MNNG-exposed fish, *Gene*, 189, 101-106.
- Kriek, E. (1992) Fifty years of research on N-acetyl-2-aminofluorene, one of the most versatile compounds in experimental cancer research, *J Cancer Res Clin Oncol*, 118, 481-9.
- Kroeger-Koepke, M.B. et al. (1981)  $\alpha$ -hydroxylation pathway in the *In vitro*-metabolism of carcinogenic nitrosamines: *N*-Nitrosodimethylamine and *N*-nitroso-*N*-methylaniline, *Proc Natl Acad Sci USA*, 78, 6489-6493.
- Kruszewski, M., M. Wojewodzka, T. Iwanenko, A.R. Collins und I. Szumiel (1998) Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. II. Base damage, *Mutat Res*, 416, 37-57.
- Kruszewsky, M., M.H.L. Green, J.E. Lowe und I. Szumiel (1994) DNA strand breakage, cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4°C and 37°C in L5178Y sublines, *Mutat Res*, 308, 233-241.
- Kuschinski, G. und H. Lüllmann (1987) *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Georg Thieme Verlag, New York, Stuttgart.
- Lacroix, G.L., R.H. Peterson, C.S. Belfry und D.J. Martin-Robichaud (1993) Aluminium dynamics on gills of Atlantic salmon fry in the presence of citrate and effects of the integrity of gill structures, *Aquat Tox*, 27, 373-402.
- Lambolez, L., P. Vasseur, J.F. Ferard und T. Gisbert (1994) The environmental risks of industrial waste disposal: an experimental approach including acute and chronic toxicity studies, *Ecotoxicol Environ Saf*, 28, 317-328.
- Lane, D.P. (1992) p53, guardian of the genome, *Nature*, 358, 15-16.
- Le Curieux, F., D. Marzin und F. Erb (1994) Study of the genotoxic activity of five chlorinated propanones using the SOS chromotest, the Ames fluctuation test and the newt micronucleus test, *Mutat Res*, 341, 1-15.
- Le Hir, M., V. Herzog und H.D. Fahimi (1979) Cytochemical detections of catalase with 3', 3'-diaminobenzidine. A quantitative reinvestigation of the optimal conditions, *Histochemistry*, 64, 51-66.
- Lehmann, J., D. Pollet, S. Peker, V. Steinkraus und U. Hoppe (1998) Kinetics of DNA strand breaks and protection by antioxidants in UVA- or UVB-irradiated HaCaT keratinocytes using the single cell gel electrophoresis assay, *Mutat Res*, 407, 97-108.
- Lehmann, M. (1989) Entwicklung und Erprobung eines aquatischen *in vivo*-Mutagenitätstests mit *Xenopus laevis*, Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes, Berlin, pp. 205.
- Lemaire, P., J. Berhaut, S. Lemaire-Gony und M. LaFaurie (1992) Ultrastructural changes induced by benzo[a]pyrene in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver and intestine: importance of the intoxication route, *Environ Res*, 57, 59-72.
- Lenk, W. und R. Rosenbauer-Thilmann (1993) Metabolism of 2-acetylaminofluorene. I. Metabolism *in vitro* of 2-acetylaminofluorene and 2-acetylaminofluoren-9-one by hepatic enzymes, *Xenobiotica*, 23, 241-257.

- López-Barea, J. und C. Pueyo (1998) Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution, *Mutat Res*, 399, 3-15.
- Ma, T.-H., C. Xu, S. Liao, H. McConnell, B.S. Jeong und C.D. Won (1996) *In situ* monitoring with the *Tradescantia* bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and an incinerator, *Mutat Res*, 359, 39-52.
- Ma, T.-H., G.L. Cabrera, R. Chen, B.S. Gill, S.S. Sandhu, A.L. Vandenberg und M.F. Salamone (1994) *Tradescantia* micronucleus bioassay, *Mutat Res*, 310, 221-230.
- Maccubin, A.E. (1994) DNA adduct analysis in fish: Laboratory and field studies, in: Malins, D.C. und G.K. Ostrander (eds) *Aquatic Toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives*, Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 267-294.
- Macleán, N. (1998) Regulation and exploitation of transgenes in fish, *Mutat Res*, 399, 255-266.
- Malins, C., M.M. Krahn, M.S. Myers, L.D. Rhodes, D.W. Brown, C.A. Krone, B.B. McCain und S.-L. Chan (1985) Toxic chemicals in sediments and biota from a creosote-polluted harbor: relationships with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*), *Carcinogenesis*, 6, 1463-1469.
- Mallat, J. (1985) Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review, *Can J Fish Aquat Sci*, 42, 630-648.
- Malle, K.G. (1991) Der Neckar. Vergleich mit anderen Flüssen in Deutschland, in: G. Müller (Ed.), 3. Neckar-Umwelt-Symposium, Heidelberger Geowiss Abh, Heidelberg, pp. 39-42.
- Maron, D. und B.N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat Res*, 113, 173-215.
- Marquardt, H. (1994) Chemische Cancerogenese, in: H. Marquardt und S.G. Schäfer (Eds.), *Lehrbuch der Toxikologie*, B.I. Wissenschaftsverlag, pp. 124-147.
- Marten, M. (1992) Veränderungen der Fauna in Rhein und Neckar, *Berichte der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Jahresbericht*, Karlsruhe, pp. 147-149.
- Martinez, G.P., G.W. Winston, C. Metash-Dickey, S.C.M. O'Hara und D.R. Livingstone (1995) Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the common mussel (*Mytilus edulis* L.), *Toxicol Appl Pharmacol*, 131, 332-341.
- Martyniak, A., K. Girtler und Z. Adamek (1991) Food biology of roach (*Rutilus rutilus*) in the Pierzchaly reservoir, *Folia Zoologica*, 40, 377-384.
- McKelvey-Martin, V.J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Meo und A. Collins (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review, *Mutat Res*, 288, 47-63.
- McKim, J.M. (1985) Early life stage toxicity tests, in: G.M. Rand und S.R. Petrocelli (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Taylor & Francis, pp. 58-95.
- Menichini, P., G. Fronza, S. Tornaletti, S. Galiège-Zouitina, B. Bailleul, M.-H. Loucheux-Lefebvre, A. Abbondandolo und A.M. Pedrini (1989) *In vitro* DNA modification by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline-1-oxide: influence of superhelicity, *Carcinogenesis*, 10, 1589-1593.
- Minissi, S., E. Ciccotti und M. Rizzoni (1996) Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater, *Mutat Res*, 367, 245-251.
- Mitchelmore, C.L. und J.K. Chipman (1998a) Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay, *Aquat Toxicol*, 41, 161-182.

