UFZ-UMWELTFORSCHUNGSZENTRUM LEIPZIG-HALLE GMBH

UFZ-Bericht

Nr. 26/1999 Dissertation

In vivo- und in vitro-Induktion von CYP1A in Fischen: Reaktion auf diffuse Belastung, Einzelstoffe und Stoffgemische

Anja Behrens

ISSN 0948-9452

In vivo- und in vitro-Induktion von CYP1A in Fischen: Reaktion auf diffuse Belastung, Einzelstoffe und Stoffgemische

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Anja Behrens

geb. am: 27. Oktober 1967 in: Soest

Gutachter:

1.

2.

3.

Halle (Saale),

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Unter dem Rektorat des Professors
für Soziologie
Dr. Reinhard Kreckel
und dem Dekanat des
Professors für Zoologie
Dr. Rolf Gattermann

verleiht die

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

Frau Anja Behrens

geboren am: 27. Oktober 1967 in: Soest

auf Grund der Dissertation

„In vivo- und in vitro-Induktion von CYP1A in Fischen: Reaktion auf diffuse Belastung, Einzelstoffe und Stoffgemische“,

der öffentlichen Verteidigung

den akademischen Grad

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Für die Gesamtleistung wird das Prädikat

erteilt.

Halle (Saale),

Der Rektor
Prof. Dr. R. Kreckel

Der Dekan der Fakultät
Prof. Dr. R. Gattermann

Inhalt

1 Einleitung 1

2 Material und Methoden 6

2.1 in vivo/Freiland 6

2.1.1 Tierhaltung im Freiland 6

2.1.2 Tierhaltung im Labor 6

2.1.3 Hälterung und Ernährung der Versuchstiere 6

2.1.4 Probennahmestellen/Probennahmen/Codes 7

2.1.5 Tier- und Mikrosomenpräparation 8

2.1.6 Biochemische Nachweismethoden 8

2.1.6.1 Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Aktivität in Mikrosomen 8

2.1.6.2 Proteinkonzentration in Mikrosomen oder Cytosol 9

2.1.6.3 Cytochrom P4501A-Gehalt in Mikrosomen (ELISA) 9

2.1.6.4 Glutathion-S-Transferase (GST) im Cytosol 11

2.1.7 Cocktailversuch 11

2.1.8 Extraktversuch 12

2.1.9 Statistik 12

2.2 in vitro 12

2.2.1 Tierhaltung für die Isolierung von Primärhepatocyten 12

2.2.2 Isolierung von Primärhepatocyten 13

2.2.3 Matrigelbeschichtung 14

2.2.4 Kultivierung und Induktion der Primärhepatocyten 14

2.2.5 Kultivierung und Induktion der Zellinie RTL-W1 14

2.2.6 Biochemische Nachweismethoden 15

2.2.6.1 Ethoxyresorufin-O-Deethylase und Protein in der intakten Zelle (Primärhepatocyten und RTL-W1): „Live Cell Assay" 15

2.2.6.2 Ethoxyresorufin-O-Deethylase und Protein in der aufgebrochenen Zelle: „Stop-Assay" 16

2.2.7 Statistik 17

2.3 Chemikalien 18

3 Regulierung von CYP1A in vivo 19

3.1 Einleitung 19

3.2 Halbfreiland 20

3.2.1 Physikalisch-chemischer und limnochemischer im Hintergrund 20

3.2.2 Hintergrund der chemischen Belastung 21

3.2.3 Ergebnisse 22

Phase I 22

Phase II 26
Artenvergleich 26
Jahreszeitverlauf 27
3.2.4 Diskussion 28
Phase I 28
Phase II 30
Artenvergleich 30
Jahreszeitverlauf 31
3.3 Cocktail 31
3.3.1 Ergebnisse 31
3.3.2 Diskussion 33
3.4 Extraktversuch 34
3.4.1 Ergebnisse 34
3.4.2 Diskussion 36

4 Regulierung von CYP1A in vitro 38
4.1 Einleitung 38
4.2 Induktion durch Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe 39
4.2.1 Ergebnisse 39
4.2.1.1 RTL-W1 40
4.2.1.2 Primärhepatocyten 42
4.2.1.3 Vergleich von RTL-W1 und Primärhepatocyten 45
4.2.2 Diskussion 45
4.2.2.1 RTL-W1 45
Vergleich der Substanzen über den EC50 46
4.2.2.2 Primärhepatocyten 47
Vergleich der Substanzen über den EC50 47
4.2.2.3 Vergleich von RTL-W1 und Primärhepatocyten 48
4.3 Induktion über die Zeit 48
4.3.1 Ergebnisse 49
4.3.1.1 RTL-W1 49
4.3.1.2 Primärhepatocyten 50
4.3.2 Diskussion 51
4.4 Einfluß von Zellkulturbedingungen auf die Induktionskapazität 53
4.4.1 Ergebnisse 53
4.4.1.1 Serumgehalt 53
RTL-W1 53
Primärhepatocyten 55
4.4.1.2 Matrigel 55
4.4.2 Diskussion 55
4.4.2.1 Serumgehalt 55

4.4.2.2 Matrigel ... 56
4.5 Vergleich mit anderen Zellinien und Eignung für freilandbezogene Induktionsanalysen ... 57
4.6 Zusammenfassung ... 57

5 Mischungstoxizität ... 59
5.1 Einleitung ... 59
5.1.1 Theorie der Kombinationswirkung ... 60
5.1.2 Experimentelle Anwendung ... 60
5.1.2.1 Isobologramm ... 61
5.1.2.2 Toxic units ... 62
5.1.2.3 Ansatz eines Mischungsexperiments (Beispiel) ... 62
5.1.2.4 Toxic unit summation ... 63
5.1.3 Testsystem ... 64
5.1.3.1 Additivität von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen. 64
5.1.3.2 Additivität von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen und Polychlorierten Biphenylen ... 65
5.1.4 Interpretation ... 66
5.2 Additivität von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen ... 68
5.2.1 Ergebnisse ... 68
5.2.2 Diskussion ... 72
5.3 Additivität von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen und Polychlorierten Biphenylen ... 73
5.3.1 Ergebnisse ... 73
5.3.2 Diskussion ... 78

6 Zusammenfassende Betrachtung ... 81

7 Literatur ... 85

A Anhang ... 98
A.1 Ergebnistabellen zur EROD-Aktivität in RTL-W1 ... 98
A.2 Ergebnistabellen zur EROD-Aktivität in Primärhepatocyten ... 102
A.3 Ergebnistabellen zum Einfluß von Serum auf die EROD-Induktion in Primärhepatocyten ... 112
A.4 Ableitungen zur Berechnung des Standardfehlers (Kapitel 5) ... 115

Abkürzungsverzeichnis

2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-para-dioxin
3-MC	3-Methylcholanthren
ABTS	2,2'-Azino-di-[ethylbenzothiazolinsulfonat(6)], Ammoniumsalz
Ah	„Aryl hydrocarbon"
ANT (Ant)	Anthracen
ANY	Acenaphthen
BaA	Benz(a)anthracen
BaP	Benzo(a)pyren
BaP	Benzo(a)pyren
BbF	Benzo(b)fluoranthen
BCF	Biokonzentrationsfaktor
BghiP	Benzo(g,h,i)perylen
BkF	Benzo(k)lfuoranthen
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Rinderserumalbumin
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
CHR (Chr)	Chrysen
CYP1A	Cytochrom P4501A
DBahA	Dibenzo(a,h)anthracen
DCB	Dichlorbenzol
DDD	1,1-Bis-(4-chlorphenyl)-2,2-dichlorethan
DDE	1,1-Dichlor-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylen
DDT	Dichlor-diphenyl-trichlorethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
em	Emission
ER	7-Ethoxyresorufin
EROD	Ethoxyresorufin-O-Deethylase
exc	Anregung
FLA	Fluoranthen
FLU (Fluo)	Fluoren
GST	Glutathion-S-Transferase
HAH	Halogenierte Aromatische Kohlenwasserstoffe
HCB	Hexachlorbenzol

IF	Induktionsfaktor
IND	Indeno(1,2,3-c,d)pyren
IS	Induktionsspanne
KA	Probennahmestelle Körsch A
KE	Probennahmestelle Krähenbach E
K_{OW}	Oktonal-Wasser-Verteilungskoeffizient
$\log K_{OW}$	Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NAP	Naphthalin
OCP	Organochlorierte Pestizide
P	Probennahme
PAH	Polychlorierte Aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphatpuffer
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCB126	3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl
PCP	Pentachlorphenol
PeCB	Pentachlorbenzol
PHE (Phen)	Phenanthren
PYR (Pyr)	Pyren
RTG-2	Rainbow trout gonad 2
RTL-W1	Zellinie Rainbow trout liver-Waterloo 1
TCB	1,2,4-Trichlorbenzol
TeCB	1,2,4,5-Tetrachlorbenzol
TEF	Toxizitätsäquivalenzfaktor
TEQ	Toxizitätsäquivalente
TUS	Toxic unit summation
UDP	„Uridindiphospho" (z.B. UDP-Glucoronsäure)
UDP-GT	UDP-Glucuronosyltransferase

		Seite
Abb. 3.1.	Zusammenhang (lineare Regression) zwischen der katalytischen Aktivität und dem immunchemischen Gehalt von CYP1A in Forellenproben zu allen Probennahmezeitpunkten.	26
Abb. 3.2.	Kontrollwerte der katalytischen Aktivität und des immunchemischen Gehalts von CYP1A in Bachforellen und Bachschmerlen zu allen Probennahmezeitpunkten.	27
Abb. 3.3.	Prozentuale Erhöhung der katalytischen Aktivität und des immunchemischen Gehalts von CYP1A von Proben aus der Körsch im Vergleich zur Kontrolle. Die Proben stammen aus Bachforellen und Bachschmerlen von allen Probennahmezeitpunkten.	28
Abb. 3.4.	Prozentuale Erhöhung der katalytischen Aktivität und des immunchemischen Gehalts von CYP1A von Proben aus dem Krähenbach im Vergleich zur Kontrolle. Die Proben stammen aus Bachforellen und Bachschmerlen von allen Probennahmezeitpunkten.	28
Abb. 3.5.	Lineare Regression zwischen der katalytischen Aktivität in vitro und in vivo im Extraktversuch. Die Ergebnisse beziehen sich auf Proben aus der Kontrolle und der Körsch.	35
Abb. 3.6.	Lineare Regression zwischen der katalytischen Aktivität in vitro und in vivo im Extraktversuch. Die Ergebnisse beziehen sich nur auf Proben aus der Körsch.	36
Abb. 4.1.	EROD-Aktivität in der Zellinie RTL-W1 nach 24stündiger Exposition an Benz(a)antrhacen.	41
Abb. 4.2.	EROD-Aktivität in der Zellinie RTL-W1 nach 24stündiger Exposition an Benzo(b)fluoren.	41
Abb. 4.3.	EROD-Aktivität in der Zellinie RTL-W1 nach 24stündiger Exposition an Benzo(a)pyren.	41
Abb. 4.4.	EROD-Aktivität in der Zellinie RTL-W1 nach 24stündiger Exposition an Chrysen.	41
Abb. 4.5.	EROD-Aktivität in der Zellinie RTL-W1 nach 24stündiger Exposition an 3-Methylcholanthren.	41
Abb. 4.6.	EROD-Aktivität in der Zellinie RTL-W1 nach 24stündiger Exposition an Anthracen, Fluoranthen, Phenanthren oder Pyren.	41
Abb. 4.7.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an Benz(a)anthracen.	43
Abb. 4.8.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an Benzo(b)fluoren.	43
Abb. 4.9.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an Benzo(a)pyren.	43
Abb. 4.10.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an Chrysen.	43

Abb. 4.11.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an 3-Methylcholanthren.	43
Abb. 4.12.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an Anthracen, Fluoranthen, Phenanthren oder Pyren.	43
Abb. 4.13.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an Anthracen. Ergebnisse aus Versuch 11, Fisch 10.	44
Abb. 4.14.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an Fluoranthen. Ergebnisse aus Versuch 11, Fisch 10.	44
Abb. 4.15.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an Phenanthren. Ergebnisse aus Versuch 11, Fisch 10.	44
Abb. 4.16.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an Pyren. Ergebnisse aus Versuch 11, Fisch 10.	44
Abb. 4.17.	Zunahme der EROD-Aktivität in der Zellinie RTL-W1 über 24h bei Exposition an 3-Methylcholanthren.	49
Abb. 4.18.	Abnahme der EROD-Aktivität in der Zellinie RTL-W1 über 24h nach Wechsel zu schadstofffreiem Medium zum Zeitpunkt 24h+0h. Für die Dauer von 0h bis 24h waren die Zellen an 3-Methylcholanthren exponiert.	49
Abb. 4.19.	EROD-Aktivität in einer Lösungsmittelkontrolle der Zellinie RTL-W1 über 48h nach Mediumwechsel zum Zeitpunkt 0h.	50
Abb. 4.20.	Zunahme der EROD-Aktivität in Primärhepatocyten über 24h bei Exposition an 3-Methylcholanthren.	51
Abb. 4.21.	Abnahme der EROD-Aktivität in Primärhepatocyten über 24h nach Wechsel zu schadstofffreiem Medium zum Zeitpunkt 24h+0h. Für die Dauer von 0h bis 24h waren die Zellen an 3-Methylcholanthren exponiert.	51
Abb. 4.22.	EROD-Aktivität in der Zellinie RTL-W1 nach 24stündiger Exposition an 3-Methylcholanthren bei unterschiedlichem Serumgehalt im Medium.	54
Abb. 4.23.	EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24stündiger Exposition an 3-Methylcholanthren bei unterschiedlichem Serumgehalt im Medium.	54
Abb. 5.1.	Allgemeingültige Darstellung eines Isobolgramms für eine Mischung aus zwei Substanzen.	61
Abb. 5.2.	Ergebnis für die Mischung 1 aus Benzo(a)pyren und PCB126 nach 24h dargestellt im Isobologramm. Als Effekt wurde die EROD-Aktivität in Primärhepatocyten gemessen.	75
Abb. 5.3.	Ergebnis für die Mischung 2 aus Benzo(a)pyren und PCB126 nach 48h dargestellt im Isobologramm. Als Effekt wurde die EROD-Aktivität in Primärhepatocyten gemessen.	76
Abb. 5.4.	Ergebnis für die Mischung 3 aus Benzo(a)pyren und PCB126 nach 24h und 48h dargestellt im Isobologramm. Als Effekt wurde die EROD-Aktivität in Primärhepatocyten gemessen.	76
Abb. 5.5.	Ergebnisse der Mischung 1 (24h) und der Mischung 3 (24h und 48h) als Plot der EROD-Aktivität in Primärhepatocyten.	78

		Seite
Tab. 2.1.	Probennahmezeitpunkte, jeweilige Expositionsdauer und Tierdaten.	7
Tab. 3.1.	Physikalisch-chemischer und limnochemischer Hintergrund zu den Untersuchungsgewässern Krähenbach und Körsch.	20
Tab. 3.2.	Chemische Analysedaten zu Wasser und Sediment aus den Untersuchungsgewässern Krähenbach und Körsch.	21-22
Tab. 3.3.	Ergebnisse der katalytischen Aktivität von CYP1A (EROD) aus Leberproben von Bachforellen und Bachschmerlen. Dargestellt sind die Ergebnisse aller Probennahmezeitpunkte.	23
Tab. 3.4.	Ergebnisse des immunchemischen Gehalts von CYP1A in Leberproben von Bachforellen und Bachschmerlen. Dargestellt sind die Ergebnisse aller Probennahmezeitpunkte.	24
Tab. 3.5.	Ergebnisse der katalytischen Aktivität der Glutathion-S-Transferase aus Leberproben von Bachforellen und Bachschmerlen. Dargestellt sind die Ergebnisse aller Probennahmezeitpunkte.	25
Tab. 3.6.	Rückstandsanalytik von PAH und PCB im Gewebe von Bachforellen, die an den Schadstoffcocktail exponiert waren.	32
Tab. 3.7.	Ergebnisse für die katalytische Aktivität von CYP1A, den immunchemischen Gehalt von CYP1A, die GST-Aktivität und die aufsummierten TEQ-Werte aus dem Cocktailversuch.	33
Tab. 3.8.	EROD-Induktion in vivo in Mikrosomen aus Leberhomogenat und in vitro in der Zellinie RTL-W1. Aus den Teilen der Lebern, die der in vivo-Messung dienten, wurde ein lipophiler Extrakt gewonnen und in RTL-W1 auf seine Induktionskapazität getestet.	35
Tab. 4.1.	Verhältnis von Induktion und Nicht-Induktion der Substanzen Anthracen, Fluoranthen, Phenanthren und Pyren in vitro in Primärhepatocyten.	42
Tab. 4.2.	Zusammenfassung der Induktionsparameter bezüglich der EROD-Induktion in RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten nach Exposition an die untersuchten PAH.	45
Tab. 4.3.	Zytotoxizitätsdaten von PAH aus der Literatur und eigene getestete Höchstkonzentrationen.	46
Tab. 4.4.	Zusammenfassung der Induktionsparameter bezüglich der EROD-Induktion im zeitlichen Verlauf in RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten bei Exposition an 3-Methylcholanthren.	50
Tab. 4.5.	Zusammenfassung der Induktionsparameter bezüglich der EROD-Induktion in RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten nach Exposition an 3-Methylcholanthren bei unterschiedlichem Serumgehalt im Medium.	54
Tab. 5.1.	Parameter für Mischung 1 aus vier PAH in RTL-W1-Zellen bezüglich Vorhersage, Ergebnisse und Kontrolle des Mischungsexperiments.	69

Tab. 5.2.	Parameter für Mischung 2 aus vier PAH in RTL-W1-Zellen bezüglich Vorhersage, Ergebnisse und Kontrolle des Mischungsexperiments.	70
Tab. 5.3.	Parameter für Mischung 3 aus vier PAH in RTL-W1-Zellen bezüglich Vorhersage, Ergebnisse und Kontrolle des Mischungsexperiments.	71
Tab. 5.4.	Ergebnisse über die Toxic unit summation (TUS-Werte) für drei Mischungen aus vier PAH in RTL-W1-Zellen.	71
Tab. 5.5.	Parameter für die Vorhersage einer binären Mischung aus BaP und PCB 126 in Primärhepatocyten.	73
Tab. 5.6.	Ergebnisse für die Mischung 1 zum Zeitpunkt 24h aus BaP und PCB126 in Primärhepatocyten.	74
Tab. 5.7.	Ergebnisse für die Mischung 2 zum Zeitpunkt 48h aus BaP und PCB126 in Primärhepatocyten.	74
Tab. 5.8.	Ergebnisse für die Mischung 3 zu den Zeitpunkten 24h und 48h aus BaP und PCB126 in Primärhepatocyten.	75
Tab. 5.9.	Ergebnisse über die Toxic unit summation (TUS) für drei Mischungen aus BaP und PCB126 in Primärhepatocyten.	77
Tab. 5.10.	Ergebnisse aus der Toxic unit summation und die dazugehörigen Konfidenzintervalle für drei Mischungen aus BaP und PCB126 in Primärhepatocyten.	77

Einleitung

Das Auftreten von anthropogenen Substanzen (Xenobiotika und Schwermetalle) in der Umwelt ist eine weit verbreitete Erscheinung, auf die Organismen reagieren müssen. Bei der Bioakkumulation und Toxizität von Schadstoffen spielen mehrere Faktoren eine Rolle. Wichtig sind die Aufnahme, die Verteilung, die Interaktion mit einem Zielmolekül im Organismus und die daraus resultierende Störung sowie der Stoffwechsel und die Ausscheidung von Schadstoffen (Gregus und Klaassen 1996). Der Stoffwechsel von Xenobiotika ist dabei von besonderer Bedeutung. Durch ihn können Substanzen abgebaut oder aber durch Veränderung der Muttersubstanz in für den Organismus schädlichere Metabolite umgewandelt werden (Kantoniemi et al. 1996, Parkinson 1996). Bei Fischen findet der Metabolismus hauptsächlich in der Leber statt (Goksøyr und Husøy 1998). Sie ist das wichtigste Organ für den Fremdstoffwechsel, daneben kann der Stoffwechsel von Xenobiotika aber auch in Niere (Lorenzana et al. 1988), Kieme (Ueng et al. 1992), Herz (Stegeman et al. 1982 und 1989), Darm (VanVeld et al. 1990) oder Gehirn (Andersson und Goksøyr 1994) stattfinden.

Beim Metabolismus von Schadstoffen, der sogenannten Biotransformation, werden lipophile Substanzen in hydrophilere Substanzen umgewandelt. Die Metabolite können aufgrund ihrer veränderten physiko-chemischen Eigenschaften leichter ausgeschieden werden. Ohne diese Umformung würden lipophile Substanzen in Abhängigkeit von ihrem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{ow}) in noch größerem Maße im Organismus angereichert (De Wolf 1992).

Für den Vorgang der Biotransformation sind Enzyme verantwortlich. Sie lassen sich zwei verschiedenen Phasen zuordnen. In der Phase I werden durch Oxidations-, Reduktions- und Hydrolysereaktionen polare Gruppen in lipophile Substanzen eingeführt. Diese Reaktionen werden im wesentlichen durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (CYP oder P450) katalysiert, die in den meisten Fällen im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. Das CYP-Enzymsystem ist neben dem Metabolismus von Xenobiotika für den Stoffwechsel von endogenen Substanzen wie Fettsäuren, Steroiden, Prostaglandinen und Ketonen verantwortlich.

Zur Klassifizierung wird das Enzymsystem der Cytochrome P450 in Familien und Unterfamilien unterteilt, die Nomenklatur beruht dabei auf der Sequenzhomologie der verschiedenen Proteine. Die Zugehörigkeit zu einer Familie oder Unterfamilie richtet sich nach der Anzahl der identischen Aminosäuren. Die Gene und cDNAs der Cytochrome P450 werden kursiv mit P450 (CYP) abgekürzt, die Familie mit einer arabischen Ziffer, die Unterfamilie mit einem Großbuchstaben, und das individuelle Gen/Enzym wiederum mit einer arabischen Ziffer, zum Beispiel *CYP1A1* (Nebert et al. 1991). Bezieht sich die Kennzeichung auf die mRNA oder das Protein, wird die nicht kursive Schreibweise empfohlen (CYP1A1).

In der Phase II der Biotransformation werden Chemikalien oder ihre Phase I-Metabolite mit körpereigenen Molekülen konjugiert (Gallagher et al. 1996). Die entstehenden Konjugate sind besser wasserlöslich als die Muttersubstanzen und werden über Leber/Galle oder Nieren eliminiert. Zwei wichtige Enzymfamilien der Phase II sind die membrangebundenen UDP-Glukuronyltransferasen (UDP-GT) und die zytosolischen Glutathion-S-Transferasen (GST).

Die UDP-GT übertragen Glukuronylsäuren auf das Fremdstoffsubstrat, die GST konjugieren es mit Glutathion. Letztere Reaktion ist für elektrophile Substanzen besonders wichtig.

Im Zusammenhang mit dem Fremdstoffmetabolismus spielt die Unterfamilie CYP1A der Phase I-Enzyme eine besondere Rolle. Die Unterfamilie CYP1A wird durch Xenobiotika wie Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH), Polychlorierte Biphenyle (PCB), Polychlorierte Dibenzodioxine (PCDD), Polychlorierte Dibenzofurane (PCDF) und Pestizide induziert (Kobayashi et al. 1987, Kobayashi et al. 1993, Van Veld et al. 1997). Die Induktion beruht auf Bindung eines Fremdstoffmoleküls an den Aryl-Hydrokarbon (Ah)-Rezeptor im Zytosol der Zelle. Der aktivierte Ah-Rezeptor-Komplex wird in den Zellkern transportiert und führt dort zur Expression des CYP1A-Gens (Hahn 1998, Riddick et al. 1994). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß dieser Mechanismus grundsätzlich wahrscheinlich auch in Fischen gilt (Hahn et al. 1992 und 1994, Lorenzen and Okey 1990, Pollenz und Necela 1998, Wang et al. 1998). Die Eigenschaft der Induzierbarkeit von CYP1A durch die genannten Substanzgruppen hat den Einsatz von CYP1A als Biomarker in Fischen ermöglicht (Bucheli und Fent 1995, Goksøyr 1995, Stegeman et al. 1988 und 1991). Ein Biomarker kann als Fremdstoff-induzierte Veränderung in einem biologischen System definiert werden (Peakall 1992). Über eine solche Veränderung kann die Exposition von Organismen an anthropogene Substanzen nachgewiesen werden (Deplegde 1994). In diesem Zusammenhang wird die Induktion der katalytischen Aktivität des Cytochrom P4501A bereits seit den siebziger Jahren als Expoxitionsmarker für die Exposition von Fischen an Dioxin-ähnliche Stoffe genutzt (Payne 1976, Payne und Penrose 1975).

Neben CYP1A als Stellvertreter der Phase I der Biotransformation kann auch die Induktion von Phase II-Enzymen als Biomarker im aquatischen Bereich eingesetzt werden (Gadagbui und Goksøyr1996, Machala et al. 1997, Vigano et al. 1998). Die Induzierbarkeit der Enzymfamilien der UDP-Glukuronyltransferasen und Glutathion-S-Transferasen ist allerdings deutlich geringer als die des Cytochrom P450 1A (Jedamski-Grymlas et al. 1995, Otto und Moon 1996, Huuskonen und Lindström-Seppä 1995). Für die Enzyme der Phase II ist der Mechanismus der Induktion in Fischen unklar (Bucheli und Fent 1995).

Die Induktion von CYP1A kann auf drei Nachweisebenen erfaßt werden. Sie kann auf der Ebene der katalytischen Aktivität des Enzyms, auf der des Proteingehalts oder auf der des mRNA-Gehalts gemessen werden.

Die katalytische Aktivität von CYP1A wird meist als Aktivität der Ethoxyresorufin-O-Deehthylase (EROD) mit Ethoxyresorufin als künstlichem Substrat gemessen. Die EROD-Aktivität ist spezifisch für CYP1A (Stegeman und Kloepper-Sams 1987). Da die katalytische Enzymaktivität durch Chemikalien (Brüschweiler et al. 1996, Förlin et al. 1986, Gasiewicz und Rucci 1991) oder durch physikalische Faktoren gehemmt werden kann (Monod und Vindimian 1991), ist eine zusätzliche immunchemische Bestimmung der Induktion auf der Ebene des Proteins mittels Western Blot oder ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) beim Einsatz von CYP1A als Biomarker sinnvoll (Goksøyr et al. 1991, Collier et al. 1992). Auch die Induktion der CYP1A-mRNA wurde als Biomarker eingesetzt (Campbell et al. 1996). Dabei ist jedoch zu beachten, daß der mRNA Gehalt nach Exposition an einen Induktor recht schnell wieder abnehmen kann, während der Proteingehalt längerfristig induziert bleibt (Grøsvik et al. 1997, Haasch et al. 1989, Kloepper-Sams und Stegeman 1989). Beim Einsatz von CYP1A als Biomarker muß daher berücksichtigt werden, welche Aussagen mit der jeweiligen Nachweisebene getroffen werden können. Der Vergleich der EROD-Aktivität mit dem Proteingehalt kann beispielsweise bei relativ geringer katalytischer Aktivität auf ihre Hemmung hinweisen, wäh-

rend der Vergleich von Protein- und mRNA-Gehalt Hinweise auf den Zeipunkt oder die Dauer der Exposition geben könnte.

