



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Fakultät für Klinische Medizin Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Evaluation eines durchflusszytometrischen Verfahrens zum  
Nachweis von Mikrokernen und Zellzyklusveränderungen in HepG2-  
Zellen**

Autor: Christian Sachs  
Institut / Klinik: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Doktorvater: Prof. Dr. V. Mersch-Sundermann

Mit wachsender Besorgnis wird die Verunreinigung von Atmosphäre, Böden und Gewässern durch industrielle und nichtindustrielle Abfälle wahrgenommen. Vor allem die genetischen Konsequenzen für Mensch und Tier bei länger anhaltender Schadstoff-Exposition sind noch nicht absehbar. Zytogenetische Veränderungen lassen sich *in vivo* und *in vitro* an humanen Hepatoma-Zellen (HepG2-Zellen) in Form von quantitativer Mikrokernbestimmung nachweisen. In dieser Arbeit wurde ein durchflusszytometrisches Messverfahren (FACS-Analyse) zur quantitativen Bestimmung von Mikrokernen in HepG2-Zellen mit dem konventionellen Mikrokerntest verglichen. Ziel dieser Arbeit ist es, ein schnelles und exaktes Verfahren zur Messung von gentoxischen Effekten in der Umwelt gegenüber chemischen Stoffen zu etablieren. Hierzu wurden die HepG2-Zellen mit Benzo[a]pyren, N-Nitroso-Dimethylamin und Cyclophosphamid bei Expositionszeiten von 1 bzw. 24 Stunden behandelt. Die Zahl der entstandenen Mikrokerne wurde exemplarisch für Benzo[a]pyren sowohl durch FACS-Analyse als auch durch die konventionellen Mikrokernbestimmung bestimmt und miteinander verglichen. Bei der lichtmikroskopischen Auszählung von Mikrokernen zeigte sich die Dosis-Wirkungskurve, die wir erwartet haben. Bei einer Expositionszeit von 24h fand sich ein hochsignifikanter Anstieg der Mikrokernfrequenz in den mit 25- 100µmol/ Benzo[a]pyren behandelten HepG2-Zellen (p-Wert 0,0001). In der FACS-Analyse kam es dagegen bei Benzo[a]pyren zum Nachweis einer nicht signifikanten, jedoch tendenziellen Zunahme der Klastogenität (p-Wert 0,322). Die wichtigste Ursache für dieses abweichende Ergebnis, so diskutiert man, sei der Umstand, dass es bei der durchflusszytometrischen Bestimmung von Mikrokernen gegenwärtig keine zuverlässige Methode gibt, um apoptotischen Zellen ausreichend von Mikrokernen zu trennen. Solange dies nicht möglich ist, kann die Gegenwart von apoptotischen Zellen die Mikrokernbestimmung in manchen Zelllinien mehr oder weniger stark beeinflussen. Dieser Effekt muss insbesondere dann, wenn wie in unserem Fall Chemikalien Mikrokerne induzieren, besonders berücksichtigt werden. Bei der chemischen Induktion von N-Nitroso-Dimethylamin wurde in der FACS-Analyse ein hoch signifikanter Anstieg der Mikrokernfrequenz beobachtet. Die Expositionszeit betrug 24 Stunden. Bei einer Konzentration von 80mmol/l fand sich der maximale Induktionseffekt. Die Experimente bestätigten, dass nach 24stündiger Behandlung der HepG2-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Modelmutagens Cyclophosphamid eine Abhängigkeit der Mikrokerninduktion von der Konzentration gegeben ist. Bereits die niedrigste Konzentration von 2,5mmol/l zeigte in der FACS-Analyse einen deutlichen Anstieg der Mikrokernfrequenz gegenüber dem Kontrollwert. Insgesamt konnte für Cyclophosphamid eine signifikante (p-Wert 0,0013) Zunahme der Mikrokernfrequenz nachgewiesen werden. Diese Studie hat gezeigt, dass sowohl der konventionelle Mikrokerntest als auch die durchflusszytometrische Bestimmung von Mikrokernen mittels FACS-Analyse geeignet sind, ko- und antigenotoxischen Wirkungen chemischer Stoffe in HepG2-Zellen zu erfassen. Die Ergebnisse belegen auf eindrucksvolle Weise, dass beide Untersuchungsmethoden in der Umwelttoxikologie zur Ableitung genetischer Risiken für den Menschen eine wichtige Rolle spielen und auch zukünftig für die Risikoeinschätzung in der Umwelttoxikologie von großer Bedeutung sind.