- Mitchelmore, C.L. und J.K. Chipman (1998b) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutat Res*, 399, 135-47.
- Mitchelmore, C.L., C. Birmelin, D.R. Livingstone und J.K. Chipman (1998c) The detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the comet assay, *Ecotox Environ Saf*, 41, 51-58.
- Moller, P., L.E. Knudsen, G. Frenzt, M. Dybdahl, H. Wallin und B.A. Nexø (1998) Seasonal variation of DNA damage and repair in patients with non-melanoma skin cancer and referents with and without *psoriasis*, *Mutat Res*, 407, 25-34.
- Monod, G., A. Devaux, Y. Valotaire und J.-P. Cravedi (1998) Primary cell cultures from fish in ecotoxicology, in: T. Braunbeck, D.E. Hinton and B. Streit (Eds.), *Fish Ecotoxicology*, Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 39-60.
- Monteith, D.K. (1992) Inhibition of sulfotransferase in primary cultures of human hepatocytes affecting metabolism and binding of 2-acetylaminofluorene, *Cancer Letters*, 64, 109-115.
- Moore, L.E., M.L. Warner, A.H. Smith, D. Kalman und M.T. Smith (1996) Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells, *Environ Mol Mutagen*, 27, 176-184.
- Moore, M.J. und M.S. Myers (1994) Pathobiology of chemical-associated neoplasia in fish, in: D.C. Malins and G.K. Ostrander (Eds.), *Aquatic Toxicology. Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*, Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, pp. 327-386.
- Moretti, M., M. Villarini, G. Scassellati-Sforzolini, A.M. Santroni, D. Fedeli und G. Falcioni (1998) Extent of DNA damage in density-separated trout erythrocytes assessed by the 'comet' assay, *Mutat Res*, 397, 353-60.
- Moretti, M., M. Villarini, G. Scassellati-Sforzolini, S. Monarca, M. Libraro, C. Fatigoni, F. Donato, C. Leonardis und L. Perego (1996) Biological monitoring of genotoxic hazard in workers of the rubber industry, *Environ Health Perspect Suppl*, 104, 543-545.
- Mu, D. und A. Sancar (1997) DNA excision repair assays, *Progress in Nucleic Acid Research*, 56, 63-81.
- Mueller, M.E. et. al. (1991) Nature and time course of acclimation to aluminium in juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). II. gill histology, *Can J Fish Aquat Sci*, 48, 2016-2027.
- Müller, G. (1986) Schwermetallbelastung der Sedimente und Gewässergüte des Neckars 1972-1979-1985: Ein Vergleich, *Heidelberger Geowiss Abh: 2. Neckarsymposium*, Heidelberg.
- Müller, G. (1991) Ergebnisse der Untersuchungen der Neckar-Sedimente in den letzten 20 Jahren - Chronologie der Schwermetallbelastung, in: G. Müller (Ed.), *Heidelberger Geowiss Abh: 3. Neckar Symposium*, Heidelberg, pp. 1-15.
- Müller, G. (1992) Untersuchung der Neckar-Altsedimente und Bewertung ihres möglichen Einflusses auf die Gewässergüte und auf das Grundwasser, *Institut für Sedimentforschung der Universität Heidelberg*, Heidelberg.
- Müller, G., A. Yahya und P. Gentner (1993) Die Schwermetallbelastung der Sedimente des Neckars und seiner Zuflüsse: Bestandsaufnahme 1990 und Vergleich mit den früheren Untersuchungen, in: G. Müller (Ed.), *Heidelberger Geowiss Abh*, Heidelberg.
- Müller, K., P. Kasper und L. Müller (1994) Species differences in the time-dependent induction of unscheduled DNA synthesis in primary hepatocytes, *Toxicol in vitro*, 8, 99-108.
- Müller, R. und H.-J. Meng (1990) The fate of the fish populations in the river Rhine after the Schweizerhalle accident, *Limnologie aktuell*, 1, 406-421.
- Müller, W.U., T. Bauch, C. Streffer, F. Niedereichholz und W. Böcker (1994) Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines, *Int. J. Radiat. Biol*, 65, 315-319.