In den letzten Jahren diente der Biomarker CYP1A häufig dazu, hohe Belastungen von aquatischen Systemen durch die Papierindustrie oder durch PCB zu detektieren (Adams et al. 1989, Munkittrick et al. 1992 und 1994). Diese Studien zeichneten sich dadurch aus, daß die Biomarkerantworten an verschiedenen Standorten mit einer punktuellen Belastungsquelle und der graduellen Abnahme der Belastung innerhalb eines aquatischen Lebensraums relativ eindeutig in Beziehung gesetzt werden konnten. Andere Studien haben jedoch gezeigt, daß eine kausale Beziehung zwischen Biomarkerantwort und Schadstoffbelastung nicht immer eindeutig hergestellt werden kann (z.B. van der Oost et al. 1997). Die fehlende Korrelation kann sowohl schadstoffbedingte, als auch biotische oder abiotische Ursachen haben. Faktoren wie das Geschlecht, der Einfluß der Jahreszeit oder der Temperatur können die EROD-Aktivität entscheidend beeinflussen und damit eventuell auch den Effekt, der durch Schadstoffe verursacht wird, überlagern (Förlin und Haux 1990, Williams et al. 1998). Bei der Beurteilung einer Biomarkerantwort ist es daher wichtig festzustellen, ob die Induktion von CYP1A auf die Belastung mit Schadstoffen oder auf Einflüsse anderer Faktoren zurückzuführen ist. Desweiteren muß zwischen der Wirkung von Einzelsubstanzen und Stoffgemischen differenziert werden, denn Organismen im Freiland sind einer Vielzahl von Substanzen ausgesetzt. Die Wirkung einzelner Stoffe wie beispielsweise der Klasse der PCB auf CYP1A wurde bisher intensiv untersucht (Elliott et al. 1996, Kennedy et al. 1996, Melancon und Lech 1983). Über die Wirkung einzelner PAH (Pacheco und Santos 1997, Willett et al. 1997) oder von Substanzkombinationen ist dagegen wenig bekannt (Brüschweiler et al. 1996, Gasiewicz und Rucci 1991, Stien et al. 1997, Willett et al. 1998).

Die Wirkung vieler im Freiland auftretenden Substanzen mit ihren möglichen Wechselwirkungen auf die Induktion von CYP1A ist nicht bekannt und kann aufgrund der großen Anzahl von anthropogenen Substanzen auch nicht untersucht werden. Um dennoch die summarische Wirkung von Chemikalien interpretieren zu können, wurde das Konzept der Toxizitätsäquivalente (TEQ-Konzept) eingeführt (Safe 1990). Mit Hilfe dieses Konzepts kann untersucht werden, ob mit einer chemischen Analytik alle Substanzen in einer Umweltprobe erfaßt wurden, die eine CYP1A-Induktion hervorrufen können, oder ob nach Einflüssen weiterer Substanzen gesucht werden muß. Bei der Anwendung des TEQ-Konzepts wird die Induktion von CYP1A, die durch eine beliebige Substanz hervorgerufen wird, mit der Induktion verglichen, die 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) im gleichen System verursacht. Bei 2,3,7,8-TCDD handelt es sich um den stärksten bekannten CYP1A-Induktor, dessen Wirkung im jeweiligen System gleich 1 gesetzt wird. Durch Division der durch 2,3,7,8-TCDD hervorgerufenen Induktionsantwort mit der einer beliebigen Substanz erhält man den Toxizitätsäquivalenzfaktor (TEF) für die betrachtete Substanz. Durch Multiplikation dieses TEF mit der im Organismus/Probe vorhandenen Konzentration des dazugehörigen Stoffes werden die Toxizitätsäquivalente (TEQ) berechnet.

Die TEQ für die verschiedenen Substanzen in einem Organismus oder in einer Probe lassen sich aufsummieren. Zum Vergleich von Effekten in verschiedenen Organismen oder Proben vergleicht man die aufsummierten TEQ untereinander oder mit dem TEQ-Wert von 2,3,7,8-TCDD. Bei einer Abweichung von der Erwartung kann gefolgert werden, daß nicht alle Induktoren erfaßt wurden oder eine Hemmung der Induktion vorliegt. Diese Schlußfolgerung gilt strenggenommen allerdings nur, wenn die betrachteten Induktoren in ihrer Mischung konzentrationsadditiv wirken.

Wie oben dargelegt, ist die Induktionsantwort von hepatischem CYP1A in Fischen vergleichsweise gut untersucht. Eine Reihe von Fragen bleibt aber noch offen. Dazu gehört z.B. die Fragestellung, ob mit Hilfe des Biomarkers CYP1A auch zwischen Standorten mit diffuser Belastungssituation differenziert werden kann und ob die Biomarkerantwort dabei auf die Induktion durch Schadstoffe, und zwar hauptsächlich auf PAH und PCB, zurückzuführen ist. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden in der vorliegenden Arbeit im Freiland Biotransformationsenzyme in Fischen aus Fließgewässern bestimmt. Zur Interpretation der Freilanddaten wurden Versuche mit in vivo- und in vitro-Systemen durchgeführt. Bei der Interpretation stellte sich inbesondere die Frage nach der Konzentrationsadditivität von PAH und PCB. Untersuchungen zur Kombinationswirkung von PAH und PCB wurden mit in vitro-Systemen durchgeführt.

Regulierung von CYP1A in vivo

Die Freilandstudien wurden im Rahmen des Verbundprojektes Valimar durchgeführt. Über einen Zeitraum von drei Jahren (1995-1998) wurden Bachforellen (*Salmo trutta* f. *fario*) und Bachschmerlen (*Barbatula barbatula*) im sogenannten Halbfreiland in Aquarien an das Wasser zweier Bäche im Raum Stuttgart exponiert und mehrmals im Jahr beprobt. Die Belastung der ausgewählten Bäche Krähenbach und Körsch war durch Schwermetalle, PAH, PCB und Pestizide gekennzeichnet. Dabei unterschieden sich die beiden Gewässer hauptächlich durch den Oberflächeneintrag von Pestiziden sowie die Einleitung von Kläranlagenabwässern in einen der untersuchten Bäche (Körsch). Die Induktion von Enzymen der Phase I und II wurde in Leberhomogenat beider Fischarten bestimmt. Ermittelt wurden die katalytische EROD-Aktivität, der immunchemische Gehalt von CYP1A1, sowie die katalytische Aktivität der Glutathion-S-Transferase. Zur Interpretation der Daten wurde im Rahmen des Projektes ein sogenannter Cocktailversuch in vivo durchgeführt, mit dessen Hilfe der kausale Zusammenhang zwischen Schadstoffbelastung und Biomarkerantwort aufgezeigt werden sollte. Dazu wurden Bachforellen an einen Schadstoffcocktail exponiert, dessen Zusammensetzung und Konzentration über die Schadstoffdosis in belasteten Fischen und die Bioakkumulationsfaktoren der jeweiligen Substanzen berechnet wurde. Die Erwartung war, daß im Cocktailversuch bei gleicher Akkumulation wie im Halbfreiland derselbe Effekt beobachtet werden kann. Um die Ergebnisse aus dem Cocktailversuch mit den im Halbfreiland gewonnenen vergleichen zu können, wurde bei der Auswertung das Konzept der Toxizitätsäquivalente eingesetzt. Dabei wurde vorausgesetzt, daß die Biomarkerantwort hauptsächlich durch PAH und PCB verursacht wurde.

Regulierung von CYP1A in vitro

Die Anwendung des TEQ-Konzepts setzt die konzentrationsadditive Wirkung von Induktoren voraus. Für die komplexe Wirkung von PCB liegen zu dieser Frage bereits Untersuchungen vor, Konzentrationsadditivität konnte jedoch nicht immer eindeutig gezeigt werden (Janz und Metcalfe 1991, Walker et al. 1996, Zabel et al. 1995). Für PAH oder eine Kombination von PAH und PCB liegen bisher keine Untersuchungen zur Konzentrationsadditivität vor. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb in vitro-Systeme in Kombinationsexperimenten eingesetzt, um herauszufinden, ob PAH untereinander und auch Gemische aus PAH und PCB konzentrationsadditiv wirken. Für Untersuchungen dieser Art können in vitro-Systeme sehr nützlich sein (Sanderson et al. 1998). Sie sind weniger zeitaufwendig und tierverbrauchend als in vivo Versuche. Im aquatischen Bereich kommen Primärhepatocyten (Flouriot et al. 1995, Scholz et al. 1998, Zaleski et al. 1991) und Zellinien zum Einsatz (Hahn et al. 1993, Segner 1998a). In der

vorliegenden Arbeit wurden zwei Zellkultursysteme aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) eingesetzt. Die Auswahl fiel auf Primärhepatocyten und auf die nicht-transformierte Zellinie RTL-W1 (Lee et al. 1993) aus der gesunden Leber von Regenbogenforellen. Um die beiden Zellkultursysteme in Kombinationsexperimenten einsetzen zu können, mußten sie zunächst hinsichtlich ihres Induktionsverhaltens charakterisiert werden. Da Untersuchungen zur Wirkung von PAH im Vergleich zu der von PCB in relativ geringer Zahl vorliegen, wurden die beiden in vitro-Systeme anhand der Induktionskapazität von neun PAH charakterisiert. Desweiteren wurde das Induktionsverhalten eines exemplarischen PAH über die Zeit und der Einfluß von verschiedenen Zellkulturbedingungen auf die Induktionsantwort in beiden Systemen untersucht. Ziel dieses Vergleichs war es herauszufinden, ob sich die beiden in vitro-Systeme für Induktionsanalysen eignen und ob das aufwendige in vitro-System der Primärzellkultur eventuell durch die Zellinie ersetzt werden kann.

Kombination von in vivo- und in vitro-Systemen

Bei der Interpretation des Cocktailversuchs wurde vorausgesetzt, daß die Induktion im Halbfreiland hauptsächlich auf PAH und PCB zurückzuführen ist. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden in einem weiteren Versuch in vivo- und in vitro-Systeme kombiniert. Die EROD-Aktivität in vivo sollte mit der in vitro korrelieren, wenn alle induktionsrelevanten PAH und PCB aus dem in vivo System extrahiert und in vitro getestet werden. Dazu wurde die EROD-Aktivität in einem Teil von Lebern aus Bachforellen, die an Kontroll- oder Körschwasser exponiert waren, in vivo gemessen und der restliche Teil der Lebern nach PAH und PCB extrahiert. Der Extrakt wurde auf seine Induktionskapazität in der Zellinie RTL-W1 in vitro getestet. Eine fehlende oder schwache Korrelation kann einen Hinweis darauf geben, daß nach weiteren induktionsrelevanten oder induktionshemmenden Substanzen gesucht werden muß, wenn die Biomarkerantwort mit der Schadstoffbelastung in Beziehung gesetzt werden soll. Damit sind in vivo- und in vitro-Systeme sowie ihre Kombination wichtige Hilfsmittel, um Grundlagendaten zur Interpretation von Freilanddaten zu liefern.

2 Material und Methoden

2.1 in vivo/Freiland

Die Tierhaltung für die Expositionsversuche im Freiland wurde innerhalb des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes Valimar (Fördernummern 07OTX21-25) vom Teilprojekt „Koordination" an der Universität Tübingen (07OTX21) durchgeführt. Die diesbezüglichen Angaben sind dem BMBF-Zwischenbericht Januar 1997 entnommen. Die Exposition erfolgte im „Halbfreiland" und im Labor (siehe unten).

2.1.1 Tierhaltung im Halbfreiland

An den jeweiligen Probennahmestellen wurden Bauwagen als „Vor-Ort-Labors" eingerichtet, in denen sich jeweils fünf Aquarien à 200L befanden. Diese Systeme wurden als Bypass angelegt und kontinuierlich über Tauchpumpen mit Bachwasser versorgt (ca. 1000L/h) und zusätzlich belüftet. Die Temperatur des Wassers entsprach der des jeweiligen Gewässers. Mit dem Wasser gelangten auch Partikel und Kleinstorganismen (bis ca. 5mm) in die Aquarien. Vor der Exposition wurden Feinsediment und Steine in die Aquarien eingebracht, das Sediment blieb während der Exposition in den Aquarien. Eingetragener Grobschlamm wurde einmal wöchentlich entfernt.

2.1.2 Tierhaltung im Labor

Im Labor wurden Aquarien vergleichbarer Größe installiert, die mit Leitungswasser versorgt wurden. Die Becken wurden belüftet und die Wassertemperatur über Kühlaggregate oder Klimakammern an die jeweilige Temperatur der Bäche angepaßt. Auch die Beleuchtung wurde den Außenbedingungen soweit wie möglich angepaßt. Im Labor befand sich kein Sediment in den Aquarien.

2.1.3 Hälterung und Ernährung der Versuchstiere

In der Freilandexposition sowie in der Laborkontrolle wurden Bachforellen (*Salmo trutta* f *fario*) und Bachschmerlen (*Barbatula barbatula*) eingesetzt. Die Bachforellen stammten aus der Forellenzucht Belser, Haigerloch-Gruol. Die Bachschmerlen wurden zu Beginn des Projektes einem möglichst wenig belasteten Gewässer durch Elektrobefischung (Zoologisches Institut der Universität Hohenheim) entnommen (Schmerlengruppen S1, S2, S3 und S4, 1995 und 1996, zur Bezeichnung der Tiergruppen siehe auch 2.1.4). Ab 1997 exponierte Schmerlen stammten aus der Fischzucht Riegger, Ettenheim.

Die Forellengruppen F1 und F2 wurden mit Alma Brutfutter 2 (Botzenhard GmbH, Kempten) entsprechend 2% Körpergewicht pro Tag gefüttert. Die restlichen Forellengruppen erhielten Trouvit 16/3 fa. Milkivitt. Die Bachschmerlen wurden mit Novofect Zierfisch-

Futtertabletten (JBL, Neuhofen) entsprechend 2% des Körpergewichts pro Tag gefüttert. Zusätzlich erhielten sie einmal wöchentlich Chironomidenlarven ad libitum.

Die Tiere waren zur Zeit des Besatzes ca. 3 Monate alt, genaue Angaben zu Alter und Größe sind Tabelle 2.1 zu entnehmen. In Tabelle 2.1 ist auch die Kodierung der Fischgruppen dargestellt.

Tab. 2.1 Probennahmezeitpunkte von Oktober 1995 bis Juli 1998, die zu dem Zeitpunkt beprobten Tiergruppen, ihr Alter, durchschnittliche Länge und Gewicht bei der Entnahme, sowie ihre Expositionsdauer im Bypass. Die Angaben zu Expositionsdauer und Alter sind dem Zwischenbericht Januar 1997 entnommen.

Probennahmezeitpunkt	Tiergruppe	Länge [cm]	Gewicht [g]	Expositionsdauer	Alter
Oktober 1995 (P 05)	05F1	9.89	11.09	13 Wochen	6 Monate
Oktober 1995 (P 05)	05F2	9.67	10.37	8 Wochen	6 Monate
Oktober 1995 (P 05)	05S1	8.23	3.93	13 Wochen	18Wochen n.F.
November 1995 (P 07)	07F1	12.23	19.86	21 Wochen	8 Monate
November 1995 (P 07)	07F2	10.98	15.75	16 Wochen	8 Monate
November 1995 (P 07)	07S2	8.66	4.59	15 Wochen	16 Wochen n.F.
Juli 1996 (P 14)	14F3	7.14	4.49	12 Wochen	6 Monate
Juli 1996 (P 14)	14F4	6.78	3.99	6 Wochen	6 Monate
September 1996 (P 16)	16F3	9.75	11.61	20 Wochen	8 Monate
September 1996 (P 16)	16S3	9.44	5.81	12 Wochen	19 Wochen n.F.
September 1996 (P 16)	16S4	8.29	4.09	12 Wochen	12 Wochen n.F.
Juli 1997 (P 26)	26F5	6.94	4.07	7 Wochen	6 Monate
Juli 1997 (P 26)	26S5	9.15	5.91	7 Wochen	7 Wochen n.L.
November 1997 (P 30)	30F5	12.35	24.27	24 Wochen	10 Monate
November 1997 (P 30)	30S5	10.37	9.04	24 Wochen	24 Wochen n.L.
Mai 1998 (P 36)	36F5	16.17	42.41	1 Jahr	16 Monate
Juli 1998 (P 38)	38F7	6.55	3.33	8 Wochen	7 Monate
Juli 1998 (P 38)	38S7	8.12	3.98	8 Wochen	1,5 Jahre

P = Probennahme, n.F. = nach Fang, n.L. = nach Lieferung

2.1.4 Probennahmestellen/Probennahmen/Codes

Die Fische wurden im Bypass an das Wasser zweier Bäche exponiert. Bei den Untersuchungsgewässern handelte es sich um den Krähenbach und die Körsch im Großraum Stuttgart. Die Schadstofffracht beider Bäche setzte sich hauptsächlich aus Schwermetallen, PAH, PCB und Pestiziden zusammen. Der Hauptunterschied in der Belastung der beiden Gewässer lag in der Pestizidfracht, die in der Körsch deutlich höher war (siehe dazu auch Tabelle 3.2 in Kapitel 3). Der Eintrag von Pestiziden erfolgte über Oberflächenablauf der landwirtschaftlich stark genutzten anliegenden Flächen. Zusätzlich wurde die Körsch im Gegensatz zum Krähenbach durch Kläranlageneinleitungen belastet. Der Eintrag von PAH und PCB in die beiden Gewässer erfolgte wahrscheinlich aus der Luft (Nähe zum Stuttgarter Flughafen). Die beiden Probennahmestellen wurden mit Körsch A (KA) und Krähenbach E (KE) bezeichnet. Physikalisch-chemische Daten zu den beiden Gewässern sind Tabelle 3.1 in Kapitel 3 zu entnehmen.

Die Probennahmen erstreckten sich über einen Zeitraum von vier Jahren (1995-1998). Beprobt wurde von Oktober 1995 bis Juli 1998. Innerhalb des Projektes Valimar wurden monatlich physikalisch-chemische Daten zu den Untersuchungsgewässern erhoben, die biologischen Probennahmen erfolgten nur in den Monaten Mai, Juli, September, Oktober und No-

vember. Die Probennahmen wurden insgesamt von 05 bis 38 durchnumeriert. Für eine biologische Probennahme wurden Forellen und Schmerlen eingesetzt, die als unterschiedliche Tiergruppen bezeichnet und dementsprechend mit arabischen Ziffern gekennzeichnet wurden. Aus der Numerierung der Probennahmen und den Ziffern der verschiedenen Tiergruppen ergab sich der Code. Die Kodierung 05F1 bedeutet z.B. Forellengruppe 1 zur Probennahme 05 (S1 bedeutet entsprechend Schmerlengruppe 1). In Tabelle 2.1 sind die Probennahmezeitpunkte, die zu dem Zeitpunkt beprobten Tiergruppen und ihre Expositionsdauer im Bypass dargestellt.

2.1.5 Tier- und Mikrosomenpräparation

Die Bachforellen und Bachschmerlen wurden mit einer Überdosis des Betäubungsmittels Benzocain (4g/Liter Brauchwasser) getötet. Die Bauchdecke wurde so geöffnet, daß Perikard und Leber leicht zugänglich waren. Eine Kanüle wurde in das Herz des Fisches eingeführt, der Blutkreislauf zwischen Leber und Herz durchtrennt und das Tier mit NaCl-Lösung solange durchspült, bis die Leber vollständig entfärbt war. Anschließend wurde die Leber entnommen, gewogen, und in 2ml eiskaltem Homogenisationspuffer mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator bei 300rpm homogenisiert. Für ein Homogenat wurden soviele Lebern gepoolt, bis ein Naßgewicht von mindestens 100mg erreicht war. Für die Präparation der Mikrosomen wurde das Homogenat 20min bei 10000*g und der daraus resultierende Überstand 1h bei 100000*g zentrifugiert. Der zweite Überstand (Cytosol-Fraktion) wurde abgenommen und für die Messung der GST sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das 100000*g-Sediment (Mikrosomen-Fraktion) wurde in 90µL Homogenisationspuffer aufgenommen und dann ebenfalls sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben nicht länger als acht Wochen bei –80°C gelagert.

Homogenisationspuffer, pH 7,4
- 2 M Sucrose
- 20 mM Mops
- 10 mM /1% EDTA/Ethanol
- 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
- 1 mM Epsilon-Aminocapronsäure
- 0,3 M Mercapto-Ethanol
- 0,02 mM Dithiotreitol (DTT)

2.1.6 Biochemische Nachweismethoden

2.1.6.1 Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Aktivität in Mikrosomen

Die katalytische Aktivität von Cytochrom P4501A in Mikrosomen aus Leberhomogenat wurde fluorimetrisch als Aktivität der Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) gemessen. Dabei wird die Umsetzung des künstlichen Substrates 7-Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin bestimmt. Die Methode geht auf Burke und Mayer (1974) zurück. Die Reaktion wurde durch Mischung von Probe und Reaktionsmischung gestartet.

Die Messung erfolgte in undurchsichtigen, weißen 96well Platten (Labsystems Finland). Pro well wurden 5-10µL unverdünnte Probe pipettiert (ca 2mg/ml Proteingehalt) und 250µL

Reaktionsmischung dazugegeben. 1ml Reaktionsmischung bestand aus 990µL Phosphatpuffer, pH 7,8, 10µL von 50µM 7-Ethoxyresorufin-Lösung in Methanol und 0,04mg NADPH. Die Bildung von Resorufin wurde über 3min bei 544nm Anregung (exc) und 590nm Emission (em) gemessen. Die Normierung der EROD-Aktivität erfolgt auf die Proteinmenge in der Probe, die Enzymaktivität wird in pmol gebildetes Resorufin/min und mg Protein der Probe angegeben.

Phosphatpuffer, pH 7,8
0,08 M Na_2HPO_4
0,02 M KH_2PO_4
0,15M KCl

Reaktionsansatz

Stammlösung	Ansatz im Assay	Konzentration im Assay
PBS, pH 7,8	990µL PBS	PBS
50µM 7-Ethoxyresorufin (ER) in Methanol	10µL ER	0,5µM ER
NADPH	0,04 mg NADPH	47µM NADPH

Standardkurve

Zur Ermittlung einer Resorufin-Standardkurve wurde eine 0,02mM Stammlösung von Resorufin in Phosphatpuffer hergestellt und 1:100 verdünnt. Von der verdünnten Lösung wurden 2,5µL bis 30µL als Standards eingesetzt, das entspricht absolut 0,0005nmol bis 0,006nmol Resorufin pro Standard. Die Stammlösung wurde für jede Messung neu angesetzt.

Eine typische Standardkurve für Resorufin, ermittelt bei einer 40fachen Signalverstärkung mit einem SLT-Plattenreader, wurde durch die Regression $y = 1470,5\ x + 1,39$ beschrieben, x in nmol.

2.1.6.2 Proteinkonzentration in Mikrosomen oder Cytosol

Die Bestimmung des Proteingehalts in Mikrosomen oder Cytosol erfolgte spektrophotometrisch modifiziert nach Lowry et al. 1951 mit einem Kit der Firma Bio-Rad (Bio-Rad DC Protein Assay). Das Protein (hauptsächlich die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan) reagiert mit Kupfer, im darauffolgenden Schritt wird ein Folin-Reagenz reduziert, welches bei 690nm meßbar ist. Als Proteinstandard wurde BSA verwendet. Eine typische Standardkurve wird durch die Regression $y = 0,13\ x + 0,03$ beschrieben (SLT-Plattenreader).

2.1.6.3 Cytochrom P4501A-Gehalt in Mikrosomen (ELISA)

Der relative Gehalt an Cytochrom P4501A1 wurde mit einem direkten ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) nach Scholz (1996) bestimmt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit einer festgelegten Konzentration an Probenprotein inkubiert und mit spezifischem und Peroxidase-konjugiertem Antikörper nachgewiesen. Im direkten ELISA ist die Färbeintensität proportional zur Menge des Antigens in der Probe. Die Extinktion wird durch ein ABTS

(2,2`-Azino-di-[ethylbenzothiazolinsulfonat(6)], Ammoniumsalz)-produkt hervorgerufen, das im letzten Schritt durch die Peroxidase-Aktivität gebildet wird.

Vorbereitung

Nach der Bestimmung der EROD-Aktivität (Kap. 2.1.6.1) wurden die Mikrosomen mit Beschichtungspuffer (50mM $NaHCO_3$) auf eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml verdünnt. Von diesen Lösungen wurden je 100µL in ein well einer Mikrotiterplatte (96well, Falcon, Flexible Assay Plate) pipettiert (3fach Bestimmungen). Als „Blank" wurde 100µL Phosphatpuffer in drei wells pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Durchführung

Vor den folgenden Schritten wurden die Mikrotiterplatten jeweils 3 mal mit 200µL pro well 0,1% Tween 20 in Phosphatpuffer (PBS) gewaschen. Jede Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Phosphatpuffer, pH 7,4
- 0,13M NaCl
- 2,68mM KCl
- 0,01M Na_2HPO_4
- 0,001M KH_2PO_4

1. Die Platten wurden mit 200µL Blocklösung (1% Albumin bovine faction V (Serva) in PBS) pro well für 2h inkubiert.

2. Inkubation der Platten mit dem spezifischen Antikörper (100µL/well, 1h). Für die Bachforellen wurde der spezifische monoklonale Antikörper (Zellkulturüberstände aus Hybridomazellkulturen, Scholz et al. 1997) 1:10 in PBS verdünnt. Für die Bachschmerlen wurde der gereinigte polyklonale Antikörper BN-1 (Biosense Laboratories, Norwegen) 1 : 250 in PBS verdünnt.

3. Inkubation der Platten mit Peroxidase (POD)-konjugiertem Antikörper (100µL/well, 1h, DAKO, Dänemark). Für beide Fischarten wurde der Antikörper 1 : 500 in Blocklösung verdünnt. Bei der Bachforelle wurde „rabbit anti mouse", bei der Bachschmerle „goat anti rabbit" verwendet.

4. Inkubation der Platten mit ABTS-Lösung (100µL/well, exakt 30 min).

   ABTS-Lösung, pH 4,5
   100 mM 2,2'-Azino-di-[ethylbenzothiazolinsulfonat(6)], Ammoniumsalz (ABTS)
   115 mM Na-Acetat ($C_2H_3NaO_2*3H_2O$)
   50 mM Na_2HPO_4
   1µL/ml 30%ige H_2O_2
   pH mit Essigsäure einstellen

5. Messung der Platten. Die relative Menge von CYP1A1 wurde über die Färbung des durch die Peroxidase-Aktivität entstandenen ABTS-Abbauprodukts bestimmt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 490nm und einer Referenzwellenlänge von 405nm gemessen. Die Ergebnisse wurden als OD-Werte angegebenen, der OD-Wert der Blindprobe (nur Puffer) wurde von denen für die Proben abgezogen.

2.1.6.4 Glutathion-S-Transferase (GST) im Cytosol

Die Messung der Aktivität der Glutathion-S-Transferase erfolgte spektrophotometrisch nach Habig et al. (1974) mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) als Substrat. Die Enzymaktivität wurde über die Bildung eines Glutathionkonjugats mit CDNB gemessen (Absorptionsänderung bei 340 nm), die Reaktion wurde durch Zugabe von Glutathion gestartet.

Die Messung erfolgte in 96well Platten (Greiner). Pro well wurden 6µL Probe (unverdünntes Cytosol, 3fach Bestimmung) und 230µL eines Reaktionsgemisches bestehend aus Kaliumphosphatpuffer (218,75µL) und dem Substrat CDNB (12,5µL) pipettiert. Die Reaktion wurde mit 12,5µL/well Glutathionlösung (reduziertes Glutathion) gestartet und die Veränderung der Absorption über drei Minuten bei 340 nm bestimmt. Die Aktivität der Glutathion-S-Transferase wird auf den Proteingehalt der Probe normiert, die Angabe erfolgt in nmol gebildetes Konjugat/min und mg Protein.

0,1M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5
69,6 mM KH_2PO_4
30,4 mM K_2HPO_4

Reaktionsansatz

Stammlösung	Ansatz im Assay	Konzentration im Assay
0,1M Kaliumphosphatpuffer	218, 75µL	0,1M Kaliumphosphatpuffer
20 mM CDNB-Lösung n Methanol	12,5µL	1mM CDNB-Lösung (max 5% Methanol im Assay)
0,1M Glutathion-Lösung in Kaliumphosphatpuffer	12,5µL	5mM Glutathion-Lösung

2.1.7 Cocktailversuch

Um die im Halbfreiland gemessene Biomarkerantwort kausal auf die Schadstoffbelastung der beiden Bäche zurückführen zu können, wurde 1997 im Rahmen des Projektes Valimar ein „Cocktailversuch" („Cocktail" aus mehreren Schadstoffen) durchgeführt. Dazu wurden Bachforellen in einem Durchflußsystem kontinuierlich gegenüber drei Konzentrationen eines Cocktails exponiert, dessen Zusammensetzung und einfache Konzentration auf der Basis von Schadstoffdosen in Tieren aus der Körsch und den Bioakkumulationsfaktoren der jeweiligen Stoffe berechnet wurde. Die Schadstoffdosen in den Fischen wurden chemisch analysiert und über den log-Kow der jeweiligen Substanz die Konzentration berechnet, die im Wasser vorhanden sein muß, damit dieselbe Schadstoffdosis nach vier Wochen Exposition im Fisch wieder erreicht wird. Um eine Dosisabhängigkeit der Biomarkerantwort zu ermitteln, wurde zusätzlich zum einfachen Cocktail ein zehn und fünfzigfach konzentrierter Cocktail getestet.

Nach der vierwöchigen Exposition wurden die Tiere präpariert (siehe Mikrosomenpräparation) und die Biomarkerantwort ermittelt (EROD, ELISA, GST).

2.1.8 Extraktversuch

Um zu zeigen, ob die im Halbfreiland gefundene Biomarkerantwort auf die Induktion durch die Stoffgruppen PAH und PCB zurückzuführen ist, wurde ein Extraktversuch durchgeführt. Dazu wurden in vivo- und in vitro-Systeme kombiniert. Sechs Bachforellen wurden an das Wasser der Körsch exponiert, sechs weitere Tiere dienten als Kontrolle. Die Tiere wurden wie in Kapitel 2.1.5 präpariert, dabei wurden aber nur aus einer Hälfte der Leber Mikrosomen präpariert und die EROD-Aktivität in vivo gemessen (siehe auch Kap. 2.1.6.1). Aus der anderen Hälfte der Leber wurde ein PAH/PCB-Extrakt nach der Methode von Schwirzer et al. (1998) in Zusammenarbeit mit Anja Markmann und Dr. K.-W. Schramm an der GSF-München hergestellt. Die Leberproben wurden 24h gefriergetrocknet und anschließend je 0,2g Leber mit 7g Na_2SO_4 verrieben. In eine Glassäule wurde Na_2SO_4 gegeben und darauf die mit Na_2SO_4 verriebene Leber geschichtet. Das Gemisch wurde kalt und über mehrere Stunden mit 200ml Dichlormethan/Cyclohexan (1:1) extrahiert. Der Extrakt wurde in einem Rundkolben aufgefangen und im Wasserbad bei 60°C und 350mbar Vakuum auf ca. 10ml eingeengt. Dieser Rest wurde mit Stickstoff abgeblasen und in 50µL DMSO überführt. In DMSO kann der Rohextrakt in der Zellkultur getestet werden. Dazu wurden der unverdünnte Extrakt sowie jeweils vier 1:2-Verdünnungen getestet (0,1% DMSO im Kulturmedium). Die Testung der Extrakte auf ihre CYP1A-Induktionskapazität erfolgte in vitro mit der Zellinie RTL-W1. Die Bestimmung der EROD-Aktivität in vitro wurde mit der Methode des Live Cell Assays durchgeführt (Kap. 2.2.6.1). Unter der Annahme, daß hauptsächlich PAH und PCB im Halbfreiland als Induktoren wirkten, sollten die EROD-Antworten in vivo mit denen in vitro linear korrelieren.

2.1.9 Statistik

Ob eine im Freiland ermittelte Biomarkerantwort (katalytische CYP1A-Aktivität, Induktion des CYP1A-Proteins, oder die Aktivität der Glutathion-S-Transferase) von der Antwort in der Laborkontrolle signifikant abweicht, wurde über den U-Test nach Mann-Whitney getestet. Als Statistikprogramm wurde SPSS for Students verwendet.

2.2 in vitro

2.2.1 Tierhaltung für die Isolierung von Primärhepatocyten

Die Haltung 200-300g schwerer Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) erfolgte am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Chemische Ökotoxikologie. Die Tiere stammten jeweils von Fischzüchtern aus der Umgebung (Fischzucht Machern und Fischhandel Pistor, Espenhain) und wurden einmal täglich mit Fischfutter der Firma Aqua Food A/S gefüttert, so daß das Futter innerhalb weniger Minuten aufgefressen wurde. Die Hälterung erfolgte in gefiltertem, entchlortem Brauchwasser unter ständiger Belüftung mit Druckluft im Durchflußsystem (2L/min). Pro 550 Liter wurden maximal 10 Forellen gehalten.

Die Wassertemperatur betrug ca 12°C im Winter und maximal 18°C im Sommer. Die Gesamtwasserhärte lag bei 13,4°dH, die Karbonathärte bei 5°dH.

2.2.2 Isolierung von Primärhepatocyten

Die Isolierung und Kultur der Primärhepatocyten wurde nach Scholz (1996) durchgeführt. Eine 200-300g schwere Regenbogenforelle wurde durch eine Überdosis Benzocain (4g/L Brauchwasser) getötet und äußerlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Danach erfolgte sofort eine Injektion von 200µL Heparin (1000U/ml Präperfusionslösung) in die Schwanzvene, um eine Blutgerinnung während der Präparation zu verhindern. Die weitere Präparation erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Dazu wurde die Forelle ventral vom After in Richtung Kiemendeckel und seitlich mit einer Präparierschere geöffnet und Teile der Körperwand soweit entfernt, daß Leber und Perikard gut erreichbar waren. Eine Flügelkanüle (0,65 mm ⌀) wurde in die Leberpfortader eingeführt und mit Hilfe einer kleinen Arterienklemme fixiert. Die Einführung in die Pfortader kann entweder direkt an der Leber oder im Bereich des Darms vorgenommen werden. Letzteres hat den Vorteil, daß die Präparation bei Verletzung des Gefäßes ein weiteres mal in Richtung Leber wiederholt werden kann. Nach erfolgreicher Präparation wurde das Herz aufgeschnitten und die Leber für 10 min mit Präperfusionslösung bei einer Flußrate von 0,2ml/min zur Entfernung des Bluts gespült. Die Präperfusionslösung ist kalziumfrei, um die Zellverbindungen zu lösen. Sie wurde wie alle weiteren Lösungen während der Perfusion auf 17°C temperiert. Nach der Präperfusion wurde die Perfusion mit Collagenase-haltigem, serumfreiem Kulturmedium (0,01% Collagenase) für 15 min fortgesetzt. Um die Collagenase aus der Leber zu entfernen, erfolgte anschließend 2min eine Spülung mit serumfreiem Medium.

Alle weiteren Schritte erfolgten unter Eiskühlung. Die Leber wurde aus dem Fisch entfernt, die Gallenblase abgetrennt, und die Leber vorsichtig mit Kulturmedium gespült. Danach wurde sie in einer Petrischale mit einer sterilen Rasierklinge in Würfel von ca $1mm^3$ geschnitten. Die Leberstücke wurden vorsichtig durch 250µm (PE250-66GG), 100µm (07-100/32) und 54µm (07-54/24) Gaze der Schweizer Firma Estal Mono gefiltert und jedesmal mit Medium nachgespült. Nur im ersten Filterschritt wurden die Zellen mechanisch mit einem runden Glasstab durch die Gaze gedrückt. Die Suspension wurde 3mal bei 50g für 3min zentrifugiert und mit Medium resuspendiert. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Leberzellen in Kulturmedium mit 5% Serum, 2mM Glutamin, 10 U/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin aufgenommen. Zur Aussaat wurde der Zelltiter auf 1,0 bis $1,5*10^6$ Zellen/ml eingestellt und 400µL in jedes well einer mit Matrigel beschichteten 24well-Platte gegeben (Kap. 2.2.3). Die Leberzellen wurden bei 15°C und 80% relativer Luftfeuchte inkubiert. Ein vollständiger Austausch des Mediums erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, alle 24h.

Präperfusionslösung, pH 7,8, steril
- 10 mM HEPES (Serva)
- 0,5 mM Na_2HPO_4
- 3 mM KCl
- 150 mM NaCl

Kulturmedium (HMEM-Medium), pH 7,5, steril
- 137 mM NaCl
- 5,4 mM KCl

0,34 mM Na_2HPO_4*2 H_2O
0,44 mM KH_2PO_4
0,8 mM $MgSO_4$*7 H_2O
1,26 mM $CaCl_2$*2 H_2O
4 mM $NaHCO_3$
20 mM HEPES
2mM L-Glutamin
10 U/ml Penicillin
10 µg/ml Streptomycin
20 ml/L MEM Aminosäuren (Biochrom)
10 ml/L MEM Vitamine (Biochrom)
10 ml/L BME Aminosäuren (Biochrom)

Collagenase-Lösung, steril
10mg Collagenase D (Boehringer Mannheim) in 100ml Kulturmedium

2.2.3 Matrigelbeschichtung

Zur besseren Haftung der Primärhepatocyten wurden Kulturplatten (Primaria, Falcon, 24well) mit einer Lösung von Matrigel (Becton Dickinson, phenolrotfrei) in Kulturmedium beschichtet. Dazu wurde das Matrigel auf einen Proteingehalt von 0,1mg Protein/ml Medium eingestellt und jedes well einer 24er Lochplatte mit 200µL der eiskalten Lösung benetzt. Die Platten wurden unter sterilen Bedingungen ohne Abdeckung für 1h getrocknet, danach wurde die verbleibende Matrigellösung entfernt und die Platten mit Kulturmedium gespült. Wenn die Platten nicht sofort verwendet wurden, wurden bis zur Zellaussaat 200µL Medium in jedes well gefüllt, die vor der Zellaussaat wieder entfernt wurden. Bis zur Aussaat der Primärhepatocyten wurden die Kulturplatten bei 4°C maximal eine Woche gelagert.

2.2.4 Kultivierung und Induktion der Primärhepatocyten

Nach der Aussaat wurden die Primärhepatocyten bei 15°C und 80% relativer Luftfeuchte inkubiert. Während der ersten 24h der Kultur erfolgte die Inkubation zur besseren Anheftung und Reaggregation der Zellen in Kulturmedium mit 5% fötalem Kälberserum. Anschließend wurde das Inkubationsmedium gegen serumfreies, schadstoffhaltiges Medium ausgetauscht (400µL/well). Zuzugebende Schadstoffe wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in Kulturmedium verdünnt (0,1% DMSO). Während der weiteren Inkubation wurde das Medium alle 24h komplett ausgetauscht. In Kapitel 5 wird ein Versuch beschrieben, in dem die Zellen über 48h mit Schadstoffen inkubiert wurden. Dabei erfolgte kein Wechsel des Mediums.

2.2.5 Kultivierung und Induktion der Zellinie RTL-W1

Die Zellinie RTL-W1 (Rainbow trout liver-Waterloo 1) stammt aus einer nicht transformierten Leber einer Regenbogenforelle. Sie wurde an der Universität von Waterloo, Kanada, in der Arbeitsgruppe von Dr. N.C. Bols entwickelt und von Lee et al. (1993) beschrieben. Die RTL-W1-Zellen werden in 75ml Kulturflaschen (Nunclon™) in L-15-Leibovitz-Medium (Biochrom), supplementiert mit 5% fötalem Kälberserum (Biochrom oder Sigma), 2% Penicillin/Streptomycin (10IU/10µg/ml, Biochrom) und 2mM Glutamin (Sigma) bei 20°C kulti-

viert. Zur Passage werden die Zellen mit Trypsin (Seromed, 0,05% Trypsin/0,02% EDTA) vom Untergrund abgelöst und von einer auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt. Die Zellen benötigen ca 5 Tage bis zur Konfluenz (ca 5-6*10^7 Zellen/75cm^2). Zur Inkubation der RTL-W1 Zellen mit Schadstoffen wurden pro well einer 48 well Platte (Falcon) 30000 Zellen in 500µL Kulturmedium ausplattiert und 3 Tage ohne Mediumwechsel bis zur Konfluenz in jedem well kultiviert. Danach erfolgte der Wechsel zu schadstoffhaltigem Medium. Die Schadstoffe wurden in DMSO gelöst und in Kulturmedium verdünnt (0,1% DMSO). Im Gegensatz zu den Primärhepatocyten erfolgt die Inkubation von RTL-W1-Zellen mit Schadstoff in serumhaltigem Medium.

2.2.6 Biochemische Nachweismethoden

2.2.6.1 Ethoxyresorufin-O-Deethylase und Protein in der intakten Zelle (Primärhepatocyten und RTL-W1): „Live Cell Assay"

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität von Cytochrom P4501A in Leberzellen wurde wiederum die Aktivität der Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) fluorimetrisch bestimmt. Das Prinzip ist dasselbe wie bei der Messung der EROD-Aktivität in Mikrosomen (Umsetzung des künstlichen Substrates 7-Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin). Die Mikrosomenpräparation entfällt jedoch, die EROD-Aktivität wird in den intakten Zellen in den 24- oder 48-well Kulturplatten bestimmt. Dazu wird 7-Ethoxyresorufin-haltiges Medium auf die Zellen gegeben (Reaktionsstart), die Zugabe von NADPH entfällt. Das zelleigene NADPH ist für die Dauer des Assays (20min) ausreichend (Behrens et al. 1998). Im Assay mit Primärhepatocyten muß neben dem Substrat Dicumarol zugegeben werden, um die cytosolische DT-Diaphorase zu hemmen. Dieses Enzym kann die Fluoreszenz von Resorufin reduzieren und damit das Ergebnis verfälschen (Lubet et al. 1985). In RTL-W1-Zellen hat die Zugabe von Dicumarol keinen Einfluß auf das Ergebnis der EROD-Aktivität. Die Normierung der EROD-Aktivität erfolgt auf das Gesamtprotein der Zellen. Die Proteinmenge wird dazu fluorimetrisch durch Zugabe von Fluorescamin bestimmt. Fluorescamin selbst ist nicht fluoreszent, bildet aber mit primären aliphatischen Aminosäuren ein fluoreszierendes Derivat (Udenfriend et al 1972, De Bernardo et al 1974). Die EROD-Aktivität wird in pmol gebildetes Resorufin /min und mg Zellprotein angegeben.

Durchführung des EROD-Assays mit Primärhepatocyten (24well) oder RTL-W1-Zellen (48well)

Nach der Inkuabtion wird das schadstoffhaltige Medium abgenommen, die Zellen werden mit 250µL Phosphatpuffer/well gespült und das Reaktionsmedium aus Dulbecco's Medium mit 7-Ethoxyresorufin (8µM, 0,5% Methanol im Medium) und Dicumarol (10µM, 0,1% DMSO im Medium, nur im Assay mit Primärhepatocyten) wird zugegeben. Nach der Zugabe des Mediums erfolgt sofort die Messung der Resorufinmenge beim Zeitpunkt t = 0min (exc 544nm/em 590nm). Anschließend werden die Kulturplatten im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt und zu den Meßzeitpunkten t = 15min und t = 20min wiederholt gemessen. Danach wird das Medium abgenommen, die Zellen mit 250µL Phosphatpuffer/well gewaschen und es werden 250µL destilliertes Wasser pro well hinzugegeben. Man läßt die Platten ca 10min stehen und friert sie dann bis zur Bestimmung des Proteins bei –80°C ein. Die Zugabe von destilliertem

Wasser sowie das Einfrieren dienen dem Aufbrechen der Zellen, um das gesamte Zellprotein für die Proteinbestimmung zugänglich zu machen.

Reaktionsansatz

Stammlösungen	Ansatz im Assay	Konzentration im Assay
Dulbecco's modiefied Eagle's Medium, phenolrotfrei (Sigma)	994µL	
1600µM 7-Ethoxyresorufin in Methanol	5µL	8µM
10mM Dicumarol in DMSO	1µL	10µM

Phosphatpuffer (PBS), pH 7,5
2,68mM KCl
1,46mM KH_2PO_4
0,13M NaCl
8,10mM Na_2HPO_4

Standardkurven für Resorufin

Für die Resorufin-Standardkurve wird eine 0,02mM Lösung von Resorufin in PBS angesetzt und unverdünnt eingesetzt. Von dieser Lösung entsprechen 3µL bis 15µL 60pmol bis 300pmol Resorufin. Eine typische Standardkurve bei 40facher Verstärkung in einer 24well-Platte, gemessen mit einem SLT-Plattenreader, wird durch die Regression $y = 0{,}00378\ x + 0{,}1$ beschrieben.

Durchführung des Proteinassays

Zur Bestimmung des gesamten Zellproteins werden die Zellkulturplatten aufgetaut und in jedes well wird 500µL PBS gegeben. Dann werden pro well 250µL einer 1,07mM Fluorescamin-Lösung in Aceton zugegeben und die Platten geschüttelt. Nach exakt 5min wird die Fluoreszenz bei 355nm (exc.) und 460nm (em.) bestimmt.

Standardkurven für Protein

Für die Protein-Standardkurve wird eine BSA (Rinderserumalbumin)-Lösung von 12,8mg/ml Phosphatpuffer angesetzt und in 1:2-Schritten verdünnt. Von den Lösungen werden jeweils 10µL als Standards eingesetzt. Eine typische Standardkurve bei 10facher Verstärkung in einer 24well-Platte, gemessen mit einem STL-Plattenreader, wird durch die Regression $y = 3{,}004\ x + 0{,}09$ beschrieben.

2.2.6.2 Ethoxyresorufin-O-Deethylase und Protein in der aufgebrochenen Zelle: „Stop-Assay"

Der „Stop-Assay" nach Kennedy et al (1995) ist dem „Live Cell Assay" sehr ähnlich. Tatsächlich beruht der „Live Cell Assay" auf diesem „Stop-Assay". Es bestehen folgende Unterschiede zum Live Cell Assay: Beim Stop-Assay wird nach der Inkubation der Zellen das

schadstoffhaltige Medium abgenommen, die Zellen werden mit PBS gespült (der Puffer wird wieder abgenommen) und die Zellkulturplatten werden sofort schockgefroren. Dies kann entweder auf Trockeneis oder flüssigem Stickstoff erfolgen. Bis zur Bestimmung der EROD-Aktivität können die Platten bei –80°C aufgehoben werden. Die Bestimmung der EROD-Aktivität erfolgt unter Zugabe von NADPH, aber ohne Dicumarol. Die Reaktion wird nach 7 min durch Zugabe von Fluorescamin in eiskaltem Acetonitril gestoppt. Die gebildete Menge an Resorufin und Fluorescaminderivat können 15 min später bei 544nm exc./590nm em. und 355nm exc./460nm em. gemessen werden.

Durchführung

Die Platten werden ca. 10min aufgetaut. Danach werden pro well einer Zellkulturplatte 250µL Phosphatpuffer und 100µL 7-Ethoxyresorufinlösung zugegeben und die Platten für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt die Messung des Zeitpunktes t = 0min. Durch Zugabe von 50µL/well der NADPH-Lösung in Phosphatpuffer wird die Reaktion gestartet. Nach 7 min wird die Reaktion durch Zugabe von 300µL eiskalter Fluorescaminlösung in Acetonitril gestoppt. Die Messungen des gebildeten Resorufins und des Proteingehaltes erfolgen nach weiteren 15 min.

Reaktionsansatz

Stammlösungen	Ansatz im Assay	Konzentration im Assay
Phosphatpuffer (PBS), pH 7,5	250µL	
35µM 7-Ethoxyresorufin in PBS	100µL	8,75µM
0,24mM NADPH in PBS	50µL	0,03mM
0,53mM Fluorescamin in Acetonitril	300µL	0,22mM

Phosphatpuffer (PBS), pH 7,5
- 2,68mM KCl
- 1,46mM KH_2PO_4
- 0,13M NaCl
- 8,10mM Na_2HPO_4

Standardkurve für Resorufin

Die Standardkurve für Resorufin wird angesetzt wie oben beschrieben (Live Cell Assay, Kap. 2.2.6.1. Eine typische Standardkurve bei 40facher Verstärkung in einer 24well-Platte, gemessen mit einem SLT-Plattenreader, wird durch die Regression $y = 0{,}0038\ x + 0{,}1$ beschrieben.

Standardkurve für Fluorescamin

Das Ansetzen der Proteinstandards erfolgt wie in Kapitel 2.2.6.1. Eine typische Standardkurve bei 15facher Verstärkung in einer 24well-Platte, gemessen mit einem SLT-Plattenreader, wird durch die Regression $y = 1{,}009\ x + 0{,}009$ beschrieben.

2.2.7 Statistik

Die Abweichung der EROD-Aktivität von der Lösungsmittelkontrolle nach der Exposition an Schadstoffe wurde mit einer Einfaktoriellen Varianzanalyse (One way ANOVA) und dem Dunnett`s Test getestet ($p < 0,001$). Beim Test, ob Serum einen Einfluß auf die durch verschiedene Konzentrationen eines Schadstoffs hervorgerufenen EROD-Aktivitäten hat, wurde eine Zweifaktorielle Varianzanalyse (Two Way ANOVA) mit dem Tukey-Test durchgeführt.

2.3 Chemikalien

Anthracen, 97% (Aldrich)
Benz(a)anthracen, 99% (Aldrich)
11H-Benzo(b)fluoren, 98% (Aldrich)
Benzo(a)pyren, 98% (Aldrich)
Chrysen, 98% (Aldrich)
Fluoranthen, 98% (Aldrich)
Phenanthren, 98% (Aldrich)
Pyren, 99% (Aldrich)
3-Methylcholanthren, 98% (Aldrich)
3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126), 97% (Ultra Scientific)

Collagenase D (Boehringer Mannheim)
CDNB (Sigma)
Dicumarol (3,3'-Methylene-bis(4-Hydroxycoumarin), Sigma)
Ethoxyresorufin (Sigma)
Fluorescamin (Sigma)
Heparin (Sigma)
Matrigel, phenolrotfrei (Becton Dickinson)
Resorufin (Sigma)

Verwendete Salze und Lösungsmittel stammen von Merck oder Serva.

3 Regulierung von CYP1A in vivo

3.1 Einleitung

Die Induktion von Biotransformationsenzymen wird seit den siebziger Jahren als Biomarker eingesetzt. Mit ihrer Hilfe, insbesondere unter Einsatz der Induktion von CYP1A, wurden meistens Schadstoffeinträge aus Punktquellen detektiert. Mit der graduellen Abnahme der Schadstoffkonzentration nahm auch die Biomarkerantwort ab (Courtenay et al. 1993, Förlin und Celander 1993, Soimasuo et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Induktion von Biotransformationsenzymen auch dazu eingesetzt werden kann, zwischen aquatischen Standorten zu unterscheiden, deren Belastungsmuster durch diffuse Schadstoffeinträge gekennzeichnet ist und deren Belastung relativ gering ist. Hier stellte sich insbesondere die Frage, ob die Induktion von CYP1A als spezifisch auf Xenobiotika reagierender Biomarker geringe Belastungsunterschiede auflösen kann, oder ob die Induktion durch Faktoren wie Geschlecht, Sexualzyklus, Ernährungszustand oder Temperatur überlagert wird.

In Bezug auf das Geschlecht und den Sexualzyklus kann die katalytische Aktivität von CYP1A z.B. durch Östradiol gehemmt werden (Goksøyr und Husøy 1992). Dementsprechend finden einige Autoren höhere Biomarkerantworten in Männchen im Vergleich zu Weibchen (Eggens et al. 1996, Larsen et al. 1992, Stegeman und Hahn, 1994). Allerdings konnte in einer Biomarkerstudie über die Wirkung von Substanzen, die in der Umgebung von Ölplattformen in der Nordsee auftreten, auch das Gegenteil beobachtet werden (Stagg et al. 1995). Der Ernährungszustand der Untersuchungsorganismen beeinflußt die Biomarkerantwort insofern, als die Nahrung induzierende oder hemmende Substanzen enthalten kann (Vigano et al. 1993). Der Hungerzustand scheint hingegen keinen Einfluß auf die Induzierbarkeit von CYP1A zu haben (Andersson 1986, Vigano et al. 1993). Um den Einfluß von Sexualzyklus und Ernährungszustand auf die Induktion von CYP1A weitestgehend zu eliminieren, wurden in der hier durchgeführten Freilandstudie juvenile Tiere in einem kontrollierten Bypasssystem an das Wasser zweier Untersuchungsgewässer exponiert.

Während der Einfluß von Geschlecht und Sexualzyklus vermindert werden kann, ist ein möglicher Einfluß der Temperatur auf die Biomarkerantwort, der den durch Schadstoffe ausgelösten Effekt überlagern könnte, nicht auszuschließen. Fische passen ihre CYP1A-Aktivität an die wechselnden Außentemperaturen an. Sie weisen bei niedrigeren Temperaturen höhere Enzymaktivitäten auf (Ankley et al. 1985, Goksøyr 1987). Dabei ist allerdings zu beachten, daß die temperaturbedingten Veränderungen in der CYP1A-Grundaktivität zu unterschiedlichen Jahreszeiten nicht auftreten, wenn die Aktivität bei den Temperaturen gemessen wird, an die die Fische akklimatisiert waren (Blanck et al. 1989). Neben dem Einfluß auf die Grundaktivität kann die Temperatur aber auch Einfluß auf die Induktionsantwort haben. Unter dem Einfluß von Schadstoffen haben Andersson und Koivusaari (1985) beobachtet, daß warm-akklimatisierte Fische eine geringere Induktionsantwort von CYP1A aufweisen als kalt-akklimatisierte Fische. Dies galt auch, wenn die Enzymaktivität bei der Temperatur gemessen wurde, an die die Fische akklimatisiert waren. In den warm-akklimatisierten Fischen trat die Induktionsantwort schneller auf. Diese Effekte lassen sich im Freiland nicht eliminieren. Die

Temperaturkompensation von Phase II Enzymen ist in Fischen weniger untersucht, sie scheint im Vergleich zur Phase I eher entgegengesetzt zu verlaufen (Andersson und Koivusaari 1986).

Um herauszufinden, inwieweit die Biomarkerantwort kausal auf die Belastung mit Schadstoffen zurückzuführen ist, wurde ein in vivo-Versuch („Cocktailversuch") sowie ein Extraktversuch durchgeführt, der in vivo- und in vitro-Systeme kombiniert (siehe auch Kap. 2.1.7 und 2.1.8).