- Mullins, M.C. et. al. (1996) Genes establishing dorsoventral pattern formation in the zebrafish embryo: the ventral specifying genes, *Dev*, 123, 81-93.
- Myers, M.S., L.R. Rhodes und B.B. McCain (1987) Pathologic anatomy and pattern of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions and other idiopathic hepatic conditions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington, *J Natl Cancer Inst*, 78, 234-241.
- Myles, G.M. und A. Sancar (1990) DNA repair, *Chem Res Toxicol*, 2, 197-226.
- Nagel, R. und K. Isberner (1998) Testing of chemical with fish - a critical evaluation of tests with special regard to zebrafish, in: T. Braunbeck, D.E. Hinton and B. Streit (Eds.), *Fish ecotoxicology*, Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, pp. 337-352.
- Navarrete, M.H., P. Carrera, M. de Miguel und C. de la Torre (1997) A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants., *Mutational Research*, 389, 271-277.
- Neumann, H.-G. (1992) Entstehung und Behandlung von Tumoren, Immunsuppressiva, in: W. Forth (Ed.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, B.I. Wissenschaftsverlag.
- Neumüller, D. (1995) Der Comet Assay an Fischzellen: Nachweis von DNA-Schäden unter dem Einfluß von Umweltschadstoffen, Msc-thesis, Zoology I, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, pp. 90.
- Ni, Y.C., R.H. Heflich, F.F. Kadlubar und P.P. Fu (1987) Mutagenicity of nitrofurans in *Salmonella typhimurium* TA98, TA98NR and TA98/1,8-DNP6, *Mutat Res*, 192, 15-22.
- Nikl, D.L. und A.P. Farrell (1993) Reduced swimming performance and gill structural changes in juvenile salmonids exposed to 2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole, *Aquat Tox*, 27, 245-264.
- Nishimoto, M., W.T. Roubal, J.E. Stein und U. Varanasi (1991) Oxidative DNA damage in tissues of English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to nitrofurantoin, *Chem Biol Interact*. 1991;, 80, 317-26.
- Nocentini, S. (1995) Comet assay analysis of repair of DNA strand breaks in normal and deficient human cells exposed to radiation and chemicals. Evidence for a repair pathway specificity of DNA ligation, *Radiat Res*, 144, 170-180.
- Nunoshiba, T. und B. Demple (1993) Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide, *Cancer Res*, 53, 3250-2.
- Oda, Y., H. Yamazaki, M. Watanabe, T. Nohmi und T. Shimada (1995) Development of high sensitive umu test system: rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM2009 possessing high O-acetyltransferase activity, *Mutat Res*, 334, 145-56.
- Odenthal, J. et. al. (1996) Mutations affecting the formation of the notochord in the zebrafish, *Danio rerio*, *Dev*, 123, 103-115.
- Olive, P.L., J.P. Banáth und H.H. Evans (1993a) Cell killing and DNA damage by etoposide in Chinese hamster V79 monolayers and spheroids: influence of growth kinetics, growth environment and DNA packaging, *Brit J Cancer Res*, 67, 522-530.
- Olive, P.L., G. Frazer und J.P. Banáth (1993b) Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay, *Radiat Res*, 136, 130-136.
- Olive, P.L. und J.P. Banáth (1993c) Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: tail moment as a function of position in the cell cycle, *Mutat Res*, 294, 275-283.
- Olive, P.L., C.M. Vikse und R.E. Durand (1994) Hypoxic fractions measured in murine tumors and normal tissues using the comet assay, *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys*, 29, 487-491.
- Olive, P.J., J.P. Banáth und C.D. Fjell (1994) DNA strand breakage and DNA structure influence staining with propidium iodide using the alkaline comet assay, *Cytometry*, 16, 305-312.
- Olive, P.L. (1995) Use of the comet assay to detect hypoxic cells in murine tumors and normal tissues exposed to bioreductive drugs., *Acta Oncologica*, 34, 301-305.

- Olive, P.L. und J.P. Banath (1996) Use of the comet assay to identify cells sensitive to DNA damaging agents in spheroids, murine tumors, and normal tissue, *Environ Mol Mutagen*, 27, 52.
- Olive, P.L. und P.J. Johnston (1997) DNA damage from oxidants: influence of lesion complexity and chromatin organization, *Oncol Res*, 9, 287-94.
- Olive, P.L., J.P. Banáth und R.E. Durand (1997) Detections of subpopulations resistant to DNA damaging agents in spheroids and murine tumors, *Mutat Res*, 375, 157-165.
- Östling, O. und K.J. Johanson (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells, *Biochem Biophysiol Res Commun*, 123, 291-298.
- Pandurangi, R., M. Petras, S. Ralph und M. Vrzoc (1995) Alkaline single cell (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp, *Environ Mol Mutagen*, 26, 345-356.
- Parodi, S., M. Pala, P. Russo, C. Balbi und L. Santi (1983) Alkaline DNA fragmentation, DNA disentanglement evaluated viscosimetrically and sister chromatid exchanges, after treatment *in vivo* with nitrofurantoin, *Chem.-Biol. Interactions*, 45, 77-94.
- Pärt, P., L. Norrgren, E. Bergström und P. Sjöberg (1993) Primary cultures of epithelial cells from rainbow trout gills, *J Exp Biol*, 175, 219-232.
- Peters, N., A. Köhler und H. Kranz (1987) Liver pathology of fishes from the lower Elbe as a consequence of pollution, *Dis Aquat Organ*, 87-97.
- Petersen, G.I. und P. Kristensen (1998) Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages, *Environ Tox Chem*, 17, 1385-1395.
- Pfeiffer, P., B. Göttlich, S. Reichenberger, E. Feldmann, P. Daza, J.F. Ward, J.R. Milligan, L.H.F. Mullenders und A.T. Natarajan (1996) DNA lesions and repair, *Mutat Res*, 366, 69-80.
- Phromkunthong, W., V. Storch und T. Braunbeck (1995) Sexual dimorphism in the reaction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) to ascorbic acid deficiency: induction of steatosis in hepatocytes of male fish, *J Appl Ichthyol*, Blackwell, 1-8.
- Pinter, I. (1991) Aktueller Gütezustand des Neckars - Perspektiven, in: G. Müller (Ed.), 3. Neckar-Umwelt-Symposium, Heidelberger Geowiss Abh, Heidelberg, pp. 62-69.
- Plappert, U., B. Stocker, H. Fender und T.M. Fliedner (1997) Changes in the repair capacity of blood cells as a biomarker for chronic low-dose exposure to ionizing radiation, *Environ Mol Mutagen*, 30, 153-160.
- Ploch, S.A., L.C. King, M.J. Kohan und R.T. Di Giulio (1998) Comparative *in vitro* and *in vivo* benzo[a]pyrene-DNA adduct formation and its relationship to CYP1A activity in two species of ictalurid catfish, *Toxicol Appl Pharmacol*, 149, 90-8.
- Pluth, J.M., J.A. Nicklas, J.P. O'Neill und R.J. Albertini (1996) Mutational spectra comparison of malathion *in vitro* induced hprt mutants analyzed by both multiplex PCR and cDNA sequencing, *Environ Mol Mutagen*, 27, 54.
- Poels, C.L.M., M.A. Van der Gaag und J.F.J. Van de Kerkhoff (1980) An investigation into long-term effects of Rhine water on rainbow trout, *Water Res*, 14, 1029-1035.
- Pool-Zobel, B.L., N. Lotzmann, M. Knoll, F. Kuchenmeister, R. Lambertz, U. Leucht, H.G. Schröder und P. Schmezer (1995) Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples, *Environ Mol Mutagen*, 24, 23-45.
- Poongothai, K., S. Shayin und M.V. Usharani (1996) Induction of micronuclei in fish by polluted water and heavy metals, *Cytobios*, 86, 17-22.
- Pottinger, T.G. and G.M. Calder (1995) Physiological stress in fish during toxicological procedures: a potentially confounding factor, *Environ Tox Water Qual*, 10, 135-146.
- Quabius, E.S., D.T. Nolan, P.H.M. Balm und S.E. Wendelar Bonga (1998) The influence of polychlorinated biphenyl 126 on tilapia (*Oreochromis mossambicus*) liver, *Comp Biochem Physiol A*, 120, 57-63.

- Rahman, N. (1996) Comet Assay mit Fischzellen, Staatsexamensarbeit, Zoology I, Ruprecht-Karls-University, Heidelberg, pp. 120.
- Ralph, S. und M. Petras (1997) Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (Comet) assay, *Environ Mole Mutagen*, 29, 418-430.
- Ralph, S. und M. Petras (1998a) Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay, *Mutat Res*, 413, 235-250.
- Ralph, S. und M. Petras (1998b) Comparison of sensitivity to methyl methanesulphonate among tadpole developmental stages using the alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay, *Environ Mol Mutagen*, 31, 374-82.
- Randerath, K. et .al. (1999) Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lake sediments as assessed by three different methods, *Environ Mol Mutagen*, 33, 303-312.
- Rao, S.S. und T. Neheli (1996) Hepatic micronucleus assay for the assessment of genotoxic responses in fis., *Environ Toxicol Water Qual*, 11, 167-170.
- Ray, F.E. und O.O. Wejebe (1964) Distribution of tritiated derivates of fluorene in the rat, *J Pharmaceut Sci*, 53, 601-603.
- Reichenbach-Klinke, H.H. (1976) Die Gewässeraufheizung und ihre Auswirkungen auf den Lebensraum Wasser, in: H.H. Reichenbach-Klinke (Ed.), *Fisch und Umwelt*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 146-152.
- Reifferscheid, G., J. Heil und R.K. Zahn (1991) Die Erfassung von Gentoxinen in Wasserproben mit dem umu-Mikrotest., *Vom Wasser*, 76, 153-166.
- Reyes-Marchant, P., A. Cravinho und N. Lair (1992) Food and feeding behavior of *roach* (*Rutilus rutilus*, Linne 1758) juveniles in relation to morphological change, *J Appl Ichthyol*, 8, 77-89.
- Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J Cell Biol*, 17, 208-212.
- Réz, G. (1986) Electron microscopic approaches to environmental toxicity, *Acta Biologica Hungaria*, 37, 31-45.
- Richardson, H.H. (1960) Färbungen für Araldit-, Westopal- oder Metacrylschnitte, *Stain Technol*, 35, 313-323.
- Riji John, K. und N. Jayabalan (1993) Sublethal effects of endosulfan on the histology and protein pattern of *Cyprinus carpio* gill, *J Appl Ichthyol*, 9, 549-567.
- Rippen, G.(Hrsg.) (1995) *Handbuch Umweltchemikalien*, 29. Ergänzungslieferung 7/95.
- Roberts, R.J. und H.J. Schlotfeldt (1985) *Grundlagen der Fischparasitologie*, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- Rodrigues, A.S., I. Duarte Silva, M.H. Caria, A. Laires, T. Chaveca, H.R. Glatt und J. Rueff (1994) Genotoxicity assessment of aromatic amines and amides in genetically engineerd V79 cells, *Mutat Res*, 341, 93-100.
- Rodriguez-Ariza, A., F.M. Diaz-Mendez, J.I. Navas, C. Pueyo und J. López-Barea (1995) Metabolic activation of carcinogenic aromatic amines by fish exposed to environmental pollutants, *Environ Mol Mutagen*, 25, 50-57.
- Rudolph, P. und R. Boje (1987) *Ökotoxikologie. Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz*, Ecomed Verlag, Landsberg.
- Russo, P., M. Pala, G. Nicolo, L. Santi und S. Parodi (1982) DNA damage in liver of rats treated with nitrofurantoin, *Mutat Res*, 105, 377-82.