3.2 Halbfreiland

3.2.1 Physikalisch-chemischer und limnochemischer Hintergrund

Tabelle 3.1 zeigt physikalisch-chemische und limnochemische Daten zu den Untersuchungsgewässern exemplarisch für Sommer (Juli 1997) und Winter (November 1997). Die Daten wurden von Stefan Adam, Universität Tübingen, erhoben.

Tab. 3.1. Physikalisch-chemische und limnochemische Daten zu den beiden Untersuchungsgewässern Krähenbach und Körsch zu den Probennahmen P26 (Juli 1997) und P30 (November 1997). Die Daten wurden von Stefan Adam, Universität Tübingen, erhoben.

	P26 (Juli 97) Krähenbach	P26 (Juli 97) Körsch	P30 (Nov. 97) Krähenbach	P30 (Nov. 97) Körsch
Wassertemperatur [C°]	14,6	17,3	6.4	10.9
Leitfähigkeit [µS/cm]	609	956	830	1025
pH-Wert	n.a.	n.a.	8.2	8.2
Sauerstoffgehalt [mg/L]	n.a.	n.a.	9.3	8.7
Sauerstoffsättigung [%]	n.a.	n.a.	82	83
Ca2- [mg/L]	n.a.	n.a.	108	91
Gesamthärte [°dH]	n.a.	n.a.	18	12
Karbonathärte [°dH]	n.a.	n.a.	18	12
SBV [mmol/L]	n.a.	n.a.	6.4	4.3
BSB5 ohne ATH [mg/L]	n.a.	n.a.	1.1	2.4
NH4+ [mg/L]	n.a.	n.a.	0.03	0.76
NH4+-N [mg/L]	n.a.	n.a.	0.02	0.59
NH3 [mg/L]	n.a.	n.a.	n.n	0.024
NH3-N [mg/L]	n.a.	n.a.	n.n	0.20
NO2- [mg/L]	n.a.	n.a.	0.04	1.2
NO2—N [mg/L]	n.a.	n.a.	0.01	0.36
NO3- [mg/L]	n.a.	n.a.	12	98
NO3—N [mg/L]	n.a.	n.a.	2.7	22.1
O-PO4 3- [mg/L]	n.a.	n.a.	0.3	1.2
O-PO4 3—P [mg/L]	n.a.	n.a.	0.09	0.40
CL- [mg/L]	n.a.	n.a.	43	136

n.a. = not available (Daten nicht erhältlich)

3.2.2 Hintergrund der chemischen Belastung

Exemplarisch wird in Tabelle 3.2 die chemische Hintergrundbelastung der Gewässer Krähenbach und Körsch in Wasser und Sediment im Sommer (Juli 1997) und im Winter (November 1997) dargestellt. Die Daten für die analytischen Meßergebnisse wurden von Wolfgang Honnen, Steinbeis-Transferzentrum an der Fachhochschule Reutlingen, erhoben. Die $logK_{OW}$-Werte wurden von Karin Hartig zusammengestellt.

Tab. 3.2. Chemische Analysedaten für Wasser und Sediment aus den Gewässern Krähenbach und Körsch in den Monaten Juli 1997 (Probennahme P26) und November 1997 (Probennahme P30). Die Abkürzungen in der ersten Zeile bedeuten W = Wasser, S = Sediment, AB = Probestelle Krähenbach B, KA = Probestelle Körsch A. Die Abkürzungen für die untersuchten Chemikalien sind in der Abkürzungsliste aufgeführt.

Substanz	$logK_{OW}$	P26 WAB [µg/L]	P26 WKA [µg/L]	P26 SAB [µg/kg]	P26 SKA [µg/L]	P30 WAB [µg/L]	P30 WKA [µg/L]	P30 SAB [µg/kg]	P30 SKA [µg/L]
Lindan	3.72	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	0.010	n.n	n.n
Triallat		n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	1
o,p-DDT	6.7			n.n	n.n			n.n	n.n
p,p-DDT	6.91			n.n	n.n			1	3
o,p-DDD				n.n	n.n			n.n	n.n
p,p-DDD	6.02			n.n	n.n			n.n	n.n
o,p-DDE				n.n	n.n			n.n	n.n
p,p-DDE	6.51			n.n	2			0.5	1
PCP	5.12	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n
Pirimicarb		n.n	n.n			n.n	n.n		
Trifluralin	5.34			n.n	n.n			n.n	0.5
DCB		n.n	n.n	0.2	2	n.n	n.n	0.5	1
TCB		n.n	n.n	2	2	n.n	n.n	1	0.4
TeCB				n.n	n.n			n.n	n.n
PeCB				n.n	0.3			0.2	0.2
HCB	5.73			0.1	1			0.2	0.5
PCB 28	5.62			n.n	n.n			n.n	n.n
PCB 52	5.94			7	2			0.3	1
PCB 101	6.8			72	4			1	4
PCB 153	7.75			86	12			3	11
PCB 138	7.44			97	13			3	11
PCB180	8.04			54	7			2	7
Summe PCB 6				316	38			9.3	34
NAP	3.3	0.01	0.017	4	14	0.023	0.053	2	9
ANY	3.94	n.n	n.n	21	139	0.003	0.007	12	51
ANE	3.92	n.n	n.n	8	26	0.002	0.005	3	11
FLU	4.18	0.002	0.06	19	88	0.004	0.008	10	52
PHE	4.46	n.n	0.037	223	925	0.037	0.068	182	543
ANT	4.45	n.n	0.028	54	260	n.n	n.n	32	105
FLA	5.16	0.002	0.011	4215	1674	0.013	0.010	375	851
PYR	4.88	0.002	0.009	302	1309	0.014	0.008	269	647
BaA	5.76	n.n	n.n	181	826	0.010	0.002	203	540
CHR	5.5	n.n	n.n	190	780	0.012	n.n	164	424
BbF	5.78	n.n	n.n			n.n	n.n	184	527
BkF	5.8	n.n	n.n			n.n	n.n	133	381
BbF+BkF				169	592				

Tab. 3.2. Fortsetzung

Substanz	$logK_{OW}$	P26 WAB [µg/L]	P26 WKA [µg/L]	P26 SAB [µg/kg]	P26 SKA [µg/L]	P30 WAB [µg/L]	P30 WKA [µg/L]	P30 SAB [µg/kg]	P30 SKA [µg/L]
BaP	5.97	n.n	n.n	284	561	n.n	n.n	355	1000
IND	6.64	n.n	n.n	163	407	n.n	n.n	20	398
DBahA	6.75	n.n	n.n	38	90	n.n	n.n	17	73
BghiP	6.63	n.n	n.n	140	322	n.n	n.n	n.n	342
Summe PAH 16		0.016	0.108	6011	8014	0.118	0.161	1961	5954
Cd		n.n	n.n	550	900	n.n	n.n	110	250
Cu		6	11	11000	27000	1	12	3500	51150
Zn		31	69	23000	223000	70	150	28000	181000
Pb		n.n	n.n	21000	85000	n.n	n.n	11750	67200
MBAS		150	260			220	330		

n.n = nicht nachweisbar

3.2.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse aus dem Halbfreiland sind in Tabelle 3.3 bis 3.5 dargestellt. Gezeigt werden die Mittelwerte für die katalytische Aktivität von CYP1A, den relativen Proteingehalt von CYP1A im Vergleich zur Laborkontrolle sowie die GST-Aktivität. Die Ergebnisse wurden zusätzlich in Prozent umgerechnet, wobei die Laborkontrolle gleich 100% gesetzt wurde.

Phase I

Für die EROD-Enzymaktivität und den Gehalt an Cytochrom P4501A weisen die Ergebnisse erhöhte Werte in Leberproben von Bachforellen und Bachschmerlen aus der Körsch im Vergleich zu Proben aus dem Labor auf (Tab. 3.3 und 3.4). Die Unterschiede für die EROD-Aktivität sind in 10 von 11 Fällen signifikant, für die Ergebnisse aus der immunchemischen Bestimmung gilt dies in 9 von 11 Fällen (Tab. 3.3 und 3.4). Die prozentuale Induktion liegt bei Forellen/EROD zwischen 140 und 1131%, bei Schmerlen/EROD zwischen 36 und 1189%. Die prozentuale Induktion des Cytochrom P4501A-Gehalts ist geringer als die der EROD-Aktivität. Die Werte liegen für Forellen/ELISA zwischen 112 und 431% und für Schmerlen/ELISA zwischen 134 und 422%.

Im Vergleich zu den Ergebnissen aus der Körsch sind die Werte in Leberproben von Bachforellen und Bachschmerlen aus dem Krähenbach schwächer erhöht. Die Unterschiede zur Kontrolle sind häufig signifikant (EROD: in 8 von 11 Fällen, ELISA: in 7 von 9 Fällen, siehe Tab. 3.3 und 3.4). Die Werte für den Krähenbach sind teilweise niedriger als die für die Kontrolle. Das ist bei den Daten aus der Körsch nur für Schmerlen/EROD bei der Probennahme im November 1997 der Fall. Die prozentuale Induktion liegt bei Forelle/EROD zwischen 65 und 453% und bei Schmerle/EROD zwischen 23 und 476%. Die prozentuale Erhöhung des Cytochrom P4501A-Gehalts liegt bei Forelle/ELISA zwischen 57 und 166% und bei Schmerle/ELISA zwischen 76 und 113%.

Tab. 3.3. Ergebnisse für die katalytische Aktivität von CYP1A (EROD) in der Leber von Bachforellen und Bachschmerlen zu allen Probennahmezeitpunkten. Dargestellt sind die Probennahmezeitpunkte, die jeweils beprobte Tiergruppe, die Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern) sowie die Signifikanz der Abweichung zur Kontrolle (*: p = 0.05, **: p = 0.01, ***: p = 0.001). Im zweiten Teil der Tabelle sind die Umrechnungen in Prozent dargestellt (Laborkontrolle = 100%).

Zeitpunkt	Tier-gruppe	EROD[1] Kontrolle	EROD[1] Krähenbach	EROD[1] Körsch	Tier-gruppe	EROD[1] Kontrolle	EROD[1] Krähenbach	EROD[1] Körsch
Mai 98	36F5	21.43 (16.12)	15.06 (11.01)	38.41* (17.37)				
Juli 96	14F3	18.79 (21.04)	25.44 (14.00)	93.81*** (45.27)				
Juli 96	14F4	2.18 (4.67)	72.76*** (66.59)	72.36*** (37.44)				
Juli 97	26F5	15.33 (7.66)	27.00** (18.35)	47.45*** (41.84)	26S5	5.81 (11.33)	8.42 (8.25)	31.17*** (25.65)
Juli 98	38F7	3.23 (1.20)	14.65*** (6.88)	10.28* (6.46)	38S7	0.52 (0.57)	3.93** (2.80)	5.64*** (1.97)
Sept 96	16F3	9.85 (3.47)	32.39*** (14.66)	111.47*** (66.60)	16S3	2.79 (2.46)	7.17*** (5.79)	33.20*** (15.61)
Sept 96					16S4	1.69 (1.71)	3.04* (1.69)	18.67*** (13.86)
Okt 95	05F1	68.61 (14.07)	49.58** (10.01)	115.25 (40.02)	05S1	3.00 (1.91)	12.90 (8.33)	13.10*** (5.86)
Okt 95	05F2	50.86 (16.71)	33.38** (16.32)	71.59** (21.63)				
Nov 95	07F1	83.10 (27.75)	87.93 (33.73)	145.77*** (43.32)	07S2	1.97 (1.32)	0.47*** (0.21)	6.28*** (2.21)
Nov 95	07F2	37.74 (25.56)	81.36** (41.18)	87.91** (32.91)				
Nov 97	30F5	78.99 (47.04)	168.96*** (59.86)	423.89*** (202.52)	30S5	10.71 (24.51)	4.38 (3.56)	3.89 (2.86)

Zeitpunkt	Tier-gruppe	EROD [%] Kontrolle	EROD [%] Krähenbach	EROD [%] Körsch	Tier-gruppe	EROD [%] Kontrolle	EROD [%] Krähenbach	EROD [%] Körsch
Mai 98	36F5	100.00	64.31	186.95				
Juli 96	14F3	100.00	135.30	499.20				
Juli 96	14F4	100.00	387.20	385.10				
Juli 97	26F5	100.00	176.13	309.50	26S5	100.00	144.92	536.49
Juli 98	38F7	100.00	453.56	318.27	38S7	100.00	476.36	683.64
Sept 96	16F3	100.00	328.80	1131.60	16S3	100.00	256.90	1189.90
Sept 96					16S4	100.00	181.60	1104.70
Okt 95	05F1	100.00	72.26	167.99	05S1	100.00	429.70	436.27
Okt 95	05F2	100.00	65.63	140.75				
Nov 95	07F1	100.00	105.81	175.40	07S2	100.00	23.66	318.78
Nov 95	07F2	100.00	215.58	232.90				
Nov 97	30F5	100.00	213.90	536.64	30S5	100.00	40.90	36.32

[1] = in [pmol/mg/min]

Tab. 3.4. Ergebnisse aus der immunchemischen Bestimmung von CYP1A im Vergleich zur Kontrolle in der Leber von Bachforellen und Bachschmerlen zu allen Probennahmezeitpunkten. Die Werte stellen nur den relativen Cytochrom P4501A-Gehalt ausgedrückt in OD-Werten dar, da kein Standard für Forellen- oder Schmerlen-CYP1A vorhanden war. Die Daten wurden mit verschiedenen Antikörpern für die beiden Fischarten erhoben (siehe auch Kap. 2.1.6.3). Dargestellt sind die Probennahmezeitpunkte, die jeweils beprobte Tiergruppe, die Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern) sowie die Signifikanz der Abweichung zur Kontrolle (*: p = 0.05, **: p = 0.01, ***: p = 0.001). Im zweiten Teil der Tabelle sind die Umrechnungen in Prozent dargestellt (Laborkontrolle = 100%).

Zeitpunkt	Tier-gruppe	CYP1A1[1] Kontrolle	CYP1A1[1] Krähenbach	CYP1A1[1] Körsch	Tier-gruppe	CYP1A1[1] Kontrolle	CYP1A1[1] Krähenbach	CYP1A1[1] Körsch
Mai 98	36F5	0.112 (0.162)	0.076 (0.048)	0.457** (0.236)				
Juli 96	14F3	0.116 (0.016)	0.087** (0.024)	0.130 (0.042)				
Juli 96	14F4	0.080 (0.024)	0.119*** (0.037)	0.180*** (0.050)				
Juli 97	26F5	0.586 (0.113)	0.589 (0.093)	0.859** (0.112)	26S5			
Juli 98	38F7	0.083 (0.023)	0.128* (0.045)	0.110 (0.043)	38S7	0.082 (0.024)	0.093 (0.013)	0.092 (0.038)
Sept 96	16F3	0.083 (0.016)	0.100** (0.021)	0.192*** (0.095)	16S3			
Okt 95	05F1	0.110 (0.030)		0.171** (0.053)	05S1			
Okt 95	05F2	0.086 (0.010)		0.141* (0.039)				
Nov 95	07F1	0.140 (0.022)	0.166** (0.29)	0.355*** (0.105)	07S2			
Nov 95	07F2	0.096 (0.024)	0.160** (0.043)	0.235*** (0.056)				
Nov 97	30F5	0.279 (0.051)	0.336* (0.052)	1.205*** (0.215)	30S5	0.195 (0.011)	0.149** (0.024)	0.824*** (0.195)

Zeitpunkt	Tier-gruppe	CYP1A1 [%] Kontrolle	CYP1A1 [%] Krähenbach	CYP1A1 [%] Körsch	Tier-gruppe	CYP1A1 [%] Kontrolle	CYP1A1 [%] Krähenbach	CYP1A1 [%] Körsch
Mai 98	36F5	100.00	57.14	344.36				
Juli 96	14F3	100.00	75.00	112.10				
Juli 96	14F4	100.00	136.78	225.00				
Juli 97	26F5	100.00	100.51	146.58	26S5			
Juli 98	38F7	100.00	154.21	132.53	38S7	100.00	113.41	134.14
Sept 96	16F3	100.00	120.40	231.30	16S3			
Okt 95	05F1	100.00		155.40	05S1			
Okt 95	05F2	100.00		163.95				
Nov 95	07F1	100.00	118.50	253.50	07S2			
Nov 95	07F2	100.00	166.60	244.70				
Nov 97	30F5	100.00	120.43	431.90	30S5	100.00	76.41	422.56

[1]: in OD-Werten

Tab. 3.5. Ergebnisse für die katalytische Aktivität der Glutathion-S-Transferase (GST) in der Leber von Bachforellen und Bachschmerlen zu allen Probennahmezeitpunkten. Dargestellt sind die Probennahmezeitpunkte, die jeweils beprobte Tiergruppe, die Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern) sowie die Signifikanz der Abweichung zur Kontrolle (*: p = 0.05, **: p = 0.01, ***: p = 0.001). Im zweiten Teil der Tabelle sind die Umrechnungen in Prozent dargestellt (Laborkontrolle = 100%).

Zeitpunkt	Tier-gruppe	GST[1] Kontrolle	GST[1] Krähenbach	GST[1] Körsch	Tier-gruppe	GST[1] Kontrolle	GST[1] Krähenbach	GST[1] Körsch
Mai 98	36F5	502.83 (120.47)	404.02* (43.56)	375.37* (130.54)				
Juli 96	14F3	14.24 (2.87)	19.10 (5.20)	17.60 (2.75)				
Juli 96	14F4	14.40 (4.90)	18.40 (3.69)	25.86 (5.50)				
Juli 97	26F5	1008.37 (228.45)	977.65 (424.2)	972.26 (236.24)	26S5	1106.65 (1155.04)	667.09 (108.28)	778.6 (129.95)
Juli 98	38F7	991.55 (148.35)	953.59 (142.14)	795.25 (134.67)	38S7	807.68 (182.96)	704.28 (96.82)	898.30 (122.46)
Sept 96	16F3	18.30 (17.50)	13.90 (13.50)	10.10 (7.70)	16S3	21.90 (17.60)	23.10 (6.70)	27.10 (13.00)
Sept 96					16S4	22.00 (6.20)	25.15 (6.90)	49.90 (68.00)
Okt 95	05F1	418.62 (106.93)	246.86** (81.41)	186.39*** (53.59)	05S1	811.63 (621.21)		
Okt 95	05F2	363.00 (78.89)	192.00*** (21.90)	208.95*** (58.71)				
Nov 95	07F1	633.73 (120.27)	381.05*** (62.01)	603.34 (91.23)	07S2	695.23 (300.38)	430.87*** (106.39)	799.45* (195.64)
Nov 95	07F2	746.05 (149.53)	568.38 (121.36)	467.74** (74.81)				
Nov 97	30F5	114.47 (20.46)	117.63 (27.61)	99.68 (16.72)	30S5	117.64 (18.53)	115.47 (20.46)	127.85 (17.5)

Zeitpunkt	Tier-gruppe	GST [%] Kontrolle	GST [%] Krähenbach	GST [%] Körsch	Tier-gruppe	GST [%] Kontrolle	GST [%] Krähenbach	GST [%] Körsch
Mai 98	36F5	100.00	80.34	74.65				
Juli 96	14F3	100.00	134.10	123.50				
Juli 96	14F4	100.00	127.70	179.50				
Juli 97	26F5	100.00	96.95	96.42	26S5	100.00	60.28	70.36
Juli 98	38F7	100.00	96.17	80.20	38S7	100.00	87.19	111.21
Sept 96	16F3	100.00	75.90	55.10	16S3	100.00	105.40	123.70
Sept 96					16S4	100.00	114.30	226.80
Okt 95	05F1	100.00	58.96	44.52	05S1	100.00		
Okt 95	05F2	100.00	52.89	57.56				
Nov 95	07F1	100.00	60.13	95.20	07S2	100.00	61.90	114.90
Nov 95	07F2	100.00	76.19	62.69				
Nov 97	30F5	100.00	102.76	87.08	30S5	100.00	98.16	108.68

[1]: in [nmol/mg/min]

Sowohl die katalytische Aktivität als auch der relative Gehalt von CYP1A sind in den Leberproben beider Fischarten in den Gewässern Krähenbach und Körsch im Vergleich zur Laborkontrolle erhöht. Die Induktion von EROD-Aktivität und relativem Gehalt an CYP1A verläuft jedoch nur bedingt parallel. Trägt man die EROD-Aktivität gegen die OD-Werte aus der immunchemischen Bestimmung gegeneinander auf, läßt sich für alle Beprobungen mit der Forelle ein linearer Zusammenhang mit einem Regressionskoeffizienten von $r^2 = 0.39$ schätzen (Abb. 3.1). Für die Schmerlenproben besteht kein linearer Zusammenhang (nicht dargestellt). Hier ist allerdings zu beachten, daß nur wenige Daten aus der immunchemischen Messung vorliegen.

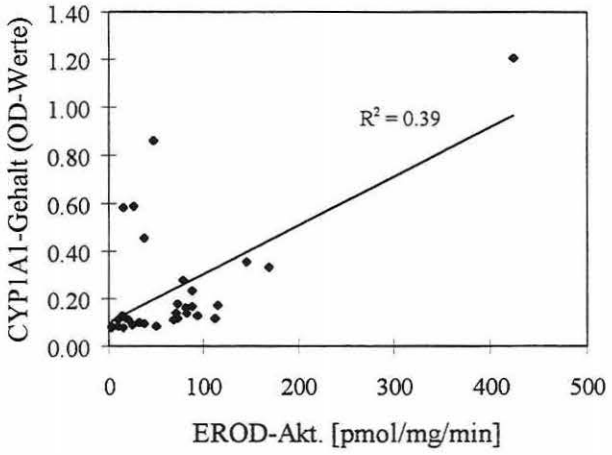

Abb. 3.1. Zusammenhang zwischen katalytischer Aktivität von CYP1A (EROD) und relativem Proteingehalt von CYP1A1 (OD-Werte aus der Bestimmung im ELISA), ausgedrückt als lineare Regression zwischen EROD- und ELISA-Werten für alle Leberproben aus Forellen.

Phase II

Für die Aktivität der Glutathion-S-Transferase treten bei beiden Fischarten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Labor- und Halbfreilandwerten auf. Die Unterschiede sind nur selten signifikant (Forelle: in beiden Gewässern in 4 von 11 Fällen, Schmerle: in beiden Gewässern in einem von 6 Fällen (Tab. 3.5)). Dabei sind entweder die Werte im Krähenbach, in der Körsch oder im Labor erhöht.

Artenvergleich

Es besteht ein signifikanter Unterschied in der EROD-Aktivität zwischen Bachforellen und Bachschmerlen. Die Grundaktivität des Enzyms ist in den Schmerlen deutlich niedriger als in den Forellen. Die prozentuale Induktion des Enzyms zum gleichen Zeitpunkt ist in den beiden Fischarten unterschiedlich, sie ist nur in einem Fall, bei der Probennahme im September 1996, ähnlich. Ein direkter Vergleich der Induktionsantwort in Bachforelle und Bachschmerle auf Basis des Cytochrom P4501A-Gehalts ist nicht möglich, da im jeweiligen ELISA verschiedene

erste Antikörper für die beiden Fischarten verwendet wurden und kein Standard für das Cytochrom P4501A vorhanden war.

Jahreszeitverlauf

Die basale EROD-Aktivität ist in den Bachforellen und Bachschmerlen im Sommer niedriger als im Winter (Abb. 3.2). Auf der Ebene des relativen CYP1A-Gehalts läßt sich dieser Trend nicht eindeutig bestätigen. Der relative Proteingehalt von CYP1A ist bei den Forellen im Sommer bei einer Probennahme (Juli 1997) deutlich höher als zu den übrigen Probennahmezeitpunkten (Abb. 3.2, Tab. 3.4). Für die Schmerlen gilt auch auf der Ebene des relativen CYP1A-Gehalts, daß die Werte im Sommer tendenziell niedriger sind als im Winter (Tab. 3.4).

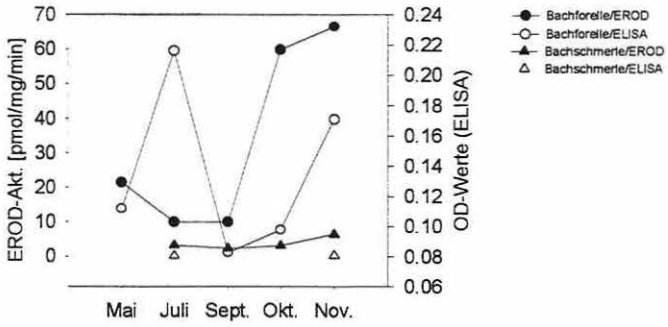

Abb. 3.2. Kontrollwerte für die EROD-Aktivität und den relativen CYP1A-Proteingehalt in Bachforellen und Bachschmerlen zu allen Probennahmezeitpunkten. Dargestellt sind die Mittelwerte, die aus allen Ergebnissen für jeweils einen Monat der mehrjährigen Probennahmen gebildet wurden.

Unterschiede in der Induktionsantwort im jahreszeitlichen Verlauf lassen sich nicht eindeutig belegen. Andeutungsweise ist die prozentuale Induktionsantwort bezogen auf die EROD-Aktivität in Forellen und Schmerlen im Sommer, also bei den Probennahmen im Juli und im September, höher als zu den übrigen Probennahmen (Abb. 3.3 und 3.4 und Tabelle 3.3). Dies gilt jedoch nicht für den relativen CYP1A-Gehalt in den Forellen. Für den relativen CYP1A-Gehalt ist die prozentuale Erhöhung sowohl im Krähenbach als auch in der Körsch im November am höchsten (Abb. 3.3 und 3.4). Für die Schmerlen liegt keine ausreichende Zahl an Daten vor, um die Ergebnisse im jahreszeitlichen Verlauf zu betrachten.

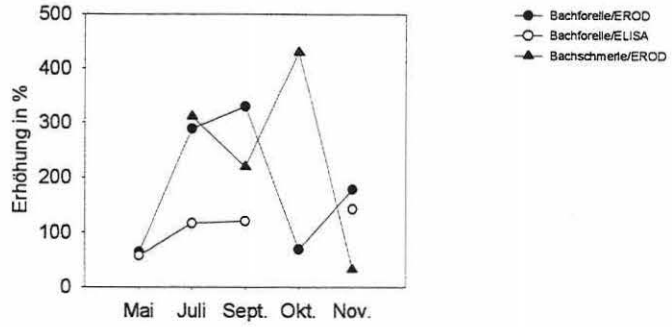

Abb. 3.3. Ergebnisse für die prozentuale Erhöhung von EROD-Aktivität und relativem Proteingehalt von CYP1A (ELISA) für Bachforelle und Bachschmerle aus dem Krähenbach. Dargestellt sind die Mittelwerte, die aus allen Ergebnissen für jeweils einen Monat der mehrjährigen Probennahmen gebildet wurden.

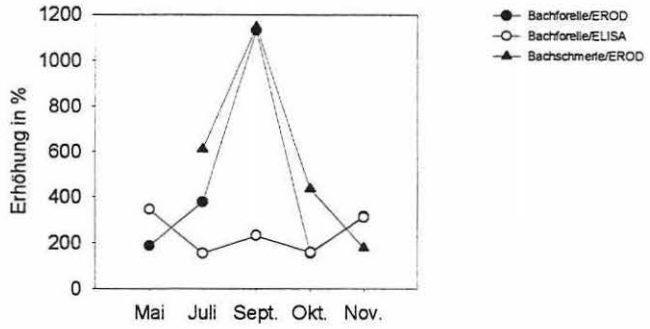

Abb. 3.4. Ergebnisse für die prozentuale Erhöhung von EROD-Aktivität und relativem Proteingehalt von CYP1A (ELISA) für Bachforelle und Bachschmerle aus der Körsch. Dargestellt sind die Mittelwerte, die aus allen Ergebnissen für jeweils einen Monat der mehrjährigen Probennahmen gebildet wurden.