- Rydberg, B. und K.B. Johanson (1978) Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells, in: P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg and C.F. Fox (Eds.), DNA repair mechanisms, Academic Press, New York, pp. 465-468.
- Sak, A., M. Stuschke, N. Stapper und C. Streffer (1996) Induction of DNA double-strand breaks by ionizing radiation at the c-myc locus compared with the whole genome: a study using pulsed-field gel electrophoresis and gene probing, *Int. J. Radiat Biol.*, 69, 679-685.
- Sasaki, Y.F., A. Saga, K. Yoshida, Y.Q. Su, T. Ohta, N. Matsusaka und S. Tsuda (1998) Colon-specific genotoxicity of heterocyclic amines detected by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay of multiple mouse organs, *Mutat Res*, 414, 9-14.
- Sasaki, Y.F. et al. (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutat Res*, 388, 33-44.
- Schnurstein, A. (1996) Nachweis von Gesundheitsschäden in Fischen aus dem Neckar unter besonderer Berücksichtigung cytopathologischer Effekte in Leber und Kieme von *Rutilus rutilus* (L.), Msc-thesis, Zoology I, Karls-Ruprecht-Universität Heidelberg, Heidelberg, pp. 128.
- Schöll, F., T. Titzinger, E. Behring und M. Wanitscheck (1995) Die Elbe - ökologischer Zustand und Sanierungsmöglichkeiten, Texte Umweltbundesamt, 64/95, 48 pp.
- Schulte, C. und R. Nagel (1994) Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: Preliminary results, *Alta*, 22, 12-19.
- Segner, H. (1998) Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology, in: T.H. Braunbeck, D.E. and B. Streit (Eds.), Fish ecotoxicology, Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, pp. 1-38.
- Sgonc, R. und J. Gruber (1998) Apoptosis detection: an overview, *Exper Geront*, 33, 525-533.
- Sikka, H.C., J.P. Rutkowski, C. Kandaswami, S. Kumar, K. Earley und R.C. Gupta (1990) Formation and persistence of DNA adducts in the liver of brown bullheads exposed to benzo[a]pyrene, *Cancer Letters*, 49, 81-87.
- Sikka, H.C., A.R. Steward, C. Kandaswami, J.P. Rutkowski, J. Zaleski, S. Kumar, K. Early und R.C. Gupta (1991) Metabolism of benzo[a]pyrene and persistence of DNA adducts in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*), *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 25-28.
- Sikka, H.C., A.R. Steward, S.A. Elmarakby, S. Kumar, U. Devanaboyina und R.C. Gupta (1995) Metabolism of 2-acetylaminofluorene in rainbow trout, *Mar Environ Res*, 28, 95-99.
- Singh, J. (1964) A modification of the Masson-Hamperl method for staining of argentophil cells, *Anatomischer Anzeiger*, 115, 81-82.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice und E.L. Schneider (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*, 175, 184-191.
- Singh, N.P. (1996) Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology, in: G.P. Pfeiffer (ed) Technologies for detection of DNA damage and mutations, Plenum Press, New York, pp 441.
- Singh, N.P. und R.E. Stephens (1997) Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching, *Mutat Res*, 383, 167-175.
- Singh, N.P. und R.E. Stevens (1998) X-ray-induced DNA double-strand breaks in human sperm, *Mutagenesis*, 13, 75-79.
- Singh, R.P., M. Al-Rubeai und N. Emery (1996) Apoptosis: exploiting novel pathways to the improvement of cell culture processes, *The Genetic Engineer and Biotechnologist*, 16, 227-251.
- Slamenova, D., A. Gabelova und L. Ruzekova (1997) Use of the comet assay and alkaline DNA unwinding to detect DNA lesion in mammalian cells damaged by indirect carcinogens, *Mutat Res*, 379, 130.

- Slamenová, D., A. Gábelová, L. Ruzeková, I. Chalupa, E. Horváthová, T. Farkasová, E. Bozsakyová und R. Stetina (1997) Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of the comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations, *Mutat Res*, 383, 243-252.
- Smolarek, T.A., S.L. Morgan, C.G. Moynihan, H. Lee, R.G. Harvey und W.M. Baird (1987) Metabolism and DNA adduct formation of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in fish cell lines in culture, *Carcinogenesis*, 8, 1501-1509.
- Spazier, E., V. Storch und T. Braunbeck (1992) Cytopathology of spleen in eel *Anguilla anguilla* exposed to a chemical spill in the Rhine river, *Dis Aquat Organ*, 14, 1-22.
- Speit, G. und A. Hartmann (1995) The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay), *Mutagenesis*, 10, 555-559.
- Speit, G., S. Hanelt, R. Helbig, A. Seidel und A. Hartmann (1996) Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis, *Toxicol Letters*, 88, 91-98.
- Spurr, A.R. (1969) A low viscosity embedding medium for electron microscopy, *J Ultrastruct Res*, 26, 31-43.
- Stainier, D.Y.R. et. al. (1996) Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo, *Dev*, 123, 285-292.
- Stegemann, J.J. und P. Kloepper-Sams (1987) Cytochrome P-450 isozymes and monooxygenase activity in aquatic animals, *Environ Health Perspect*, 71, 87-95.
- Stegemann, J.J. (1989) Cytochrome P450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities, *Xenobiotica*, 19, 1093-1110.
- Stegeman, J.J. und J.J. Lech (1991) Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure, *Environ Health Perspect*, 90, 101-109.
- Steinert, S.A., R. Streib-Montee, J.M. Leather und D.B. Chadwick (1998) DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay, *Mutation Research*, 399, 65-85.
- Steward, A.R., J. Zaleski und H.C. Sikka (1990) Metabolism of benzo[a]pyrene and (-)-trans-benzo[a]pyrene-7,8-diol by freshly isolated hepatocytes of brown bullhead, *Chem-Biol Interact*, 74, 119-138.
- Steward, A.R., S.A. Elmarakby, K.G. Stuart, S. Kumar und H.C. Sikka (1995) Metabolism of 2-acetylaminofluorene by hepatocytes isolated from rainbow trout., *Toxicol Appl Pharmacol*, 130, 188-196.
- Stocker, B., T. Meier, T.M. Fliedner und U. Plappert (1998) Laser pyrolysis products: sampling procedures, cytotoxic and genotoxic effects, *Mutat Res*, 412, 145-54.
- Strauss, G.H.S. (1991) Non-random cell killing in cryopreservation: implication for performance of the battery of leucocyte tests (BLT). I. Toxic and immunotoxic effects, *Mutat Res*, 252, 1-15.
- Streisinger, G. (1984) Attainment of minimal biological variability and measurement of genotoxicity: production of homozygous diploid zebra fish, *Natl Cancer Inst Monogr*, 65, 53-58.
- Streit, B. (1990) Chemikalien im Wasser: Experimente und Modelle zur Bioakkumulation bei Süßwassertieren, in: K.u. Freidrich (Ed.), *Limnologie aktuell, Biologie des Rheins*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 107-130.
- Streit, B. (1994) *Lexikon der Ökotoxikologie*, VCH Verlagsgesellschaft.
- Sugg, D.W., J.W. Bickham, J.A. Brooks, M.D. Lomakin, C.H. Jagoe, C.E. Dallas, M.H. Smith, R.J. Baker und R.K. Chesser (1996) DNA damage and radiocesium in channel catfish from Chernobyl., *Environ Toxicol Chem*, 15, 1057-1063.

- Surallés, J. und A.T. Natarajan (1997) Human lymphocytes micronucleus assay in Europe: An international survey, *Mutat Res*, 392, 165-174.
- Sykora, I., P. Tretinik und V. Vortel (1985) Postnatal carcinogenic study of dimethylnitrosamine in rats, *Neoplasma*, 32, 63-72.
- Tafazoli, M., A. Baeten, P. Geerlings und M. Kirsch-Volders (1998) *In vitro* mutagenicity and genotoxicity study of a number of short-chain chlorinated hydrocarbons using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (Comet assay) in human lymphocytes: a structure-activity relationship (QSAR) analysis of the genotoxic and cytotoxic potential, *Mutagenesis*, 13, 115-26.
- Temmink, J.H.M., P.J. Boumeister und J.H. Van Den Berg (1983) An ultrastructural study of chromate induced hyperplasia in the gills of rainbow trout (*Salmo gaidneri*), *Aquat Tox*, 4, 165-179.
- Terofal, F. (1984) Süßwasserfische in europäischen Gewässern, Mosaik Verlag, München.
- Theodorakis, C.W., J.W. Bickham, T. Elbl, L.R. Shugart und R.K. Chesser (1998) Genetics of radionuclide-contaminated mosquitofish populations and homology between *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*, *Environ Tox Chem*, 17, 1992-1998.
- Theodorakis, C.W., T. Elbl und L.R. Shugart (1999) Genetic ecotoxicology IV: survival and DNA strand breakage is dependent on genotype in radionuclide-exposed mosquitofish, *Aquat Toxicol*, 45, 279-291.
- Tice, R.R., P.W. Andrews, O. Hirai und N.P. Singh (1990) The single cell gel (SCG) assay: An electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells, in: C.M. Wittmer (Ed.), *Biological Reactive Intermediates IV*, Plenum Press, New York, pp. 157-164.
- Tice, R.R., P. Andrews und M. Vasquez (1996) Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells, *Integrated Laboratory Systems*, pp. 1-8.
- Tice, R.R., E.M. Donner, P.W. Andrews und M. Vasquez (1997) The SCG/comet assay: applications to environmental and human biomonitoring, *Mutat Res*, 379, 127.
- Tice, R.R., L.A. Nylander-French und J.E. French (1997) Absence of systemic *in vivo* genotoxicity after dermal exposure to ethyl acrylate and tripropylene glycol diacrylate in Tg.AC (v.Ha-ras) mice, *Environ Mol Mutagen*, 29, 240-249.
- Tornaletti, S. und G.P. Pfeifer (1996) Ligation-mediated PCR for analysis of UV damage, in: G.P. Pfeifer (Ed.), *Technologies for detection of DNA damage and mutations*, Plenum Press, New York, pp. 199-209.
- Tornaletti, S. und G.P. Pfeifer (1996) UV damage and repair mechanisms in mammalian cells, *BioEssays*, 18, 221-228.
- Trump, B.F., I.K. Berezesky, S.H. Chang und P.C. Phelps (1997) The pathways of cell death: oncosis, apoptosis and necrosis, *Toxicol Pathol*, 25, 82-88.
- Udumudi, A., M. Jaiswal, N. Rajeswari, N. Desai, S. Jain, N. Balakrishna, K.V. Rao und Y.R. Ahuja (1998) Risk assessment in cervical dysplasia patients by single cell gel electrophoresis assay: a study of DNA damage and repair, *Mutat Res*, 412, 195-205.
- Ulrich, A. (1991) Die fischereiliche Nutzung des Neckars, in: G. Müller (Ed.), 3. Neckar-Umwelt-Symposium, Heidelberg Geowiss Abh, Heidelberg, pp. 101-111.
- Vahl, H.H., L. Karbe und J. Westendorf (1997) Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river: Comparison of *Salmonella* microsome test, arabinose resistance test, and umu-test, *Mutat Res*, 394, 81-93.