3.2.4 Diskussion

Phase I

In Bachforellen und Bachschmerlen aus der Körsch zeigt sich generell eine höhere Induktionsantwort in Bezug auf die EROD-Aktivität und den relativen Cytochrom P4501A-Gehalt als in Tieren aus dem Krähenbach. Dies weist auf eine höhere Belastung der Körsch mit Schadstoffen hin, die für die Induktion des Cytochrom P4501A relevant sind. Die Schadstoffeinträge in den Krähenbach und die Körsch sind diffus. Die für die Induktion von CYP1A als besonders relevant geltenden PAH und PCB stammen aus der Luft (Nähe zum Stuttgarter Flughafen). Andere Schadstoffeinträge stammen aus Oberflächenabläufen (Pestizideintrag in die Körsch) und aus

Kläranlageneinleitungen in die Körsch. In Tabelle 3.2 wurde exemplarisch die Belastungssituation von Krähenbach und Körsch für die Monate Juli und November dargestellt. Sie zeigt, daß die Belastung mit PCB, PAH und Schwermetallen im November in der Kösch höher ist als im Krähenbach. Im Juli sieht das Belastungsmuster etwas anders aus, z.B. sind die PCB-Konzentrationen zu dem gezeigten Probennahmezeitpunkt im Krähenbach höher als in der Körsch (Tabelle 3.2). Die aufgrund des Oberflächenabflusses erwartete höhere Belastung der Körsch mit Pestiziden spiegelt sich in den chemischen Analysedaten wider. Durchschnittswerte der Analysedaten für alle Probennahmezeitpunkte haben gezeigt, daß die Belastung mit PAH, PCB, Pestiziden und Schwermetallen in der Körsch höher ist als im Krähenbach (BMBF-Zwischenberichte zu Valimar, Fördernummer 070TX22). Diese im Durchschnitt höhere chemische Belastung der Körsch scheint sich in der Induktion von CYP1A in Bachschmerlen und Bachforellen widerzuspiegeln. Damit ist der Biomarker CYP1A offensichtlich auch dazu geeignet, zwischen Gewässern mit diffuser Belastung, die nicht aus einer eindeutig zuzuordnenden Schadstoffquelle stammt, zu differenzieren.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, daß mit dem Biomarker EROD zwischen Standorten unterschiedlicher Belastung differenziert werden kann (van der Oost et al. 1997, Vigano et al. 1998, Willett et al. 1997b). Häufig wurde der Biomarker CYP1A zur Indikation von Abwässern aus der Papierindustrie in Kanada oder Skandinavien (Campbell et al. 1996, Karels et al. 1998, Munkittrick et al. 1992 und 1994, van den Heuvel et al. 1995) oder von Ölverunreinigungen in der Nordsee eingesetzt (Sleiderink et al. 1995, Stagg et al. 1995). Trotz der erfolgreichen Differenzierung von Standorten korreliert die gefundene Biomarkerantwort jedoch nicht immer mit den Konzentrationen an Schadstoffrückständen in den untersuchten Organismen, im Sediment oder im Wasser (Bankey et al. 1994, Kloepper-Sams und Swanson 1992, van der Oost et al. 1997, Whyte et al. 1998). In Bezug auf die EROD-Aktivität könnte eine fehlende Korrelation mit Schadstoffrückständen auf die Hemmung der EROD-Aktivität durch Schwermetalle oder PCB (Brüschweiler et al. 1996, Goksøyr et al. 1991 und 1994) oder aber auf die Auswahl eines falschen Bezugssystems zurückgeführt werden. Van der Oost et al. (1997) haben z.B. gezeigt, daß die EROD-Induktion zwar mit den PAH-Rückständen im Sediment korreliert, nicht jedoch mit denen im Gewebe der untersuchten Aale. Bei einer Korrelation zwischen EROD-Aktivität und der Belastung mit PAH scheint es z.B. sinnvoller zu sein, die PAH-Rückstände und ihre Metabolite in der Galle zu messen (Beyer et al. 1996, siehe auch Kap. 3.3). Um herauszufinden, inwieweit die in der vorliegenden Arbeit gemessene Biomarkerantwort mit der chemischen Belastung korreliert, wurden der in vivo-Cocktailversuch und der Extraktversuch durchgeführt, in dem in vivo- und in vitro-Systeme kombiniert wurden (siehe Kapitel 3.3 und 3.4).

Da die katalytische Aktivität der Phase I-Enzyme wie bereits erwähnt gehemmt oder verloren gehen kann (Kap. 1), kann es von Vorteil sein, wenn sich eine Aussage über die Induktion von CYP1A zusätzlich auf immunchemische Daten stützen kann (Förlin und Celander 1993, Goksøyr et al. 1991, Collier et al. 1992). Betrachtet man die vorliegenden Daten, verläuft die Biomarkerantwort von CYP1A auf der katalytischen und immunchemischen Ebene nicht immer parallel (Tabelle 3.3 und 3.4, Abb. 3.4). In der Körsch ist die relative Induktion des CYP1A-Proteins in den Bachforellen in den Monaten Mai und November im Mittel höher als die der EROD-Induktion (Abb. 3.4). In diesen Fällen kann eine Hemmung der EROD-Aktivität z.B. nicht ausgeschlossen werden. Im Vergleich zwischen EROD-Aktivität und CYP1A-Protein ist die relative Induktion des CYP1A-Proteins um den Faktor 2,7 niedriger als die der EROD-Aktivität. Die vergleichsweise schwächere immunchemische Antwort ist aus der Literatur bekannt (Collier et al. 1995, Goksøyr et al. 1994, Scholz et al. 1997). Die Ergebnisse

diesbezüglich sind in der vorliegenden Arbeit allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da nur der relative Cytochrom P4501A-Gehalt (OD-Werte), und nicht der absolute gemessen werden konnte.

Phase II

Die Aktivität der Glutathion-S-Transferase war in beiden Fischarten im Vergleich zur Laborkontrolle weder im Krähenbach noch in der Körsch signifikant erhöht. In den meisten Fällen waren die Werte für die GST-Aktivität aus Krähenbach oder Körsch niedriger (teilweise signifikant) als die aus der Laborkontrolle (Tab. 3.5). Aus der Literatur sind zahlreiche Studien bekannt, in denen keine oder nur eine schwache Induktionsantwort der GST im Gegensatz zur EROD-Aktivität vorliegt (Guosheng et al. 1998, Novi et al. 1998, Soimasuo et al. 1995). Dies konnte auch für die Regenbogenforelle nach zweiwöchiger Exposition im Freiland gezeigt werden (Fenet et al. 1998). In anderen Freilandstudien wurde eine Erhöhung der GST-Aktivität gefunden (Jedamski-Grymlas et al. 1995, Vigano et al. 1998), dabei scheint die Induktion jedoch nicht mit der der EROD-Aktivität parallel zu verlaufen. Die Ursachen für die GST-Induktion in Fischen im Freiland sind bisher nicht eindeutig geklärt. Die fehlende Erhöhung der GST-Aktivität in Bachforelle und Bachschmerle könnte darauf zurückzuführen sein, daß induzierende Substanzen nicht in ausreichenden Konzentrationen in den untersuchten Gewässern vorhanden waren. Die cytosolische GST wird in der Forelle beispielsweise durch p,p`DDE induziert (Petrivalsky et al. 1997), das in der Körsch nachgewiesen werden konnte (Tab. 3.2). Da die GST-Aktivität teilweise signifikant unter den Werten für die Laborkontrolle liegt, kann auch eine Hemmung nicht ausgeschlossen werden.

Artenvergleich

Die basale EROD-Aktivität ist in den Schmerlen deutlich geringer als in den Forellen. Schmerlen (Familie Cobitidae) gehören wie die Familie der Cyprinidae zur Unterordnung der Cyprinoidea (Karpfenähnliche). Für die Cyprinidae gibt es Literaturhinweise, daß sie geringere EROD-Aktivitäten aufweisen als die Forellen (Familie Salmonidae) (Ahokas et al. 1994, Scholz 1996, Ueng et al. 1992).

Die Bachschmerlen wurden als Vertreter des benthischen Lebensraums, die Bachforellen als Vertreter der Freiwasserzone ausgewählt. Unterschiede in der Induktionsantwort der beiden Fischarten sollten damit auf ihre Lebensart, z.B. das Futter oder die mögliche Belastung über das Sediment, zurückzuführen sein. Der Einfluß des Futters würde sich allerdings nur im Freiland auswirken, welches in der letzten Phase des Projekts zusätzlich zum Halbfreiland untersucht werden soll. Im Halbfreiland wurde das Futter kontrolliert zugegeben. Bei Exposition in den Aquarien zeigte sich kein eindeutiger Unterschied in der Induktionsantwort der beiden Arten, der auf einen Einfluß des Belastungspfades hinweisen würde. Sollte sich der Belastungspfad auf die Induktionsantwort auswirken, würde eine höhere Antwort in den Schmerlen, die über das Sediment stärker belastet werden könnten als die Forellen, erwartet. Die Ergebnisse zeigen tatsächlich eine höhere Induktionsantwort der EROD-Aktivität in den Schmerlen an. Dies gilt allerdings nur in der Körsch und nicht im Krähenbach, im letzteren ist die Antwort nur in einem Fall höher. Wenn man die prozentuale Induktionsantwort im ELISA betrachtet, ist die prozentuale Induktion in den Schmerlen in der Körsch fast identisch mit der prozentualen Induktionsantwort in den Forellen in der Körsch. Beim Vergleich der Ergebnisse von ELISA und EROD-Aktivität bleibt zu bedenken, daß für die Schmerle/ELISA nur wenig

Daten vorliegen. Eine Interpretation bezüglich des Belastungspfades ist deshalb schwierig. Sie bliebe auch bei „eindeutigen" Ergebnissen kritisch, da eventuell unterschiedliche Empfindlichkeiten der beiden Arten gegenüber gleichen Induktoren nicht bekannt sind. Über die Auswirkung des Belastungspfades kann deshalb keine Aussage getroffen werden. Es ist wahrscheinlich, daß Forellen und Schmerlen im Halbfreiland gleichermaßen über das Wasser und die Schwebstoffe kontaminiert werden, da das Sediment in den relativ kleinen Aquarien durch die Fische ständig aufgewirbelt wird.

Jahreszeitverlauf

Betrachtet man die Induktion von CYP1A im jahreszeitlichen Verlauf, läßt sich kein eindeutiger temperaturabhängiger Trend in der Höhe der Induktionsantwort feststellen. Andersson und Koivusaari (1985) haben gezeigt, daß kalt-akklimatisierte Regenbogenforellen eine höhere Induktionsantwort (EROD) zeigen als warm-akklimatisierte Forellen. Die hier vorliegenden Daten entsprechen dem jedoch nicht. Die prozentuale Induktion der EROD-Aktivität ist in der Körsch im September deutlich höher als im Winter. Auf der Ebene des Proteins ist allerdings die prozentuale Induktion im Winter höher (Abb. 3.4). Der Einfluß der Temperatur auf die Induktionsantwort kann damit zwar nicht ausgeschlossen werden, andere Einflüsse wie die von Chemikalien scheinen jedoch entscheidender zu sein. Ansonsten sollte die Induktion in Bezug auf die EROD-Aktivität bei gleichbleibender chemischer Belastung im Winter höher sein als im Sommer. Die Basalaktivität von CYP1A scheint allerdings von der Temperatur beeinflußt zu werden, sie ist in den Sommermonaten niedriger als im Winter (Abb. 3.2). Die Abnahme der CYP1A-Enzymaktivität bei höheren Temperaturen ist bereits bekannt (Andersson und Koivusaari 1986, Carpenter et al. 1990).

3.3 Cocktail

3.3.1 Ergebnisse

Im 1997 durchgeführten Labor-Cocktailversuch wurden Bachforellen in einem Durchflußsystem kontinuierlich gegenüber drei Konzentrationen eines Schadstoffcocktails exponiert, dessen Zusammensetzung und Konzentration über die analytisch nachgewiesenen Schadstoffdosen in Tieren aus der Körsch und den Bioakkumulationsfaktoren für die jeweiligen Stoffe berechnet wurde. Nach einem Expositionszeitraum von vier Wochen wurden die EROD-Aktivität, der Cytochrom P4501A-Gehalt, die GST-Aktivität und die Schadstoffkonzentrationen im gesamten Tier bestimmt. Die auf der Basis der BCF-Werte erwartete Freiland-typische Schadstoffdosis (Tab. 3.6, Tiergruppen 30F5) wurde nach der Expositionszeit in den Bachforellen des Versuchs erreicht, für die PAH wurden die erwarteten Konzentrationen im 50fachen Cocktail sogar überschritten (Tab. 3.6). Die Tabelle 3.6 zeigt die in den Tieren akkumulierten Schadstoffkonzentrationen der Substanzen, die für die Induktion von Cytochrom P4501A wahrscheinlich relevant sind (PAH und PCB). Für diese PAH und PCB existieren in der Literatur teilweise TEF-Werte (toxic equivalent factors), die in der Tabelle unter Angabe der Quelle aufgeführt werden. Mit Hilfe des TEQ-Konzepts (siehe Einleitung, Kap. 1) wurde versucht, das Ergebnis der Biomarkerantwort im Cocktail zu erklären.

Tab. 3.6 Ergebnisse aus dem in vivo-Cocktailversuch und vergleichend dargestellt von der Probennahme 30 aus dem Freiland im November 1997 (Forellengruppe 30F5, C = Kontrolle, AB = Krähenbach, KE = Körsch). Dargestellt sind Konzentrationen von PAH und PCB im Gewebe von Bachforellen, die nach vierwöchiger Exposition an drei verschiedene Konzentrationen eines Schadstoffcocktails oder im Freiland akkumuliert wurden. Die Tabelle zeigt außerdem TEF-Werte aus der Literatur, die der Auswertung des Versuchs dienten.

Substanz	TEF	Kontrolle [µg/kg Fett]	1facher Cocktail [µg/kg Fett]	10facher Cocktail [µg/kg Fett]	50facher Cocktail [µg/kg Fett]	30F5C [µg/kg Fett]	30F5AB [µg/kg Fett]	30F5KE [µg/kg Fett]
PCB 28	nv	1,4	38,0	122,6	440,6	81,8	16,3	40,3
PCB 52	ni[1]	2,3	28,0	178,5	589,7	423,0	40,7	94,7
PCB 101	ni[1]	11,5	70,0	161,9	570,4	156,3	56,8	120,0
PCB 153	ni[1]	12,7	63,0	77,0	181,5	86,8	76,7	176,8
PCB 138	0,001[1]	12,2	64,0	101,7	272,7	79,7	95,1	175,6
PCB 180	0,0002[1]	2,2	10,0	13,4	45,8	13,5	21,6	30,9
NAP	nv	8,4	47,0	328,5	640,5	78,2	92,5	143,7
ANY	nv	3,2	13,0	47,0	69,3	5,1	6,9	9,3
ANE	nv	32,3	155,0	469,1	728,6	102,0	8,9	6,2
FLU	ni[2]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
PHE	ni[2]	13,1	023,0	353,2	1149,7	73,7	96,3	77,0
ANT	ni[2]	nn	44,0	338,7	1086,1	2,1	nn	10,1
FLA	nv	2,8	483,0	694,3	1161,8	16,6	45,2	45,2
PYR	ni[2]	nn	115,0	149,9	221,3	25,4	34,0	36,6
BaA	0,000025[3]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
CHR	0,0002[3]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
BbF	0,00253[3]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
BkF	0,00478[3]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
BbF	nv	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
BaP	0,000354[3]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
IND	nv	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
DBahA	0,00203[3]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
BghiP	nv	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn

nv = no value (kein Wert in der Literatur vorhanden), ni = no induction (keine Induktion meßbar)
Quellen: [1]Kennedy, S.W. et al. 1996. Environ. Sci. Technol. 30, 706-715, Daten mit CEH (Chicken embryo hepatocytes) erhoben. [2]Willett et al. 1997a. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, 442-448, Daten mit der Zellinie H4IIE erhoben. [3]Eigene Daten mir der Zellinie RTL-W1.

Aus den Rückstandsanalysedaten und den TEF-Werten (Tab. 3.6) wurden die TEQ-Werte berechnet und aufsummiert. In Tabelle 3.7 werden die Ergebnisse für die EROD-Induktion und die dazugehörigen aufsummierten TEQ-Werte für den Cocktailversuch und die Freilandprobe 30 (November 1997) zusammengefaßt. Die Tabelle 3.7 zeigt außerdem die Ergebnisse für den relativen Cytochrom P4501A-Gehalt und für die Aktivität der Glutathion-S-Transferase.

Tab. 3.7. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse für die EROD-Induktion, die berechneten aufsummierten TEQ-Werte, den Cytochrom P4501A-Gehalt sowie die GST-Aktivitäten für den Cocktailversuch und die Probennahme 30 im November 1997 (C = Kontrolle, AB = Krähenbach, KA = Körsch). Signifikanz der Abweichung zur jeweiligen Kontrolle: *: p = 0.05, **: p = 0.01, ***: p = 0.01. Ergebnisse für EROD, CYP1A und GST als Mittelwerte mit Standardabweichungen in Klammern.

	EROD [pmol/mg/min]	Σ TEQ	CYP1A (OD-Werte)	GST [nmol/mg/min]
Kontrolle	6,67 (3,85)	0,0126	0,152 (0,043)	1956 (364,9)
1facher Cocktail	5,67 (4,70)	0,0660	0,159 (0,033)	1838 (345,9)
10facher Cocktail	8,67* (2,78)	0,1044	0,171 (0,048)	1932 (484,96)
50facher Cocktail	14,60*** (6,86)	0,2819	0,180 (0,041)	2164 (802,4)
30F5C	78,99 (47,04)	0,0824	0,279 (0,051)	114,47 (20,46)
30F5AB	168,96*** (59,86)	0,0994	0,336*** (0,052)	117,63 (27,61)
30F5KA	423,89*** (202,52)	0,1818	1,205*** (0,215)	99,68 (16,72)

Die EROD-Aktivität sowie der Cytochrom P4501A-Gehalt sind in allen Versuchsansätzen sehr niedrig. Sie liegen unter den Werten, die sonst für die Laborkontrollen gefunden wurden. Die Aktivität der Glutathion-S-Transferase ist nicht induziert, die Werte sind im Vergleich zu anderen Probennahmen relativ hoch.

3.3.2 Diskussion

Die Ergebnisse der Biomarkerantwort im Cocktail in Bezug auf die Phase I entsprechen nicht der Erwartung, denn bei erfolgreicher Anreicherung der betrachteten Substanzen wurde erwartet, daß CYP1A durch Induktion darauf reagiert. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Werte für die EROD-Aktivität steigen dosisabhängig vom 1fachen bis zum 50fachen Cocktail an, die Absolutwerte sind aber so gering, daß aufgrund der Erfahrungen mit Bachforellen innerhalb des Projektes nicht von einer Induktion von CYP1A gesprochen werden kann. Dieser Befund deutet auf die Problematik der Korrelation zwischen chemischen und biologischen Parametern hin und zeigt, daß die Rückstandsanalytik in Organismen keinen eindeutigen Hinweis auf eine erwartete Biomarkerantwort geben muß. Ein Grund für die fehlende Induktion könnte sein, daß mit der Rückstandsanalytik nicht alle relevanten Stoffe erfaßt und im Cocktail eingesetzt wurden. In Tabelle 3.6 werden aus der Literatur stammende TEF-Werte für die analysierten Substanzen gezeigt. Dabei wird deutlich, daß viele der gemessenen PCB und PAH keine Induktoren von CYP1A sind. Mehrere PAH, die wichtige Induktoren von CYP1A sind, waren in den Organismen nicht nachweisbar. Bei diesen PAH handelt es sich wahrscheinlich um solche, deren Abbau in der Leber innerhalb weniger Stunden eingeleitet wird (Ferraris et al. 1996, Pangrekar et al. 1995, Sikka et al. 1990). Dies ist ein Hinweis darauf, daß bei der Berechnung des Cocktails die tatsächliche Dosis dieser PAH wahrscheinlich unterschätzt wurde. Um die Belastung der Organismen mit PAH abzuschätzen, reicht eine Rückstandsanalytik im Gewebe offensichtlich nicht aus. Auch van der Oost et al. (1997) finden nur eine Korrelation zwischen PCB/OCP-Rückständen im Gewebe des Aals und der Aktivität von Phase I-Enzymen, jedoch

keine Korrelation zwischen der Phase I und Rückständen von PAH. Bei Substanzen, die metabolisiert werden, wäre es wichtig, zusätzlich die Metabolite in der Galle zu analysieren, um die tatsächliche Dosis besser abschätzen zu können (Brumley et al. 1995, Willett et al. 1997b). Es ist jedoch zu beachten, daß auch bei der Analyse der Galle Probleme in der Interpretation auftreten können (Brumley et al. 1998).

Die Annahme, daß nicht alle relevanten Substanzen analysiert oder im Cocktail eingesetzt wurden, scheint sich mit der Anwendung des TEQ-Konzeptes zu bestätigen. Mit Hilfe der in Tabelle 3.6 angegebenen TEF-Werte wurde die Summe der Toxizitätsäquivalente (TEQ) für den 1, 10 und 50fachen Cocktail sowie beispielhaft für die Forellengruppe F5 der Probennahme 30 im November 1997 berechnet. Die Daten für die Summe der TEQ liegen für die Probennahme November 1997 und für die drei Konzentrationen des Cocktails in einem ähnlichen Bereich. Der einfache Cocktail ist dabei mit der Kontrolle im November 1997 vergleichbar, der 10fache Cocktail mit dem Krähenbach und der Körsch, der 50fache Cocktail liegt sogar über den Werten für Krähenbach und Körsch. Aufgrund der Summenwerte der TEQ müßte eine Induktion der EROD-Aktivität oder des Cytochrom P4501A-Gehalts zu verzeichnen sein. Daß das nicht der Fall ist, liegt wahrscheinlich daran, daß im Halbfreiland induzierende Substanzen vorlagen, die im Cocktail nicht eingesetzt wurden. Die Ergebnisse verdeutlichen, daß das TEQ-Konzept nur mit Vorsicht anzuwenden ist und nur eine sehr grobe Abschätzung einer Belastung geben kann.

Aufgrund der im Vergleich zu anderen Probennahmen sehr geringen Kontrollaktivität der EROD könnte der in vivo-Cocktailversuch auch grundsätzlich in seiner Validität angezweifelt werden. Denkbar wäre eine Anpassung der EROD-Aktivität an hohe Temperaturen (18°C) während der Versuchsdurchführung im Sommer. Die Antwort auf der immunchemischen Basis ist jedoch mit der Kontrollaktivität anderer Probennahmen vergleichbar. Die Validität des Versuchs wurde deshalb nicht in Frage gestellt.

3.4 Extraktversuche

3.4.1 Ergebnisse

Kapitel 3.2 hat gezeigt, daß über die Rückstandsanalytik nicht unbedingt alle induktionsrelevanten Substanzen erfaßt werden. Um zu klären, ob die Induktionsantwort hauptächlich auf PAH und PCB zurückzuführen ist, wurde eine Kombination von in vivo- und in vitro-Systemen eingesetzt. Bachforellen wurden im Halbfreiland entweder an Kontrollwasser oder an Wasser aus der Kösch exponiert. Anschließend wurde die katalytische Aktivität von CYP1A in einem Teil der Lebern nach der Präparation von Mikrosomen gemessen und aus dem restlichen Teil der Lebern jeweils ein PAH/PCB-Extrakt hergestellt. Dieser Extrakt wurde auf seine Induktionskapazität in RTL-W1-Zellen in vitro getestet. Wenn die EROD-Induktion in vivo hauptsächlich durch die Substanzgruppen PAH und PCB hervorgerufen wird, sollten die in vivo- und in vitro-Ergebnisse linear miteinander korrelieren.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 und den Abbildungen 3.5 und 3.6 dargestellt. Tabelle 3.8 zeigt die EROD-Aktivität in vivo, gemessen in Mikrosomen aus Leberhomogenat, und die maximale EROD-Aktivität in vitro, die der jeweilige Extrakt in der Zellinie RTL-W1 hervorgerufen hat. Die maximale EROD-Aktivität trat beim Einsatz des unverdünnten Extrakts oder bei einer Verdünnung von 1:2 auf. Bei weiteren Verdünnungen des Extrakts trat keine signifikante Induktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mehr auf. Aus diesem Grund konnte keine kon-

zentrationsabhängige Induktionskurve für die verschiedenen Extrakte hergestellt werden und zum Vergleich der verschiedenen Extrakte mußte die maximale EROD-Induktion herangezogen werden.

Tab. 3.8. EROD-Induktion in vivo in Mikrosomen aus Leberhomogenat und in vitro in der Zellinie RTL-W1. Bachforellen wurden an Labor (C)- und Körschwasser (K) exponiert. Aus einem Teil der Lebern wurde die EROD-Aktivität bestimmt, aus dem Rest der jeweiligen Lebern wurde ein lipophiler Extrakt gewonnen und in RTL-W1 auf seine Induktionskapazität getestet.

Probe	EROD max in vitro [pmol/mg/min]	EROD in vivo [pmol/mg/min]
C1	10.55	
C2	3.15	6.34
C3	4.49	4.11
C4	6.97	3.36
C5	4.12	8.77
C6	6.47	3.01
K1	5.06	9.69
K2	4.82	6.25
K3	6.97	21.46
K4	5.04	9.70
K5	6.53	46.45
K6	6.42	28.71

Bei den Abbildungen 3.5 und 3.6 umfassen die Regressionen einmal alle vorhandenen Daten (Kontrolle und Körsch, Abb. 3.5) und einmal nur die Daten, die mit Tieren aus der Körsch erhoben wurden (Abb. 3.6).

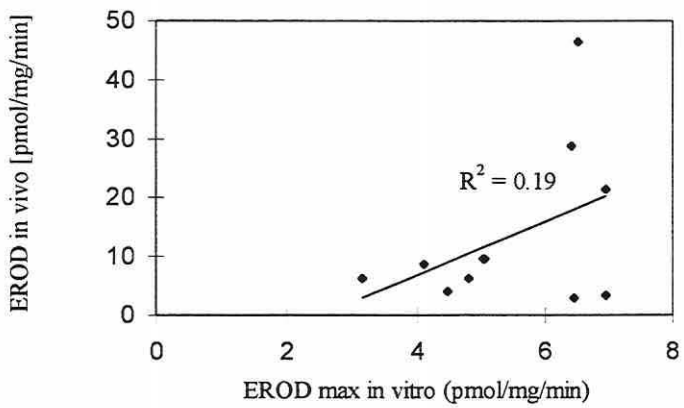

Abb. 3.5. Lineare Regression zwischen der EROD-Aktivität in vivo und in vitro. Die Regression bezieht sich auf alle erhobenen Daten. $r^2 = 0{,}19$.