- Van Den Brink, F.W.B., G. Van Der Velde und W.G. Cazemier (1990) The faunistic composition of the freshwater section of the river Rhine in The Netherlands: present state and changes since 1900, *Limnologie aktuell*, 1, 192-216.
- Van Eeden, F.J.M. et. al. (1996) Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*, *Dev*, 123, 153-164.
- Van Leeuwen, C.J., E.M.M. Grootelaar und G. Niebeek (1990) Fish embryos as teratogenicity screens: a comparison of embryotoxicity between fish and birds, *Ecotox Environ Saf*, 20, 42-52.
- Van Urk, G. und A.B. De Vaate (1990) Ecological studies in the Lower Rhine in the Netherlands, *Limnologie aktuell*, 1, 179.
- Varanasi, U., J.E. Stein und T. Hom (1981) Covalent binding of benzo[a]pyrene to DNA in fish liver, *Biochem Biophys Res Commun*, 103, 780-787.
- Varanasi, U., W.L. Reichert und J.E. Stein (1989) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of DNA adducts in liver of wild English sole (*Parophrys vetulus*) and Winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*), *Cancer Research*, 49, 1171-1177.
- Vargas, V.M.F., R.R. Guidobono, C. Jordao und J.A.P. Henriques (1995) Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures, *Mutat Res*, 343, 31-52.
- Verna, L., J. Whysner und G.M. Williams (1996) 2-Acetylaminofluorene mechanistic data and risk assessment: DNA reactivity, enhanced cell proliferation and tumor initiation, *Pharmacol Ther*, 71, 83-105.
- Villani, P., C. Andreoli, R. Crebelli, F. Pacchierotti, A. Zijno und A. Carere (1998) Analysis of micronuclei and DNA single-strand breaks in mouse splenocytes and peripheral lymphocytes after oral administration of tetramethylthiuram disulfide (thiram), *Food Chem Toxicol*, 36, 155-64.
- Villarini, M., M. Moretti, E. Damiani, L. Greci, A.M. Santroni, D. Fedeli und G. Falcioni (1998) Detection of DNA damage in stressed trout nucleated erythrocytes using the comet assay: protection by nitroxide radicals, *Free Rad Biol Med*, 24, 1310-1315.
- Visvardis, E.-E., A.M. Tassiou und S.M. Piperakis (1997) Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and (-irradiation with the alkaline comet assay, *Mutat Res*, 383, 71-80.
- Vock, E.H., W.K. Lutz, O. Ilinskaya und S. Vamvakas (1999) Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity for the induction of DNA double strand breaks in cells treated with aldehydes and diepoxides, *Mutat Res*, 441, 85-93.
- Vonarx, E.J., H.L. Mitchell, R. Karthikeyan, I. Chatterjee und B.A. Kunz (1998) DNA repair in higher plants, *Mutat Res*, 400, 187-200.
- Walton, D.G., A.B. Acton und H.F. Stich (1984a) Comparison of DNA-repair synthesis, chromosome aberrations and induction of micronuclei in cultured human fibroblast, Chinese hamster ovary and central mudminnow (*Umbra limi*) cells exposed to chemical mutagens, *Mutat Res*, 129, 129-136.
- Walton, D.G., A.B. Acton und H.F. Stich (1984b) DNA repair synthesis following exposure to chemical mutagens in primary liver, stomach, and intestinal cells isolated from rainbow trout., *Cancer Res*, 44, 1120-1121.
- Walton, D.G., A.B. Acton und H.F. Stich (1984c) DNA repair synthesis in cultured mammalian and fish cells following exposure to chemical mutagens, *Cancer Reseach*, pp. 154-161.
- Walum, E., K. Stenberg und D. Jenssen (1990) Cell genotoxicity, in: E.S. Walum, K.; Jenssen, D. (Ed.), *Understanding Cell Toxicology.*, Ellis - Hornwood, New York, pp. 129-157.
- Wang, C.Y., B.C. Behrens, M. Ichikawa und G.T. Bryan (1974) Nitroreduction of 5 nitrofurans derivatives by rat liver xanthine oxidase and reduced nicotinic adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase, *Biochem Pharmacol*, 23, 3395-3404.

- Washburn, P.C. und R.T. Di Giulio (1988) Nitrofurantoin-stimulated superoxide production by channel catfish (*Ictalurus punctatus*) hepatic microsomal and soluble fractions, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 95, 363-77.
- Waters, R., C.J. Jones, E.A. Martin, A.-L. Yang und N.J. Jones (1992) The repair of large DNA adducts in mammalian cells, *Mutat Res, DNA repair*, 273, 145-155.
- Weßler, A., M. Erbes, P. Krolla-Sidenstein und U. Obst (1998) Nachweis von DNA-Schäden in aquatischen Protozoen und Algen mit der Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) für eine genotoxikologische Gewässergütebewertung von Oberflächenwasser, *Acta hydrochim hydrobiol.*, 26, 82-89.
- Weßler, A., P. Krolla-Sidenstein und U. Obst (1997) Detection of primary DNA damage in a unicellular protozoa *Acanthamoeba castellanii* by a modified test protocol of the comet assay - investigations of humic substances and their interaction with genotoxines, *Mutat Res*, 379, 128.
- Westrich, B. (1991) Dynamik des Stofftransports in gestauten Flüssen: Anwendung auf den Neckar, in: G. Müller (Ed.), 3. Neckar-Umwelt-Symposium, Heidelberger Geowiss Abh, Heidelberg, pp. 85-92.
- White, P.A. und J.B. Rasmussen (1998) The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters, *Mutat Res*, 410, 223-36.
- White, P.A., J.B. Rasmussen und C. Blaise (1998) Genotoxic substances in the St. Lawrence system I: Industrial genotoxins sorbed to particulate matter in the St. Lawrence, St. Maurice, and Sagueny Rivers, Canada, *Environ Toxicol Chem*, 17, 286-303.
- Williams, G.M. und J.H. Weisburger (1986) Chemical carcinogenesis, in: C.D. Klaassen (Ed.), Casarett and Dull's Toxicology - The basic science of poisons, Macmillan Publishing, New York, pp. 99-173.
- Williams, G.T. (1991) Programmed Cell Death: Apoptosis and oncogenesis., *Cell*, 65, 1097-1098.
- Wirgin, I. und J.R. Waldman (1998) Altered gene expression and genetic damage in North American fish population, *Mutat Res*, 399, 193-219.
- Wojcik, A., K. Sauer, F. Zölzer, T. Bauch und W.-U. Müller (1996) Analysis of DNA damage recovery processes in the adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes, *Mutagenesis*, 11, 291-297.
- Wojewodzka, M., M. Kruszewski, T. Iwanenko, A.R. Collins und I. Szumiel (1998) Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. strand breakage, *Mutat Res*, 416, 21-35.
- Wolf, K. und M.C. Quimby (1962) Established eurythermic line of fish cells *in vitro*, *Science*, 135, 1065-1066.
- Yamashita, M., N. Kinae, I. Tomita und I. Kimura (1987) Comparison of the promutagenic activity of liver homogenates from fish and rat in the Ames test, *Bull Environ Contam Toxicol*, 38, 565-70.
- Yang, A.-L., M.Z. Zdzienicka, J.W.I.M. Simons und R. Waters (1991) The repair of 4-nitroquinoline-1-oxide induced DNA adducts in hypersensitive Chinese hamster mutants: lack of repair of UV induced (6 - 4) photoproduct correlates with reduced repair of adducts at the N2 of guanosine, *Mutagenesis*, 6, 449-453.
- Yang, J. und P. Duerksen-Hughes (1998) A new approach to identifying genotoxic carcinogens: p53 induction as an indicator of genotoxic damage, *Carcinogenesis*, 19, 1117-1125.
- Yano, T., S. Takahashi und T. Ichikawa (1995) Active oxygen generated in the process of carcinogen metabolism can induce oxidative damage in the nuclei, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 87, 367-370.

- Yendle, J.E., H. Tinwell, B.M. Elliot und J. Ashby (1997) The genetic toxicity of time: Importance of DNA-unwinding time to the outcome of the single-cell gel electrophoresis assays., *Mutat Res*, 375, 125-136.
- Younes, M. (1994) Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies, in: H. Marquardt and S.G. Schäfer (Eds.), *Lehrbuch der Toxikologie*, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, pp. 94-105.
- Youngman, R.J., W.F. Osswald and E.F. Elstner (1982) Mechanisms of oxygen activation by nitrofurantoin and relevance to its toxicity, *Biochem Pharmacol*, 87, 3723-3729.
- Zaleski, J., A.R. Steward und H.C. Sikka (1991) Metabolism of benzo[a]pyrene and (-)-trans-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by freshly isolated hepatocytes from mirror carp, *Carcinogenesis*, 12, 167-174.

## Veröffentlichungen

### Fachzeitschriften

Schnurstein, A., Froschauer, A., Tischmeyer, A. & Braunbeck, T. (1999) Die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) zum Nachweis des genotoxischen Potentials von Umweltproben. DVWK Schriften, 128, 274-281.

Schnurstein, A., A. Froschauer, A. Tischmeyer & T. Braunbeck (2001) Detection of *in vitro* genotoxicity with the comet assay using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*), Mutat Res, submitted.

Schnurstein, A. & T. Braunbeck (2001) Application of an *in vitro* version of the comet assay in bio-monitoring for the detection of genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). Ecotox Environ Saf, accepted.

### Vortrag

Schnurstein, A., Froschauer, A., Leist, E. & Braunbeck, T. (1997) Nachweis des genotoxischen Potentials ausgewählter Mutagene in Fischen und Fischzellen mit dem Comet-Assay. Vortrag, Jahrestagung der Gesellschaft für Ichthyologie 1997, Düsseldorf.

### Poster

Schnurstein, A., Froschauer, A., Leist, E. & Braunbeck, T. (1997) Activation of indirectly acting genotoxic substances in primary cultures of liver and gill cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*). Poster Presentation, Society of Experimental Biology (SEB), Annual Meeting 1997, Canterbury, UK.

Schnurstein, A., Froschauer, A., Tischmeyer, A. & Braunbeck, T. (1998) Detection of genotoxic substances in primary cell cultures of liver and gill cells from zebrafish (*Brachy-danio rerio*). Poster Presentation, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Annual Meeting Europe 1998, Bordeaux, F.

Schnurstein, A., Froschauer, A., Tischmeyer, A. & Braunbeck, T. (1999) Detection of genotoxicity in fish and fish cells with the comet assay, applications for biomonitoring. Poster Presentation, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Annual Meeting Europe 1999, Leipzig.

### Berichte

Schnurstein, A., Froschauer, A., Tischmeyer, A., Neumüller, D. & Braunbeck, T. (1999) Weiterentwicklung, Anpassung und Validierung der Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) mit Fischen und induzierten Fischzellen. Abschlußbericht des BMBF-Verbundvorhabens: Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächengewässer, Umweltbundesamt (UBA-Bad Elster) Dresden, Förderkennzeichen 02-WU9556/0.