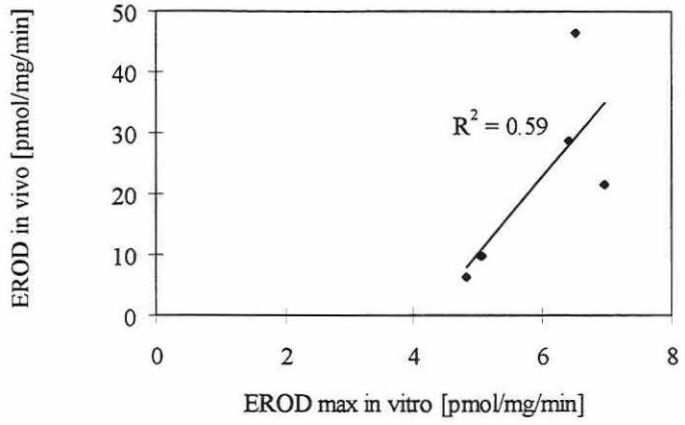

Abb. 3.6. Lineare Regression zwischen EROD-Aktivität in vivo und in vitro. Die Regression bezieht sich nur auf die Daten, die mit Tieren exponiert an Körschwasser erhoben wurden. $r^2 = 0,59$.

3.4.2 Diskussion

Unter der Voraussetzung, daß hauptsächlich PAH und PCB für die Induktionsantwort der Phase I verantwortlich sind, wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Antwort in vivo und in vitro erwartet. Dabei wird außerdem vorausgesetzt, daß PAH und PCB konzentrationsadditiv wirken. Die Ergebnisse zeigen, daß ein linearer Zusammenhang zwischen in vivo- und in vitro-Daten nicht eindeutig gegeben ist. Faßt man die Ergebnisse aus Kontrolle und Körsch zusammen, ist der Regressionskoeffizient 0,19, bei Berücksichtigung nur der Körschdaten liegt er bereits bei 0,59. Die schwache Korrelation kann unterschiedliche Ursachen haben: Entweder wurden

1. auch mit den PAH und PCB nicht alle für die Induktion relevanten Stoffe erfaßt,
2. in vivo hemmend wirkende Substanzen nicht mit extrahiert,
3. PAH und PCB wirken nicht konzentrationsadditiv,
4. Einflüsse nicht chemischer Faktoren wirken auf die EROD-Aktivität in vivo, können aber in vitro keine Wirkung zeigen.

Der höhere Korrelationskoeffizient, der bei der Regression über die „Körschdaten" berechnet wurde, gibt einen Hinweis darauf, daß der Zusammenhang zwischen in vivo und in vitro zumindest teilweise auf den Einfluß von Schadstoffen zurückzuführen ist, die im Kontrollwasser nicht vorhanden waren.

Zu 1:

Die Tatsache, daß die Ergebnisse in vivo und in vitro relativ schwach korrelieren, deutet darauf hin, daß die Induktionsantwort durch weitere Parameter und nicht nur von PAH und PCB beeinflußt wird. Es ist bekannt, daß neben PAH, PCB, Dioxinen und Furanen auch Pestizide induzieren können (Kobayashi et al. 1993). Eventuell relevante Dioxine, Furane und Pestizide wurden in dem Extrakt wahrscheinlich mit erfaßt (Schwirzer et al. 1998, vergleiche auch log K_{OW}-Daten aus Tabelle 3.2). Allerdings könnten induzierende PAH, die in vivo wirken konnten, im Extrakt fehlen. Hier gilt wieder, was bereits für den Cocktailversuch diskutiert wurde. Die rasche Metabolisierung der PAH und der damit verbundene Abtransport über die Galle verringert die Konzentration in der Leber. Beim Vergleich von in vivo und in vitro wäre die Wirkung eine relativ verringerte Induktionsantwort in vitro, die den Regressionskoeffizienten vermindern würde. Bei der Probe K5 (Tab. 3.8) könnte das z.B. der Fall sein.

Zu 2:

Ein gegenteiliger Effekt wäre die Hemmung von CYP1A in vivo durch Substanzen wie z.B. Schwermetalle (van den Hurk et al. 1998), die nicht mit extrahiert wurden. Eine solche Hemmung hätte einen gegenteiligen Effekt: die Induktionsantwort in vitro wäre relativ höher als die in vivo, da die hemmende Wirkung in vitro nicht mehr auftritt.

Zu 3:

Die konzentrationsadditive Wirkung von PAH und PCB konnte in Kapitel 5 anhand eines exemplarischen Gemisches aus Benzo(a)pyren und 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl gezeigt werden. Die Voraussetzung der Konzentrationsadditivität ist damit wahrscheinlich erfüllt und sollte bei der Regressionsanalyse nicht vermindernd auf den Regressionskoeffizienten wirken.

Zu 4:

Einflüsse nicht chemischer Faktoren wie Temperatur, Alter oder Geschlecht auf die EROD-Induktion konnten mit den vorhandenen Daten aus dem Freiland nicht belegt werden. Um den Einfluß des Geschlechts oder des Alters auszuschließen, wurden juvenile Tiere in die Versuche eingesetzt. Ein Einfluß der Temperatur auf die Ergebnisse in vivo kann nicht ausgeschlossen werden, die Freilandergebnisse ließen jedoch darauf schließen, daß er nicht gravierend ist.

Die Ergebnisse aus diesem Kapitel haben bestätigt, daß auch Befunde, die mit einem relativ gut untersuchten und über Jahre eingesetzten Biomarker wie dem der Induktion von Cytochrom P4501A gewonnen werden, nicht eindeutig auf eine ursächliche Schadstoffbelastung zurückgeführt werden können. Dies ist aber der Zweck des Einsatzes eines Biomarkers. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, den Anteil zu quantifizieren, den Schadstoffe an der Induktion von CYP1A haben können. Der Extraktversuch hat Hinweise darauf gegeben, daß die Induktion von CYP1A in dem einen der beiden untersuchten Gewässer, der Körsch, zu ca 60% (da $r^2 = 0,59$) auf die Belastung mit lipophilen Xenobiotika zurückgeführt werden kann.

4 Regulierung von CYP1A in vitro

4.1 Einleitung

Bei der Interpretation der Freilanddaten in Zusammenhang mit den angegliederten in vivo- und in vitro-Versuchen (Kapitel 3) trat die Frage auf, ob die Reaktion des untersuchten Biomarkers kausal verstanden ist. Für die Aktivität der Ethoxyresorufin-O-Deethylase ist bekannt, daß sie durch PAH, PCB, Dioxine und Furane (Kapitel 1) induziert wird. Sie wird deshalb häufig als Expositionsmarker für eine Belastung mit diesen Substanzen eingesetzt. Die Enzymreaktion wird neben den Schadstoffen durch Faktoren wie die Temperatur (Andersson und Koivusaari 1986, Carpenter et al. 1990), die Jahreszeit und das Geschlecht von Fischen (Eggens et al. 1996, Koivusaari et al. 1981) beeinflußt. Kapitel 3 hat gezeigt, daß der kausale Zusammenhang zwischen Schadstoffbelastung im Freiland bzw. Halbfreiland und Induktion der EROD-Aktivität in der Leber von Fischen nicht eindeutig hergestellt werden konnte. Dies kann entweder auf einen Einfluß der genannten Parameter oder auf den Einfluß weiterer unbekannter Faktoren zurückgeführt werden. Es ist z.B. wenig bekannt darüber, wie die EROD-Aktivität auf im Freiland vorliegende Mischungen von Schadstoffen reagiert. Um die Biomarkerantwort der häufig eingesetzten EROD-Induktion diesbezüglich besser interpretieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit in vitro-Systeme eingesetzt. Mit Hilfe von in vitro-Systemen sollten Untersuchungen zur Kombinationswirkung von PAH und PCB durchgeführt werden (Kapitel 5). Es wurden in vitro-Systeme als Testsysteme ausgewählt, da in vivo-Experimente arbeits-und zeitaufwendiger sind und den Einsatz vieler Tiere erfordern. Die Auswahl der in vitro-Systeme fiel auf zwei Zellkultursysteme aus der Regenbogenforelle, die zunächst in ihrem Induktionsverhalten miteinander verglichen wurden. Die Charakterisierung erfolgte dabei über ihre Induktionskapazität gegenüber PAH sowie die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Induktion in beiden Systemen. Weiterhin wurde der Einfluß von unterschiedlichen Zellkulturbedingungen auf die EROD-Induktionskapazität untersucht.

Bei der Leber handelt es sich um ein wesentliches Zielorgan bei der Aufnahme und dem Metabolismus von Schadstoffen (Goksøyr und Husøyr 1998). Deshalb wurden zwei Leberzellsysteme als in vitro-Systeme ausgewählt. Die Wahl fiel auf Primärhepatocyten aus der Regenbogenforelle und die Zellinie RTL-W1 (rainbow trout liver-Waterloo 1). Beide in vitro-Systeme stammen aus der gleichen Art (*Oncorhynchus mykiss*). Da die Regenbogenforelle mit der im Freiland eingesetzten Bachforelle nahe verwandt ist, sind die in vitro-Ergebnisse bei der Interpretation der Freilanddaten einsetzbar. Dies gilt besonders für die Ergebnisse aus der Primärzellkultur, da dieses in vitro-Zellkultursystem dem in vivo-System wahrscheinlich noch näher ist als das Zellkultursystem der Zellinie.

Primärhepatocyten aus der Regenbogenforelle weisen in Monolayerkultur für einige Tage eine gute CYP1A-Konservierung auf (Braunbeck et al. 1995, Pesonen et al. 1989, Scholz et al. 1997, Segner 1998b). Diese Art der Zellkultur ist damit für den in der vorliegenden Arbeit betrachteten Effektzeitraum von maximal 48h gut geeignet. Andere Methoden der Primärzellkultur sind die Suspensions- oder Aggregatkultur. In Suspensionskultur können Primärhepatocyten im Gegensatz zur Monolayerkultur nur über wenige Stunden nach der Isolierung ein-

gesetzt werden (Baksi und Frazier 1990). In der Aggregatkultur dagegen bleibt die Expression von CYP1A in Primärhepatocyten aus der Forelle über einen längeren Zeitraum erhalten (Cravedi et al. 1996, Flouriot et al. 1995). Die Monolayerkultur wurde ausgewählt, da sie in Kombination mit der verwendeten Methode der CYP1A-Bestimmung (siehe auch Kapitel 2.2.6) die Messung einer großen Zahl an Replikaten aus einer Isolierung erlaubt.

Die Induzierbarkeit von CYP1A in Primärhepatocyten wurde bereits nachgewiesen (Pesonen et al. 1989, Pesonen et al. 1992). Auch die RTL-W1 Zellinie weist eine hohe Induktionskapazität von CYP1A auf (Clemons et al. 1998, Lee et al. 1993). Wichtig ist dabei, daß die Zellinie RTL-W1 nicht aus einem hepatozellulärem Karzinom stammt wie z.B. die Zellinie PLHC-1 (Hahn et al. 1993), die häufig für Untersuchungen zur Induktionskapazität von Schadstoffen herangezogen wird.

Zum Vergleich der beiden Systeme wurde die Induktion von CYP1A durch neun Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) untersucht. Die Substanzen Anthracen (Ant), Benz(a)anthracen (BaA), Benzo(a)pyren (BaP), Benzo(b)fluoranthen (BbF), Chrysen (Chr), Fluoranthen (Fluo), 3-Methylcholanthren (3-MC), Phenanthren (Phen) und Pyren (Pyr) wurden ausgewählt, weil sie in der Umwelt weit verbreitet sind. Für die Substanzen BaA, BaP, BbF, Chr und 3-MC liegen bereits Induktionsdaten aus Fischen (hauptsächlich Regenbogenforelle) und der Ratte vor (Berndtson und Chen 1994, Celander et al. 1996, Chiarolini et al. 1997, Masfaraud et al. 1992, Van Veld 1988, Willett et al. 1996).

Anhand von 3-MC wurde der zeitliche Verlauf der Induktion in beiden Systemen bestimmt, da Kenntnis hierüber für die Auswahl eines Meßzeitpunkts wichtig ist. Es ist denkbar, daß verschiedene in vitro-Systeme unterschiedliche Kinetiken in der Expression von CYP1A zeigen. Deshalb sollte für jedes verwendete System bekannt sein, wann eine Induktion von CYP1A auftritt. Ein valider Meßzeitpunkt ist dadurch gekennzeichnet, daß eine signifikante Induktion gegenüber der Lösungsmittelkontrolle vorliegt. Über den Vergleich der Kinetik der beiden in dieser Arbeit eingesetzten in vitro-Systeme sollte außerdem herausgefunden werden, ob valide Meßzeitpunkte in den beiden Systemen miteinander vergleichbar sind.

Beide in vitro-Systeme wurden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Der Hauptunterschied lag im Zusatz von fötalem Kälberserum im Medium der RTL-W1-Zellinie. Deshalb wurde der Einfluß von Serum auf die Induktionskapazität von CYP1A durch 3-MC in beiden Systemen untersucht.

4.2 Induktion durch Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe

In den beiden Zellkultursystemen RTL-W1 und Primärhepatocyten wurde die Induktion von CYP1A durch die PAH Ant, BaA, BaP, BbF, Chr, Fluo, 3-MC, Phen und Pyr auf der katalytischen Ebene nach 24h Inkubationszeit bestimmt.

4.2.1 Ergebnisse

Die EROD-Induktionsantworten wurden wie folgt charakterisiert:

1. Die Induktion der EROD-Aktivität wurde im Vergleich zur EROD-Aktivität der DMSO-Kontrolle ermittelt. Dabei wurde bei jeder signifikanten Erhöhung der EROD-Aktivität relativ zur Kontrolle von einer Induktion gesprochen.

2. Die konzentrationsabhängige Steigerung der EROD-Aktivität wurde für jede Substanz durch eine nicht lineare Regression beschrieben. Dabei wurde die folgende Funktion mit den vier Parametern Maximum, Minimum, EC50 und der Steigung b geschätzt.

$$f = \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^b} + \min \qquad 4.1$$

Dabei sind f = Funktion f(min, max, EC50, b, x), max = Maximum, min = Minimum, b = Steigung, EC50 = Konzentration bei halber maximaler EROD-Aktivität.

3. Induktionsfaktor: Der Induktionsfaktor ist das Verhältnis von Maximal- zu Kontrollwert. Er beschreibt die relative Steigerungsfähigkeit des Systems.

4. Induktionsspanne: Die Induktionsspanne ist die Differenz von Maximal- und Kontrollwert. Sie beschreibt die absolute Steigerungsfähigkeit des Systems.

4.2.1.1 RTL-W1

In den Abbildungen 4.1 bis 4.6 werden die Ergebnisse für die Induktion nach 24h in der Zellinie RTL-W1 exemplarisch für jede Substanz gezeigt. Die Auswahl fiel dabei auf die Darstellung eines repräsentativen Versuchs und soll den Kurvenverlauf der Induktion für die verschiedenen Stoffe veranschaulichen. Auf die graphische Zusammenfassung aller Ergebnisse für die verschiedenen Substanzen wurde aufgrund des Umfangs der Meßergebnisse verzichtet. Die Unterschiede zwischen den Versuchen bezüglich der vier Parameter max, min, EC50 und b sind der Tabelle A.1 im Anhang zu entnehmen. In Tabelle A.1 im Anhang sind alle Ergebnisse für die Induktion von CYP1A durch die Substanzen Ant, BaA, BbF, BaP, Chr, Fluo, 3-MC, Phen und Pyr zusammengefaßt. Dargestellt sind die konzentrationsabhängigen EROD-Aktivitäten und die berechneten Parameter max, min, EC50 und b sowie die Induktionsfaktoren und -spannen.

Die Abbildungen 4.1 bis 4.6 zeigen die Induktion der Ethoxyresorufin-O-Deethylase als spezifische katalytische Aktivität von CYP1A in pmol/mg/min. Für die Stoffe BaA, BaP, BbF, Chr und 3-MC liegt eine konzentrationsabhängige Induktion vor (Abb. 4.1 bis 4.5). Nach Erreichen des geschätzten Maximums nimmt die Induktion mit steigender Konzentration des Induktors teilweise wieder ab (Tab. A.1 im Anhang). Diese Abnahme wurde bei der Schätzung der nicht-linearen Regressionen nicht berücksichtigt.

Die Induktionsfaktoren der Substanzen BaA, BbF, BaP, Chr und 3-MC liegen bei der Zellinie RTL-W1 zwischen 11,24 und 24,26. Der Mittelwert ist 16,83, die Standardabweichung ist 3,12 (im folgenden in Klammern angegeben). Die Induktionsspannen schwanken dabei zwischen 5,65 pmol/mg/min und 17,49 pmol/mg/min. Der Mittelwert der Induktionsspannen liegt bei 10,83 (3,64) pmol/mg/min. Die Veränderungen in der Induktionsspanne sind auf Schwankungen der Maxima zurückzuführen. Die DMSO-Kontrolle ist in der Zellinie RTL-W1 relativ stabil, der Mittelwert aus allen Versuchen liegt bei 0,70 (0,26) pmol/mg/min. Die Schwankungen im Maximum scheinen abhängig von der Zellpassage zu sein, innerhalb eines Versuchs sind sie ähnlich (Tab. A.1 im Anhang).

Die Substanzen Ant, Fluo, Phen und Pyr haben in der Zellinie RTL-W1 nicht induziert (Abb. 4.6). Bezüglich der EROD-Induktion in der Zellinie RTL-W1 läßt sich also eine Eintei-

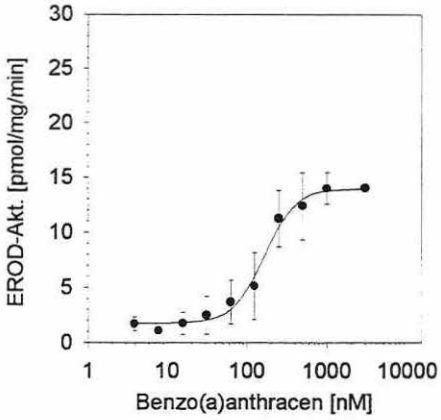

Abb. 4.1

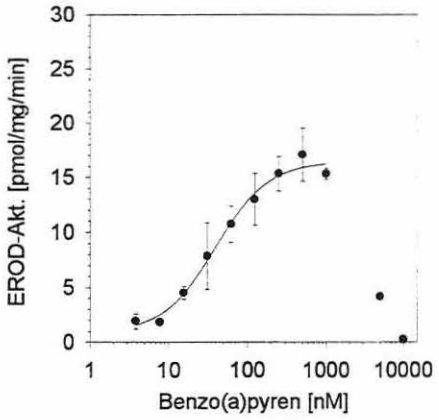

Abb. 4.2

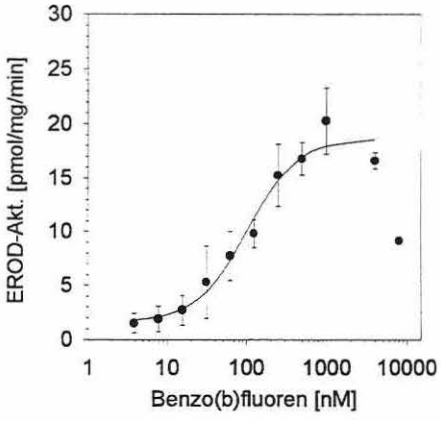

Abb. 4.3

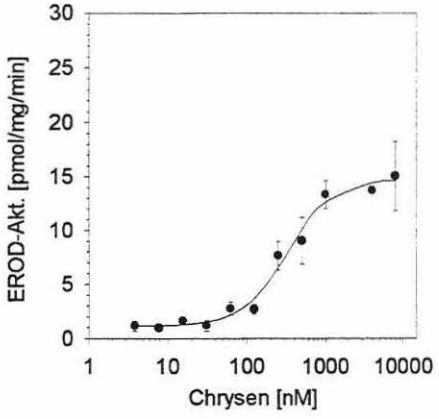

Abb. 4.4

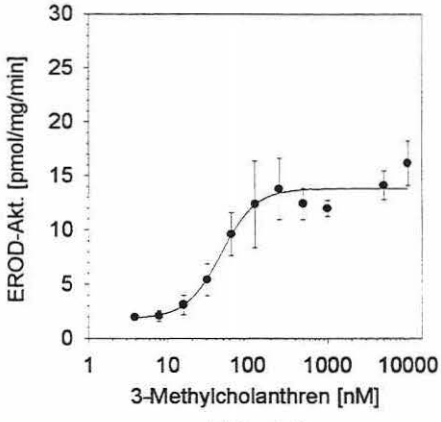

Abb. 4.5

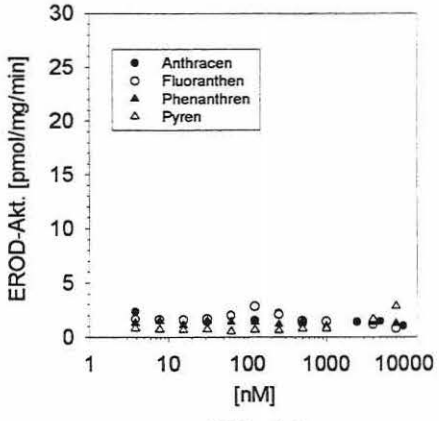

Abb. 4.6

Abb. 4.1 bis 4.6. EROD-Induktion in RTL-W1-Zellen durch die neun untersuchten PAH nach 24h.

lung der neun PAH in Induzierer (BaA, BbF, BaP, Chr und 3-MC) und Nicht-Induzierer (Ant, Fluo, Phen und Pyr) vornehmen.

4.2.1.2 Primärhepatocyten

Die Abbildungen 4.7 bis 4.12 zeigen die EROD-Aktivität in Primärhepatocyten nach 24 stündiger Exposition an die genannten neun PAH. Dargestellt sind Versuche, in denen für die Substanzen BaA, BaP, BbF, Chr und 3-MC eine konzentrationsabhängige Erhöhung der EROD-Aktivität gemessen wurde. Die Ergebnisse aus allen durchgeführten Versuchen werden in Tabelle A.2 im Anhang gezeigt. In der Tabelle A.2 dargestellt sind die konzentrationsabhängigen EROD-Aktivitäten, die berechneten Parameter max, min, EC50 und b sowie die Induktionsfaktoren und -spannen.

Die Induktionsfaktoren für die Substanzen BaA, BaP, BbF, Chr und 3-MC aus den Versuchen, für die ein Maximum geschätzt werden konnte (Tab. A.2 im Anhang) liegen zwischen 1,66 und 7,02. Der Mittelwert liegt bei 3,75 (1,45). Die Induktionsspanne umfaßt bei diesen Substanzen Werte von 12,95 pmol/mg/min bis 140,14 pmol/mg/min. Der Mittelwert ist 56,54 (30,70) pmol/mg/min. Bei den Primärhepatocyten sind Schwankungen in der Induktionsspanne auf Veränderungen im Maximum und in der DMSO-Kontrolle zurückzuführen. Die Basalaktivität der EROD-Aktivität ist deutlich höher als in RTL-W1, der Mittelwert liegt bei 29,50 (22,00) pmol/mg/min. Damit sind die Induktionsfaktoren geringer als in RTL-W1.

Die Substanzen Ant, Fluo, Phen und Pyr haben in den gezeigten Beispielen nicht induziert (Abb. 4.12). Aus Tabelle A.2 (Anhang) wird jedoch ersichtlich, daß diese Stoffe in einigen Fällen eine Erhöhung der EROD-Aktivität hervorgerufen haben. In Fisch 10 aus Versuch 11 z.B. (Tab. A.2) haben nicht nur BaA, BbF, BaP, Chr und 3-MC, sondern alle untersuchten PAH eine konzentrationsabhängige Induktion gezeigt. Die Induktion der EROD-Aktivität in Fisch 10 durch die Substanzen Ant, Fluo, Phen und Pyr sind in den Abbildungen 4.13 bis 4.16 dargestellt.

Die Induktionsfaktoren für Ant, Fluo, Phe und Pyr aus allen Versuchen liegen zwischen 1,34 und 5,06 (MW = 3,04 (1,32)), die Induktionsspannen liegen zwischen 3,58 pmol/mg/min und 77,31 pmol/mg/min (MW = 43,22 (26,18)). Das Verhältnis der Anzahl der Versuche, in denen die Substanzen Ant, Fluo, Phe und Pyr die EROD-Aktivität in Primärhepatocyten induziert haben oder nicht, ist in Tabelle 4.1 zusammengefaßt:

Tab. 4.1. Anzahl der Versuche mit bzw. ohne EROD-Induktion durch die angegebenen Substanzen in Primärhepatocyten.

	Anthracen	Fluoranthen	Phenanthren	Pyren
Anzahl der Versuche insgesamt	4	4	4	5
Anzahl der Versuche mit Induktion in Primärhepatocyten	2	1	2	3
Anzahl der Versuche ohne Induktion in Primärhepatocyten	2	3	2	2

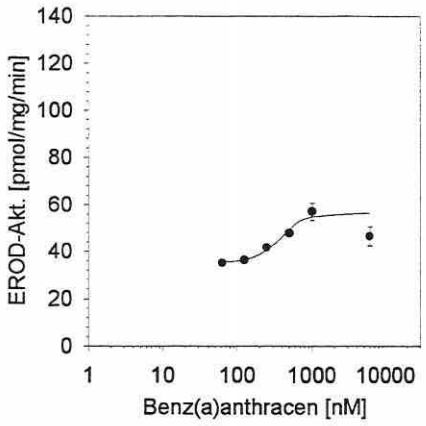

Abb. 4.7

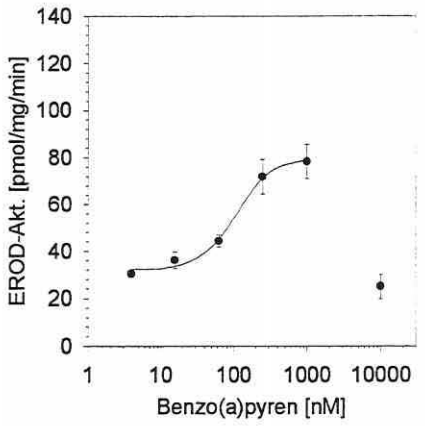

Abb. 4.8

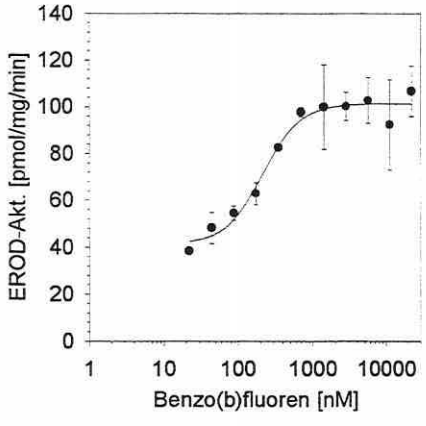

Abb. 4.9

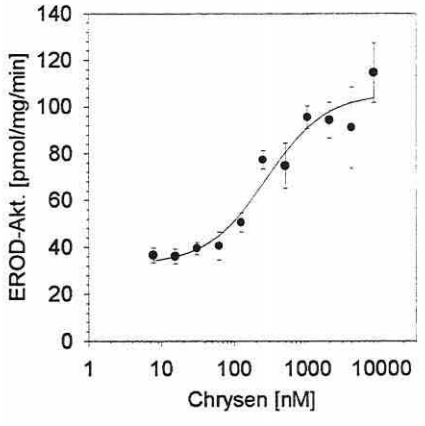

Abb. 4.10

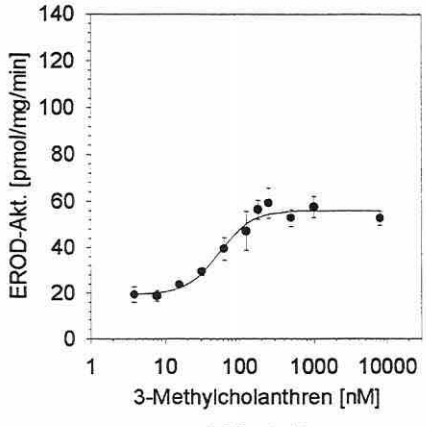

Abb. 4.11

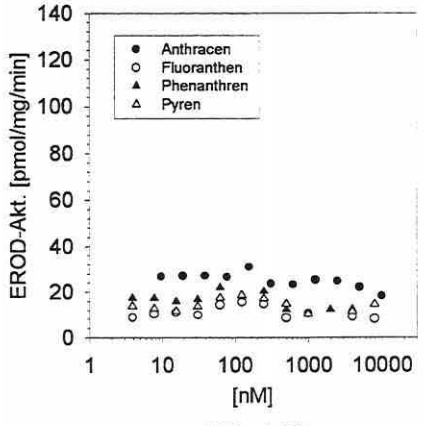

Abb. 4.12

Abb. 4.7 bis 4.12. EROD-Induktion in Primärhepatocyten durch die neun untersuchten PAH nach 24h.

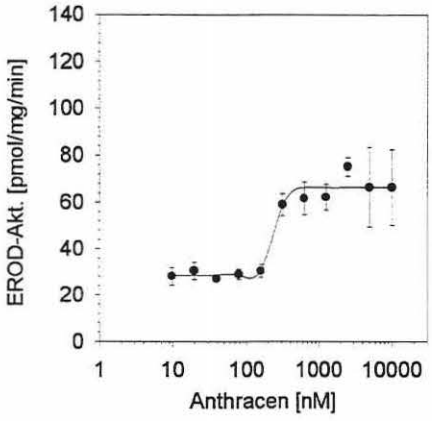

Abb. 4.13

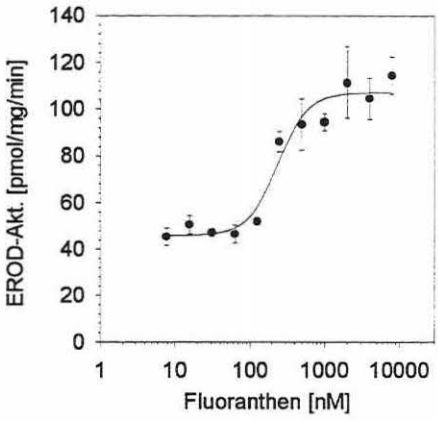

Abb. 4.14

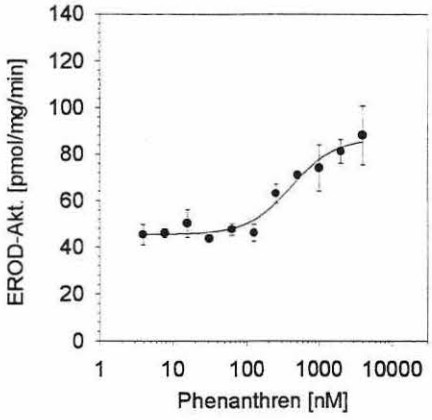

Abb. 4.15

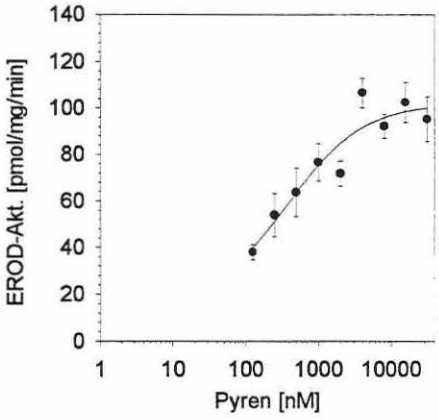

Abb. 4.16

Abb. 4.13 bis 4.16. EROD-Induktion in Primärhepatocyten aus Fisch 10 (Versuch 11) durch Anthracen, Fluoranthen, Phenanthren und Pyren nach 24h.

Mit den Induktionsdaten für Primärhepatocyten können die Substanzen BaA, BaP, BbF, Chry und 3-MC als Induzierer beschrieben werden. Für die Stoffe Ant, Fluo, Phen und Pyr kann keine eindeutige Einteilung in Induzierer oder Nicht-Induzierer vorgenommen werden.

4.2.1.3 Vergleich von RTL-W1 und Primärhepatocyten

Primärhepatocyten und RTL-W1-Zellen unterscheiden sich in ihrer konstitutiven EROD-Aktivität, dem Induktionsmaximum und damit auch in den Induktionsfaktoren und -spannen. Die mittleren Werte sind noch einmal in Tabelle 4.2 zusammengefaßt:

Tab. 4.2. Mittelwerte für die konstitutive EROD-Aktivität, die Induktionsmaxima, -faktoren und -spannen in RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten aus allen Induktionsdaten. Für die Primärhepatocyten wurden die Induktionsdaten den oben beschriebenen Ergebnissen entsprechend aufgeteilt in Induzierer (BaA, BaP, BbF, Chr und 3-MC) und Nicht-Induzierer (Substanzen, die nur in einigen Fällen induzierten: Ant, Fluo, Phen und Pyr). Standardabweichungen in Klammern. *: Die mittlere Basalaktivität wurde aus allen durchgeführten Versuchen in Primärhepatocyten berechnet.

System	Basalaktivitiät [pmol/mg/min]	Maximum [pmol/mg/min]	Induktionsfaktor	Induktionsspanne [pmol/mg/min]
RTL-W1	0,70 (0,26)	11,55 (3,87)	16,83 (3,12)	10,83 (3,64)
Primärhepatocyten (Induzierer)	29,50* (22,00)	76,95 (37,37)	3,75 (1,45)	56,54 (30,70)
Primärhepatocyten (Nicht-Induzierer)		65,75 (34,99)	3,04 (1,32)	43,22 (26,18)

4.2.2 Diskussion

4.2.2.1 RTL-W1

In den Abbildungen 4.1 bis 4.5 sind konzentrationsabhängige Wirkungen für die Stoffe BaA, BaP, BbF, Chry und 3-MC zu erkennen. Diese Substanzen können bezüglich dieses in vitro-Systems als Induktoren bezeichnet werden. Die Fähigkeit der genannten Stoffe, CYP1A in vitro zu induzieren, ist auch aus anderen Systemen bekannt (Willett et al. 1996).

Die Induktion von CYP1A folgt einem sigmoidalen Verlauf, nach Erreichen eines Maximums nimmt die EROD-Aktivität mit steigenden Konzentrationen in den meisten Fällen wieder ab (Tab. A.1 im Anhang). Es ist nicht auszuschließen, daß diese Abnahme auf Zytotoxizität beruht. Für die Zellinie RTgill-W1 (rainbow trout gill) liegen Zytotoxizitätsdaten mit Ausnahme von 3-MC bis zu den in Tabelle 4.3 (aus Schirmer et al. 1998) aufgeführten Konzentrationen vor.

Aus den Daten von Schirmer et al. (1998) kann nicht eindeutig gefolgert werden, daß die getesteten PAH bei den eingesetzten hohen Konzentrationen nicht zytotoxisch wirken. Weitere Literaturstellen (Chiarolini et al. 1997, Braunbeck et al. 1995, Zaroogian und Voyer 1995) geben keinen Hinweis darauf, daß PAH in den hier getesteten Konzentrationen zytotoxisch wirken. Im Gegensatz dazu finden Babich und Borenfreund (1987) leichte zytotoxische Effekte in der Zellinie BF-2 nach 24h Exposition an 50µg/ml BaA, BaP, Chr, 3-MC, Phen oder Pyr. Nach Babich und Borenfreund (1987) werden maximal 30% der Zellen geschädigt. Die eventuell auftretende Zytotoxizität kann demnach nicht den vollständigen Rückgang der CYP1A-Aktivität auf das Kontrollniveau erklären, der in der vorliegenden Arbeit in einigen Fällen beobachtet wurde.

Tab. 4.3. Zytotoxizität von PAH in der Zellinie RTgill-W1 (aus Schirmer et al. 1998) unter Angabe der von den Autoren verwendeten Konzentrationen. Im Vergleich dazu werden die Konzentrationen angegeben, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Substanz	Höchste getestete Konzentration	Zytotoxizität	Eigene getestete Höchstkonzentration
Anthracen	110000 nM	nein	10000 nM
Benz(a)anthracen	137 nM	nein	6000 nM
Benzo(a)pyren	180 nM	nein	10000 nM
Benzo(b)fluoranthen	1630 nM	nein	22500 nM
Chrysen	325 nM	nein	8000 nM
Fluoranthen	4950 nM	nein	8000 nM
Phenanthren	200000 nM	ab 177000 nM	8000 nM
Pyren	2910 nM	nein	128000 nM

Eine Hypothese für die Abnahme der EROD-Aktivität in vitro ist die kompetitive Hemmung durch den Induktor bei hohen Konzentrationen während der Durchführung des Assays (Gooch et al. 1989). Es ist bekannt, daß die katalytische Aktivität von Cytochrom P4501A unter PCB- (Goksøyr et al. 1991) oder TCB-Einfluß (Hahn et al. 1993) mit steigenden Konzentrationen nach Erreichen eines „katalytischen Induktionsmaximums" wieder abnehmen kann, obwohl der Gehalt an Cytochrom P4501A-Protein weiter steigt. Die Abnahme der EROD-Aktivität ist daher wahrscheinlich nicht auf Zytotoxizität zurückzuführen.

Ein weiterer Grund für die Abnahme der EROD-Induktion bei steigenden Konzentrationen könnte die Akkumulation von Porphyrinen sein. In embryonalen Hepatocyten des Haushuhns beginnt die Akkumulation von Porphyrinen bei den Konzentrationen von planaren PCB, bei denen eine EROD-Induktion nach Erreichen eines Maximums wieder abnimmt (Lorenzen et al. 1997, Kennedy et al. 1995, Tysklind et al. 1995). Die Akkumulation von Porphyrinen kann auch in der Fischzellinie PLHC-1 durch Exposition an Halogenierte Aromatische Kohlenwasserstoffe (HAH) hervorgerufen werden (Hahn und Chandran 1996). Sie scheint direkt oder indirekt über den Ah-Rezeptor oder über induziertes CYP1A gesteuert zu werden.

Die maximale Induktion der EROD-Aktivität schwankt zwischen mehreren Versuchen. Sie scheint durch eine unterschiedliche Induktionskapazität der verschiedenen Zellpassagen verursacht zu werden und äußert sich in der Varianz der Induktionsfaktoren und -spannen. Die Schwankungen sind allerdings geringer als in Primärhepatocyten (Kapitel 4.2.1.3). Die Zellen einer Zellinie sind genetisch fast identisch, dennoch könnten Unterschiede in der Zellphysiologie zwischen den verschiedenen Zellpassagen für die Unterschiede in der Induktionsantwort verantwortlich sein. Die Varianz kann auch methodische Ursachen haben, z.B. könnten kleine Unterschiede in der Konzentration des Induktors vorliegen. Bei jedem Versuch wurde das Inkubationsmedium neu angesetzt.

Vergleich der Substanzen über den EC50

Um die Induktionskapazität verschiedener Substanzen zu charakterisieren, wird in der Literatur häufig der EC50 verwendet. Eine Substanz ist desto wirksamer, je kleiner der EC50 ist. Damit dieser Vergleich aussagekräfig ist, müssen Minima und Maxima der EROD-Aktivität in etwa gleich sein. Um eine Reihenfolge für die Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen aufstellen zu können, wurden die EC50-Werte in der vorliegenden Arbeit deshalb nur innerhalb

eines Versuchs (mit ähnlichen Minima und Maxima) verglichen. Daraus ergibt sich aus den Versuchen 1 und 3 (Tab. A.1 im Anhang) folgende Reihenfolge für die Wirksamkeit von BaA, BaP, BbF, Chr und 3-MC:

$$BaP > 3\text{-}MC > BbF > BaA > Chr$$

Eine kleine Ausnahme in dieser Reihenfolge findet sich in Versuch 2. In Versuch 2 gilt Chr > BaA, dabei sind die EC50-Werte allerdings sehr ähnlich.

4.2.2.2 Primärhepatocyten

In den Abbildungen 4.7 bis 4.11 sind die konzentrationsabhängigen Wirkungen der Stoffe BaA, BaP, BbF, Chr und 3-MC auf die EROD-Aktivität in Primärhepatocyten zu erkennen. Auch in diesem Zellkultursystem können diese Substanzen also als Induktoren bezeichnet werden.

Nach Erreichen eines Induktionsmaximums nimmt die EROD-Aktivität mit steigenden Konzentrationen nur in einigen Fällen wieder ab (Tab. A.2 im Anhang). Zur Erklärung der Abnahme gelten die für RTL-W1-Zellen bereits diskutierten Aspekte (Zytotoxizität, kompetitive Hemmung im Assay, Akkumulation von Porphyrinen). Es ist unklar, warum die Abnahme der EROD-Aktivität mit steigenden Konzentrationen nicht so deutlich ist wie in den RTL-W1-Zellen.

Auffällig für die Primärhepatocyten ist die hohe Varianz zwischen mehreren Versuchen. Sie äußert sich in den hohen Standardabweichungen für den mittleren Induktionsfaktor (3,53 (1,42) pmol/mg/min) und die mittlere Induktionsspanne (52,30 (29,40) pmol/mg/min). Diese Werte beziehen sich auf alle getesteten Substanzen. Die Varianz in der Induktionskapazität von Primärhepatocyten ist wahrscheinlich auf den physiologischen Zustand der Zellen zurückzuführen. Sie könnte von der biologischen Varianz zwischen den Individuen, dem Geschlecht der Fische (Koivusaari et al. 1981), oder von der Qualität der Zellisolierung abhängen. In den vorliegenden Versuchen konnte kein Einfluß des Geschlechts auf die Induktionskapazität ausgemacht werden (in Tabelle A.2 im Anhang ist das Geschlecht der Fische eingetragen).

Die Ergebnisse für die Induktion von Ant, Fluo, Phen und Pyr in Primärhepatocyten sind widersprüchlich. In einigen Fällen haben sie keine Induktion hervorgerufen (Abb. 4.12), in anderen sehr wohl (Abb. 4.13 bis 4.16). Die Ursache für diese Unterschiede ist nicht bekannt. Die Substanzen Ant, Fluo, Phen und Pyr lassen sich damit in Primärhepatocyten nicht eindeutig als Induzierer oder Nicht-Induzierer beschreiben.

Vergleich der Substanzen über den EC50

Die Beurteilung der Wirksamkeit der untersuchten Substanzen über den EC50 ist in Primärhepatocyten schwer möglich, da in den meisten Fällen nicht genügend Zellen aus einer Isolierung gewonnen werden konnten, um alle Substanzen in einem Fisch zu testen. In Hepatocyten aus Fisch 10 konnten die Substanzen BaA, BaP, BbF und Chr getestet werden. Hier ergibt sich über die EC50-Werte folgende Reihenfolge für die Wirksamkeit der Substanzen:

$$BaP > (BaA) > BbF > Chr$$

Diese Reihenfolge entspricht in etwa der in RTL-W1-Zellen. Übereinstimmung liegt in BaP als wirksamster und Chr als schwächster Substanz. BaA kann hier nicht mit Sicherheit gewertet werden, da das geschätzte Maximum mit 167 pmol/mg/min über denen der anderen Substanzen liegt (BaP: 114 pmol/mg/min, BbF: 101 pmol/mg/min und Chr: 105 pmol/mg/min).

Generell scheinen die untersuchten PAH aber die gleiche Wirksamkeit in RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten aufzuweisen.

4.2.2.3 Vergleich von RTL-W1 und Primärhepatocyten

RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten unterscheiden sich in ihrer konstitutiven EROD-Aktivität, dem erreichten Induktionsmaximum und damit auch in den Induktionsfaktoren und -spannen (Tab. 4.2). Aufgrund ihrer hohen Basalaktivität weisen die Primärhepatocyten trotz einer deutlich höheren mittleren Induktionsspanne geringere Induktionsfaktoren auf als die RTL-W1-Zellen. Will man Rückschlüsse auf eine Induktionskapazität von in vitro-Systemen ziehen, sind der Induktionsfaktor und die abolute Induktion in Betracht zu ziehen. Dabei ist nicht geklärt, welches Kriterium aus physiologischer Sicht bedeutender ist. Betrachtet man nur die Induktionsfaktoren, scheinen die RTL-W1-Zellen höhere Induktionskapazitäten aufzuweisen. Unter ausschließlicher Berücksichtigung der Induktionsspannen zeigen die Primärhepatocyten eine größere Induktionskapazität. In Kapitel 4.3 wird gezeigt, daß die Induktionsspanne im Falle der RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten der geeignetere Parameter zu sein scheint, um die beiden in vitro-Systeme miteinander zu vergleichen. Grund dafür sind die großen Unterschiede in der konstitutiven EROD-Aktivität. Danach würden die Primärhepatocyten eine größere Induktionskapazität aufweisen.

Bei der Beurteilung der Induktionskapazität über die Parameter der Induktionsfaktoren oder -spannen muß aber die Problematik der schwankenden Induktionsmaxima berücksichtigt werden. Die Ursachen für die Schwankungen innerhalb eines Zellkultursystems und zwischen den beiden in vitro-Systeme sind unklar, sie könnten physiologisch, aber auch methodisch bedingt sein (siehe auch Kapitel 4.2.2.1). Hinzu kommt, daß das katalytische Induktionsmaximum nicht unbedingt der maximalen Induktion von CYP1A entsprechen muß. Hahn et al. (1996) haben gezeigt, daß die Induktion auf der CYP1A-Proteinebene weiter ansteigen kann und daß auf der Ebene des CYP1A-Proteins im Gegensatz zur EROD-Aktivität für alle Induktoren gleiche Maxima erreicht wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Parameter der Induktionsfaktoren und -spannen eingesetzt, um die Induktionskapazität der untersuchten in vitro-Systeme vergleichen zu können. Zu diesem Zweck schienen die verwendeten Parameter geeignet zu sein. Wenn die in vitro-Systeme zur Induktionsanalyse z.B. von Freilandproben eingesetzt werden sollen, spielt diese Induktionskapazität jedoch keine große Rolle mehr. Für eine Beurteilung von Freilandproben ist es wichtiger, wie empfindlich, d.h. bei welchen Konzentrationen, die in vitro-Systeme auf Schadstoffe reagieren. Zu diesem Zweck wird bei der Beurteilung meist der EC50 eingesetzt (in dessen Berechnung das Induktionsmaximum allerdings mit eingeht) (Hahn et al. 1996, Kennedy et al. 1996, Martin-Alguacil et al. 1991, Willett et al. 1997a). Beim Vergleich von RTL-W1 und Primärhepatocyten über den EC50 hat sich ergeben, daß beide in vitro-Systeme die gleiche relative Sensitivität gegenüber den untersuchten Substanzen aufweisen. Absolut gesehen kann aufgrund der Schwankungen in den EC50-Werten (Tab. A.1 und A.2 im Anhang) allerdings nicht beurteilt werden, ob die RTL-W1-Zellen oder die Primärhepatocyten empfindlicher auf die untersuchten Substanzen reagieren.

4.3 Induktion über die Zeit

In den beiden Zellkultursystemen RTL-W1 und Primärhepatocyten wurde der zeitliche Verlauf der Induktion bestimmt, um einen geeigneten Meßzeitpunkt für die Induktion von CYP1A zu

ermitteln. Ein geeigneter Meßzeitpunkt zeichnet sich dadurch aus, daß eine signifikante Induktion von CYP1A vorliegt. Neben dem zeitlichen Verlauf der Induktion bei Exposition an den Induktor wurde auch die Abnahme der Induktion nach Wegnahme des Induktors bestimmt, um die metabolische Kapazität der beiden in vitro-Systeme andeutungsweise beurteilen zu können.

4.3.1 Ergebnisse

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Induktion wurden RTL-W1 und Primärhepatocyten mit 3-MC inkubiert. Die Zunahme der EROD-Aktivität wurde über 24h gemessen. Danach erfolgte ein Wechsel zu schadstofffreiem Medium und die Abnahme der Induktion wurde wiederum über einen Zeitraum von 24h bestimmt. Die Abbildungen 4.17 und 4.18 zeigen den Verlauf der Induktion in RTL-W1, die Abbildungen 4.20 und 4.21 den Verlauf in Primärhepatocyten. Die Daten für die RTL-W1 Zellinie wurden von Kristin Schirmer, Universität von Waterloo, erhoben. Die Abbildungen 4.17 und 4.18 zeigen die Ergebnisse zweier unabhängiger Versuche. Die Ergebnisse für die Primärhepatocyten (Abb. 4.20 und 4.21) stammen aus einer Isolierung.

4.3.1.1 RTL-W1

In den RTL-W1 (Abb. 4.17) nimmt die Induktion der EROD-Aktivität über die Zeitpunkte 6h, 12h und 24h bezüglich der Induktionsspannen und -faktoren zu (Tab. 4.4). Bei höheren Konzentrationen erfolgt die Zunahme kontinuierlich, im Konzentrationsbereich von 3,9 nM bis 15,62 nM steigt die EROD-Aktivität zunächst an (6h), nimmt nach 12h und 24h jedoch wieder ab (Abb. 4.17). Diese Zunahme nach dem Mediumwechsel mit darauffolgender Abnahme der EROD-Aktivität ist auch in der DMSO-Kontrolle zu beobachten (Abb. 4.19). Nach dem Mediumwechsel nach 24h nimmt die Induktion in Bezug auf die Induktionsspannen gleichmäßig ab (Abb. 4.18, Tab. 4.4). Das Maximum der Induktion tritt nach dem Mediumwechsel bei immer höheren Konzentrationen auf, die Kurven verschieben sich mit der Zeit „nach rechts".

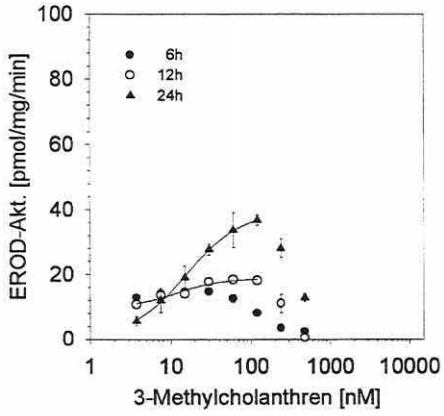

Abb. 4.17. EROD-Induktion durch 3-Methylcholanthren in RTL-W1-Zellen über 24h.

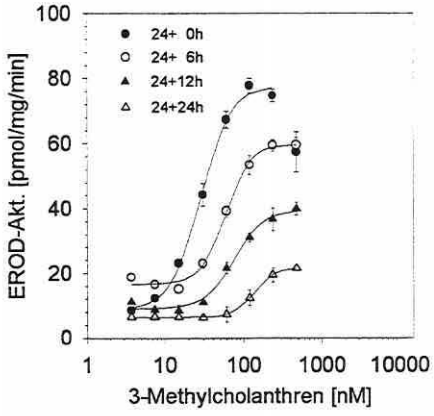

Abb. 4.18. Abnahme der EROD-Induktion in RTL-W1-Zellen über 24h nach Wechsel zu schadstofffreiem Medium zum Zeitpunkt 24+0h. Auf der Abszisse ist die 3-MC-Konzentration vor dem Wechsel angegeben.

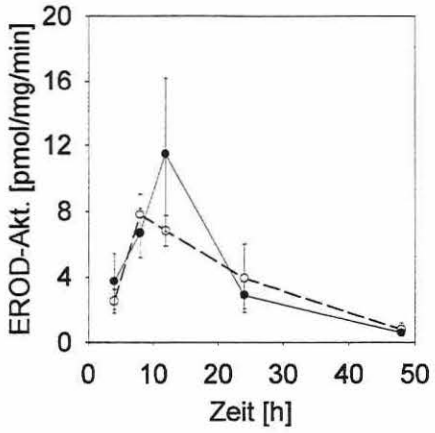

Abb. 4.19. EROD-Aktivität in der Lösungsmittelkontrolle von RTL-W1-Zellen über 48h nach Mediumwechsel zum Zeitpunkt 0h. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Versuche.

Tab. 4.4. Induktionsspannen und -faktoren in der Zellinie RTL-W1 und Primärhepatocyten über 48h. Während der ersten 24h wurden die Zellen an 3-MC exponiert. Zum Zeitpunkt 24+0h wurde das Medium gewechselt und die Abnahme der Induktion ohne 3-MC über weitere 24h gemessen. nb = nicht berechenbar, da keine signifikante Induktion vorhanden. *: Berechnung mit Minimum statt Kontrolle, da bei den Daten von Kristin Schirmer keine Kontrolle vorlag.

	6h	12h	24h	24+0h	24+4h	24+6h	24+8h	24+12h	24+24h
RTL-W1 Induktionsfaktor	nb	1,52	6,95	9,07*	5,09*		3,61*	4,38*	3,39*
RTL-W1 Induktionsspanne	nb	6,48	34,09	69,1*	53,58*		43,26*	30,5*	15,3*
Primärhepatocyten Induktionsfaktor	1,31	2,58	3,14	3,76		5,15		3,80	5,43
Primärhepatocyten Induktionsspanne	6,19	23,63	38,17	56,03		35,30		23,72	32,29

4.3.1.2 Primärhepatocyten

Auch für die Primärhepatocyten ist eine kontinuierliche Steigerung der Induktion über 6h, 12h und 24h zu erkennen (Abb. 4.20). Die Induktionsspannen und -faktoren sind Tabelle 4.4 zu entnehmen. Im Gegensatz zu den RTL-W1-Zellen ist bereits nach 6h eine leichte Erhöhung der EROD-Aktivität zu beobachten. Nach dem Mediumwechsel nimmt die Induktion rasch ab (Abb. 4.21). Bei 24+6h liegt die Induktionsspanne im Vergleich zu 24+0h (56,03 pmol/mg/min) nur noch bei 35,30 pmol/mg/min. Im Verlauf der nächsten 18h nimmt die EROD-Induktionshöhe bei kleinen Schwankungen nicht weiter ab (Tab 4.4).

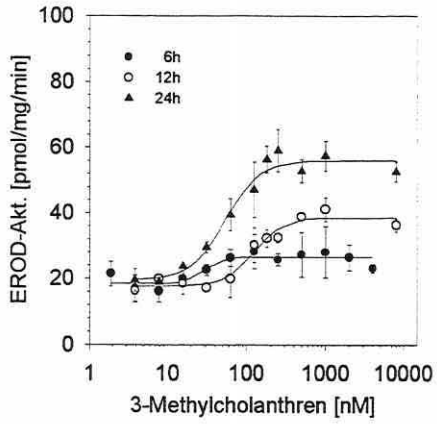

Abb. 4.20. EROD-Induktion durch 3-Methylcholanthren in Primärhepatocyten über 24h.

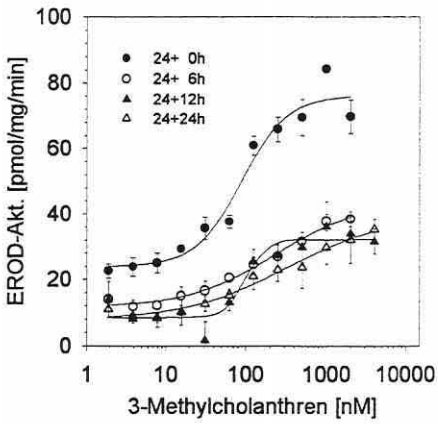

Abb. 4.21. Abnahme der EROD-Induktion in Primärhepatocyten über 24h nach Wechsel zu schadstofffreiem Medium zum Zeitpunkt 24+0h. Auf der Abszisse ist die 3-MC-Konzentration vor dem Wechsel angegeben.

4.3.2 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß der Verlauf der EROD-Induktion in beiden Zellkultursystemen insofern ähnlich verläuft, als die EROD-Aktivität über die ersten 24h zu und nach dem Mediumwechsel wieder abnimmt. Im Detail weisen die Kinetiken jedoch entscheidende Differenzen auf.

In den RTL-W1-Zellen nimmt die EROD-Aktivität über die ersten 24h zu, wobei nach 6h Inkubation allerdings noch keine Induktion auftritt. Nach dem Mediumwechsel zu schadstofffreiem Medium nimmt die Induktion über weitere 24h gleichmäßig wieder ab. Die Zunahme ist auf die Induktion von CYP1A durch 3-MC zurückzuführen (Berndtson und Chen 1994) und die Abnahme wahrscheinlich auf den Abbau von 3-MC durch CYP1A. Die kontinuierliche Abnahme nach dem Mediumwechsel spricht für einen gleichmäßigen Abbau des Induktors. Die Induktionsantwort wird nicht nur durch 3-MC, sondern bei geringen Konzentrationen zusätzlich wahrscheinlich durch den Medienwechsel beeinflußt (Kocarek et al. 1993). Das Minimum steigt zu den verschiedenen Zeitpunkten bis zu 8h nach dem Mediumwechsel an und nimmt im weiteren Verlauf wieder ab. Dies gilt sowohl für die ersten 24h mit und die weiteren 24h ohne Induktor. Kocarek et al. (1993) haben gezeigt, daß diese Induktion durch im Medium befindliches Tryptophan hervorgerufen werden kann. Bei höheren Konzentrationen wird dieser Effekt offensichtlich durch den stärkeren Einfluß des Induktors überlagert. Bei geringeren Konzentrationen von 3-MC wirkt er sich jedoch aus und vermindert die Induktionsspanne bis zu dem Meßzeitpunkt 12h. Diese Verminderung ist jedoch geringfügig.

Die Primärhepatocyten reagieren rascher auf den Induktor als die RTL-W1-Zellen. In den Primärhepatocyten liegt bereits nach 6h eine Induktion um 6,19 pmol/mg/min vor, die RTL-W1-Zellen haben zu diesem Zeitpunkt keine schadstoffabhängige Erhöhung der EROD-Aktivität gezeigt. Nach 12h sind die Primärzellen bereits um 23,63 pmol/mg/min induziert, die RTL-W1-Zellen um 6,48 pmol/mg/min. Anscheinend kommt es in den Primärhepatocyten etwas schneller zur Exprimierung von CYP1A. Beim Zeitpunkt 24h sind die Induktionsspannen

der beiden Systeme dann miteinander vergleichbar, in Primärhepatocyten liegt sie bei 38,17 pmol/mg/min, in RTL-W1-Zellen bei 34,09 pmol/mg/min. Die jeweiligen Induktionsfaktoren sind 3,14 (Primärhepatocyten, 24h) und 6,95 (RTL-W1-Zellen, 24h). Die Unterschiede in den Faktoren sind auf die höhere Basalaktivität in den Primärzellen zurückzuführen. Da die Induktionsspanne eine Aussage über die absolute Steigerungsfähigkeit des Systems trifft, scheinen die beiden in vitro-Systeme nach 24h Exposition an 3-MC in ihrer Induktionsantwort trotz unterschiedlicher Absolutniveaus miteinander vergleichbar zu sein. Für Primärhepatocyten und RTL-W1-Zellen ist aus eigenen Untersuchungen bekannt (Daten nicht gezeigt), daß sie ihr Induktionsmaximum bei andauernder Exposition weiter erhöhen können. Die vergleichbare Induktionsspanne in den beiden Systemen dürfte damit nicht durch eine eventuell vorhandene maximale Induktionskapazität von CYP1A, sondern durch die Expositionsdauer zu erklären sein. Auf der Grundlage der Induktionsspanne scheint der Zeitpunkt 24h in Primärhepatocyten und RTL-W1-Zellen also ein geeigneter Zeitpunkt für Induktionsanalysen zu sein.

Da der Induktionsfaktor von den absoluten Werten der EROD-Aktivität entscheidend beeinflußt wird, scheint die Induktionsspanne zum Vergleich der beiden in vitro-Systeme geeigneter zu sein. Der Induktionsfaktor sollte nur dann verwendet werden, wenn ähnliche konstitutive EROD-Aktivitäten in den zu vergleichenden Systemen vorherrschen.

Die Abnahme der EROD-Aktivität verläuft in Primärhepatocyten im Vergleich zu RTL-W1-Zellen nicht kontinuierlich. Die Induktion nimmt zuerst deutlich ab (24+6h), dann bleibt sie aber auf einem Niveau stehen. Dies ist ein entscheidender Unterschied zum Verlauf der Abnahme in RTL-W1-Zellen (Abb. 4.18 und 4.21).

Die Abnahme kann im wesentlichen durch drei Parameter beeinflußt werden: die Temperatur, die auf den Abbau der mRNA einwirkt, die Verfügbarkeit von restlichem Induktor nach dem Mediumwechsel, und der Zellzyklus von RTL-W1, der die Zellzahl in der Zellinie während des Versuchs erhöht.

RTL-W1-Zellen wurden bei 20°C und Primärhepatocyten bei 15°C inkubiert. Die höhere Temperatur sollte einen Abbau der mRNA in RTL-W1-Zellen beschleunigen. Dies könnte den gleichmäßigen Abbau der EROD-Induktion in diesem System erklären.

Die Verfügbarkeit von 3-MC wird in den beiden in vitro-Systemen wahrscheinlich durch zwei Faktoren beeinflußt: durch die Rücklösung des Induktors von den Plastikwänden der Kulturplatten, und durch im Medium befindliches Serum. Die benetzte Oberfläche ist in den 24well- und 48well-Platten in etwa gleich. In den 24well-Platten beträgt sie 2,83cm^2 und in den 48well-Platten 2,81cm^2. Allerdings ist die Fläche des well-Bodens in den 24well-Platten mit 1,76cm^2 deutlich größer als in den 48well-Platten mit 0,71cm^2. Die Kontaktfläche zum Plastik ist damit bei den Primärhepatocyten deutlich größer als bei den RTL-W1-Zellen. Über die Rücklösung vom Plastik ist die Verfügbarkeit von 3-MC für Primärhepatocyten daher wahrscheinlich größer als für die RTL-W1-Zellen. Primärhepatocyten weisen zusätzlich aufgrund ihrer Größe eventuell eine größere intrazelluläre Speicherung des Induktors auf als die RTL-W1-Zellen. Eine höhere Verfügbarkeit von 3-MC könnte also die bleibende Induktion in Primärhepatocyten nach dem Zeitpunkt 24+6h erklären. Andererseits könnte fötales Kälberserum auf die Verfügbarkeit von 3-MC einwirken. Es ist nur im Medium der RTL-W1-Zellen vorhanden und könnte den Induktor durch erleichterten Membrantransport in die Zelle entweder besser verfügbar machen oder die Verfügbarkeit durch Abbinden der Substanz verringern. In Kapitel 4.4 wird gezeigt, daß der Zusatz von Serum die Induktion in beiden Zellsystemen erhöhen kann. Der Einfluß der besseren Verfügbarkeit könnte den der Abbindung also überlagern. In beiden in vitro-Systemen gibt es demnach Faktoren, die die Verfügbarkeit von restlichem 3-MC

nach dem Mediumwechsel erhöhen. Ohne chemische Analyse bleibt unklar, wie sich diese Einflüsse auswirken.

Eine weitere Einflußgröße beim Rückgang der EROD-Induktionsspanne ist der Zellzyklus der RTL-W1-Zellen. Sie vermehren sich während der Inkubation, die Anzahl der Primärhepatocyten bleibt konstant. Die zunehmende Zellzahl von RTL-W1-Zellen erhöht wahrscheinlich den Abbau des Induktors und könnte den Einfluß der Temperatur auf den kontinuierlichen Rückgang der Induktionsspanne in den RTL-W1-Zellen verstärken.

Ohne Messung des mRNA-Gehalts und Analyse der 3-MC-Konzentration im Medium kann keine eindeutige Aussage über die Mechanismen der Abnahme getroffen werden. Entscheidend für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist, daß es sich bei dem 24h Zeitpunkt um einen validen Meßzeitpunkt für beide in vitro-Systeme handelt, um Induktionsanalysen durchzuführen.

4.4 Einfluß von Zellkulturbedingungen auf die Induktionskapazität

Die beiden hier untersuchten in vitro-Systeme müssen unter verschiedenen Kulturbedingungen gehalten werden. In RTL-W1-Zellen ist der Zusatz von fötalem Kälberserum im Medium erforderlich. Primärhepatocyten wurden auf Kulturplatten kultiviert, die mit verdünntem Matrigel beschichtet waren. Die Beschichtung mit Matrigel war erforderlich, um die Anheftung der Zellen an den Untergrund zu gewährleisten. Primärhepatocyten können auch in Kokultur mit RTG-2-Zellen gehalten werden (Scholz et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit war dies jedoch nicht möglich, da RTG-2-Zellen bei der hier verwendeten Methode der EROD-Bestimmung eine CYP1A-Induktion gezeigt haben und damit diese Induktion die Ergebnisse in den Primärhepatocyten überlagern könnte. Inwieweit Matrigel die Induktion in Primärhepatocyten beeinflußt, konnte daher nicht untersucht werden. Es sollte aber herausgefunden werden, ob die Induktion von CYP1A in RTL-W1-Zellen durch Matrigel beeinflußt wird. Dies war besonders für die Substanzen Ant, Fluo, Phen und Pyr von Interesse, die ohne Matrigel keine Induktion in RTL-W1-Zellen gezeigt haben.

4.4.1 Ergebnisse

4.4.1.1 Serumgehalt

In den Abbildungen 4.22 und 4.23 ist die EROD-Induktion in RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten durch 3-MC in Abhängigkeit von der Serumkonzentration im Medium dargestellt. Die Daten an RTL-W1-Zellen wurden von Kristin Schirmer, Universität von Waterloo, erhoben. Die Effekte lassen sich wie in den bisherigen Versuchen durch die sigmoidale Funktion (4.1) beschreiben. Dabei wurde die Abnahme der EROD-Aktivität nach Erreichen des Induktionsmaximums, die hier in beiden in vitro-Systemen auftritt, außer acht gelassen.

RTL-W1

Der Versuch zum Einfluß des Serumgehalts auf die Induktion von CYP1A wurde in RTL-W1-Zellen zweimal durchgeführt. Dargestellt und diskutiert werden hier nur die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs.

In RTL-W1-Zellen liegt bei 0% Serumgehalt nur eine geringe Induktionsspanne von 6,8 pmol/mg/min vor. Die Kontrolle liegt mit 0,57 pmol/mg/min deutlich unter der, die für 5%, 10% und 20% Serumgehalt gemessen wurde (8,64, 8,93, und 8,82 pmol/mg/min). Abb. 4.22 zeigt, daß die Induktionsspanne durch Zugabe von Serum in RTL-W1-Zellen gesteigert wird, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen 0% und 5%, jedoch kein Unterschied zwischen 5% und 10% Serumgehalt vorliegt. Bei 20% Serumgehalt nimmt das Induktionsmaximum im Vergleich zum Maximum bei 10% Serumgehalt wieder ab (Tab. 4.5). Der Unterschied fällt signifikant aus. Beide Wiederholungsversuche haben die gleiche Reaktion gezeigt (Daten nicht gezeigt).

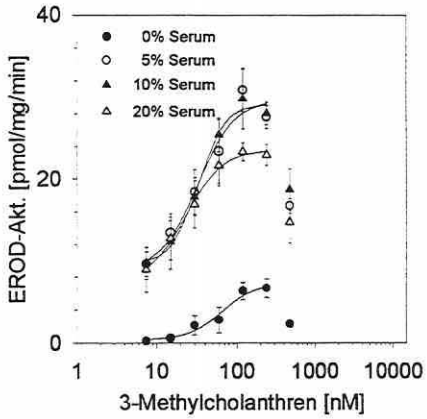

Abb. 4.22. EROD-Induktion durch 3-Methylcholanthren in RTL-W1-Zellen nach 24h bei unterschiedlichem Serumgehalt im Medium.

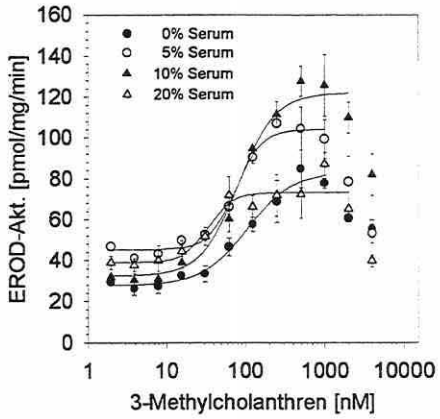

Abb. 4.23. EROD-Induktion durch 3-Methylcholanthren in Primärhepatocyten nach 24h bei unterschiedlichem Serumgehalt im Medium.

Tab. 4.5. Ergebnisse zum Einfluß des Serumgehalts auf die Induktion durch 3-Methylcholanthren in RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten. Dargestellt sind die Induktionsfaktoren und Induktionsspannen aus zwei repräsentativen Versuchen in RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten bei unterschiedlichen Serumkonzentrationen im Medium.

	0% Serum	5% Serum	10% Serum	20% Serum
RTL-W1 Induktionsfaktor	12,92	3,44	3,26	2,67
RTL-W1 Induktionsspanne [pmol/mg/min]	6,80	21,10	20,26	14,75
Primärhepatocyten (Versuch 7) Induktionsfaktor	2,64	2,43	2,96	2,10
Primärhepatocyten (Versuch 7) Induktionsspanne [pmol/mg/min]	51,81	61,43	80,84	38,41

Primärhepatocyten

In Primärhepatocyten wurde der Versuch zum Einfluß des Serumgehalts auf die CYP1A-Induktion sieben mal durchgeführt. Hier dargestellt und diskutiert wird der Versuch 7. Die Ergebnisse aus allen Versuchen sind in Tabelle A.3 im Anhang dargestellt.

In Primärhepatocyten nimmt die Induktionsspanne im gezeigten Beispiel (Versuch 7) mit steigender Serumkonzentration von 0% bis 10% zu (Tab. 4.5). Bei dieser Verschiebung wird auch das Kontrollniveau der EROD-Aktivität leicht angehoben (Abb. 4.23). Die Unterschiede zwischen 0% und 5% sowie zwischen 5% und 10% sind signifikant. Bei 20% Serumgehalt nimmt das Induktionsmaximum im Vergleich zu 10% wie in den RTL-W1-Zellen wieder ab.

Die Ergebnisse aus den sieben Versuchswiederholungen sind unterschiedlich. In zwei Fällen ließ sich kein signifikanter Einfluß durch das Serum feststellen (Versuch 1 und 2, Tab. A.3 im Anhang). In fünf weiteren Fällen beeinflußt das Serum die Reaktion. Dabei ist in drei Experimenten entscheidend, wie hoch der Anteil an Serum im Medium ist, es liegen Unterschiede in der Induktion zwischen 5 und 10% vor (Versuch 3, 4 und 7). In den Versuchen 5 und 6 spielt es nur eine Rolle, ob Serum im Medium vorhanden ist oder nicht. Der prozentuale Anteil an Serum im Medium hat hier keinen Einfluß auf die Induktion.

4.4.1.2 Matrigel

Die Substanzen Ant, Fluo, Phen und Pyr haben in RTL-W1-Zellen auch dann keine CYP1A-Induktion hervorgerufen, wenn die Zellen auf Matrigel inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Diskussion

4.4.2.1 Serumgehalt

Mit der Zugabe von Serum nimmt die Induktion der EROD-Aktivität in RTL-W1-Zellen in beiden durchgeführten Versuchen zu, in Primärhepatocyten in fünf von sieben Fällen. Bei der höchsten eingesetzten Serumkonzentration von 20% hat die Induktionsspanne in beiden in vitro-Systemen im Vergleich zur Induktionsspanne bei 10% Serumgehalt wieder abgenommen. Dieses Verhalten der EROD-Aktivität kann zwei Ursachen haben:

Serum könnte die Physiologie der Zellen verändern. In den Primärhepatocyten fördert es nach eigener Beobachtung die Anheftung an den Untergrund und die Reaggregation der Zellen nach der Isolierung. In den RTL-W1-Zellen hat das Serum wahrscheinlich ähnlich positive Effekte. Über den Einfluß auf die Physiologie fördert Serum wahrscheinlich auch die Induktionskapazität der beiden Zellkultursysteme. Für die RTL-W1-Zellen ist aus eigenen Versuchen bekannt (eigene Daten), daß sie nach mehreren Passagen ohne Serum im Medium keine Induktion von CYP1A mehr aufzeigen. Ihre schwache Reaktion bei 0% Serum ist daher wahrscheinlich auf suboptimale physiologische Bedingungen zurückzuführen. Die RTL-W1-Zellen werden routinemäßig mit 5% Serum kultiviert.

Primärhepatocyten können ohne Serum kultiviert werden und weisen ohne Serum eine deutliche Induktion von CYP1A auf. Dennoch könnte das Serum auch hier einen Einfluß auf die Physiologie und damit verbunden auf die Induktionskapazität von CYP1A haben, die sich in der gesteigerten Induktion bei 5% Serum gegenüber 0% Serum äußern würde.

Neben einem möglichen Einfluß auf die Physiologie der Zellen (Klaunig et al. 1985) könnte das Serum auch die Bioverfügbarkeit des Induktors verändern, indem es die Fremdstoffaufnahme durch die Membran in die Zellen vereinfacht oder erschwert. Durch die geförderte Aufnahme würde die intrazelluläre Konzentrationen von 3-MC und damit die Induktion von CYP1A erhöht. Bei weiterer Zunahme der intrazellulären Konzentration des Induktors (z.B. bei 20% Serumgehalt) kann eine Hemmung der Induktion auftreten. Sie wäre kompetitiv und wurde in Kapitel 4.2.2.1 bereits erläutert. In den RTL-W1-Zellen scheint die gesteigerte Induktion bei 5% gegenüber 0% allerdings nichts mit einer geförderten Aufnahme, sondern eher etwas mit der Physiologie der Zellen zu tun zu haben, da die RTL-W1-Zellen ohne Serum unter suboptimalen Bedingungen kultiviert werden. Die Abnahme bei weiterem Anstieg der Serumkonzentration könnte auf erhöhte Verfügbarkeit und damit auf die kompetitive Hemmung oder aber auf verminderte Verfügbarkeit durch Abbindung des Induktors zurückgeführt werden.

Im Zellkultursystem der Primärhepatocyten ist die Zugabe von Serum nicht absolut erforderlich, um die Induktionskapazität bezüglich CYP1A zu erhalten. Sie sind auch bei 0% induzierbar. Der Einfluß des Serums auf die Physiologie der Primärhepatocyten ist daher nicht so entscheidend wie in RTL-W1-Zellen, ausgeschlossen werden kann er jedoch nicht. Da das Serum nur in einigen Versuchen einen Einfluß auf die CYP1A-Antwort hatte, scheint der Einfluß auf die Physiologie der Zellen wahrscheinlicher zu sein als ein möglicher Einfluß auf die Bioverfügbarkeit von 3-MC. Im letzteren Fall sollte die Wirkung reproduzierbar und eindeutig konzentrationsabhängig sein. In Kapitel 4.2 wurde bereits diskutiert, daß die Induktion von Cytochrom P4501A durch PAH in Primärhepatocyten von der jeweiligen Zellisolierung abhängt. Als Grund für die Varianz in Primärhepatocyten wurden Unterschiede in der Zellphysiologie angenommen. Die Serumversuche scheinen diese Annahme zu bestätigen.

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß die verwendeten Serumkonzentrationen in RTL-W1-Zellen (5% Serum) und Primärhepatocyten (0% Serum) für das jeweilige System zum Induktionsnachweis von Schadstoffen geeignet waren. Die RTL-W1-Zellen zeigen bei 5% Serumgehalt eine signifikante Induktion, eine Erhöhung des Serumgehalts vermindert diese Induktion nur. Ohne Serum ist CYP1A in RTL-W1-Zellen nur sehr schwach induzierbar. In den Primärhepatocyten hat Serum teilweise einen positiven Effekt auf die Induktionskapazität von CYP1A, dies scheint von der jeweiligen Zellisolierung abzuhängen. Da die Induzierbarkeit jedoch auch ohne Serum gewährleistet ist, ist die Zugabe von Serum zum Induktionsnachweis nicht notwendig. Sie scheint auch keine stabilisierende Wirkung auf die Varianz der Induktionsantwort in Primärhepatocyten zu haben. Auf eine Zugabe von Serum in Primärhepatocyten kann deshalb verzichtet werden.

4.4.2.2 Matrigel

Die Substanzen Ant, Fluo, Phen und Pyr haben in RTL-W1-Zellen unabhängig von den Expositionsbedingungen (Exposition auf Matrigel oder nicht) nicht induziert. Matrigel kann die Expression von Cytochrom P450 in Hepatocyten der Ratte fördern (Kocarek et al. 1992). Bei der Inkubation von Primärhepatocyten wurde es zwar nur in 151facher Verdünnung verwendet, dennoch kann ein Einfluß auf die Physiologie der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Über die Inkubation von RTL-W1-Zellen auf Matrigel sollte herausgefunden werden, ob die in einigen Fällen auftretenden Induktion von CYP1A in Primärhepatocyten durch die Substanzen Ant, Fluo, Phen und Pyr eventuell auf den Einfluß von Matrigel zurückzuführen ist. Die Ergebnisse mit der Zellinie RTL-W1 haben jedoch gezeigt, daß ein möglicher Einfluß von Matrigel offen-

sichtlich nicht ausreicht, um über eine ja/nein-Antwort der Induktion durch diese Substanzen in der Regenbogenforelle zu entscheiden. Da in beiden in vitro-Systemen die Induktion über Bindung an den Ah-Rezeptor reguliert wird und in RTL-W1-Zellen keine Induktion auftrat, ist es unklar, wodurch die in einzelnen Fällen auftretende Induktion in Primärhepatocyten verursacht wurde. Für die Substanzen Ant, Fluo, Phen und Pyr liegen keine in vivo-Induktionsdaten vor, die die Beurteilung der in vitro-Daten erleichtern würde. Verunreinigungen der Stammlösungen sollten bei der Induktion durch diese Substanzen keine Rolle gespielt haben, da für RTL-W1-Zellen und Primärhepatocyten dieselben Lösungen verwendet wurden.

4.5 Vergleich mit anderen Zellinien und Eignung für freilandbezogene Induktionsanalysen

Ein in vitro-System ist dann für Induktionsanalysen von Freilandproben geeignet, wenn es reproduzierbar auf geringe Schadstoffkonzentrationen in einer Umweltprobe, z.B. in einem Extrakt aus Gewebe oder Sediment, reagiert. Zum Vergleich der Empfindlichkeit der beiden in vitro-Systeme RTL-W1 und Primärhepatocyten bezogen auf die Schadstoffkonzentration wurden die gewonnenen Ergebnisse mit Literaturdaten verglichen. Da in der Literatur fast nur Daten zur Induktion von PCB vorliegen, ist dieser Vergleich nur mit wenigen Zitaten möglich. Willett et al. (1997a) haben die Substanzen 2,3,7,8-TCDD, Benzo(k)fluoranthen und Benz(a)anthracen (BaA) auf ihre EROD-Induktionskapazität in der Zellinie H4IIE, einer Ratten-Hepatoma-Zellinie getestet. Dabei tritt die EROD-Induktion durch BaA in H4IIE bei vergleichbaren Konzentrationen auf wie in der Zellinie RTL-W1 oder Primärhepatocyten. Die absolute Induktion ist in der Zellinie H4IIE allerdings deutlich höher als in den beiden anderen in vitro-Systemen. Ein Vergleich mit der Fischzellinie PLHC-1 (Hahn et al. 1996), auch einer Hepatoma-Zellinie, oder der Zellinie RTG-2 (rainbow trout gonad, Zabel et al. 1996) ist nur über das PCB 126 möglich. PCB 126 wurde in der vorliegenden Arbeit in einer Mischung und auch als Einzelstoff in Primärhepatocyten getestet (siehe Kapitel 5). Auch bei diesem Vergleich induziert die Substanz die EROD-Aktivität in den Systemen Primärhepatocyten, RTG-2 und PLHC-1 bei ähnlichen Konzentrationen. Die Zellinie RTL-W1 oder die Primärhepatocyten scheinen damit zwar nicht empfindlicher zu sein als andere etablierte Zellinien, aber sie sind bezüglich der Schadstoffkonzentrationen mindestens genauso empfindlich wie diese und stammen im Gegensatz zu den Zellinien H4IIE oder PLCH-1 aus nicht transformierten Leberzellen. Damit scheint besonders die Zellinie RTL-W1, die reproduzierbar auf Schadstoffe reagiert hat, für Induktionsanalysen von Freilandproben geeignet zu sein.

4.6 Zusammenfassung

Abschließend läßt sich sagen, daß die beiden in vitro-Systeme RTL-W1 und Primärhepatocyten bezüglich der Induktoren Benz(a)anthracen, Benzo(a)pyren, Benzo(b)fluoranthen, Chrysen und 3-Methylcholanthren miteinander vergleichbar sind. Sie reagieren im gleichen Konzentrationsbereich und es läßt sich eine ähnliche Reihenfolge für die Induktoren aufstellen. Bei der Induktion durch die Substanzen Anthracen, Fluoranthen, Phenanthren und Pyren ist das nicht der Fall. In RTL-W1 haben diese Substanzen keine EROD-Induktion hervorgerufen, in Primärhepatocyten in einigen Fällen. Diese zeitweilig auftretenden Induktionen in Primärhepatocyten konnten nicht erklärt werden. Die RTL-W1-Zellinie ist hinsichtlich eines Induktionsnachweises

damit verläßlicher. Beim Vergleich der Zeitabhängigkeit der Induktion in den beiden in vitro-Systemen hat sich ergeben, daß es sich bei dem 24h Meßzeitpunkt um einen validen Meßzeitpunkt für beide Systeme handelt. Dabei scheinen die unterschiedlichen Kulturbedingungen der beiden in vitro-Systeme (5% in RTL-W1-Medium und 0% Serum in Primärhepatocyten-Medium) jeweils optimal zu sein. In Primärhepatocyten wurde auf den Einsatz von Serum verzichtet, um Einflüsse auf die Bioverfügbarkeit auszuschließen. In RTL-W1-Zellen kann auf Serum nicht verzichtet werden. Ob Matrigel einen Einfluß auf die Induktion von CYP1A in Primärhepatocyten hat, konnte nicht geklärt werden, da die Primärhepatocyten nicht ohne Matrigel kultiviert werden können. Auf die Induktion von CYP1A in RTL-W1-Zellen hat die Zugabe von Matrigel offensichtlich keinen Einfluß.

5 Mischungstoxizität

5.1 Einleitung

Im Freiland sind Organismen einem Gemisch von Schadstoffen ausgesetzt. Um eine Biomarkerantwort richtig interpretieren zu können, ist es deshalb wichtig, nicht nur den Effekt einzelner Substanzen auf den Marker zu kennen (siehe Kap. 4.2), sondern auch den Effekt ihrer Mischung. Wenn man wie in Kapitel 3 die EROD-Induktion in vivo kausal mit der chemischen Belastung des Wassers in Zusammenhang bringen will, setzt man eine additive Wirkung der effektiven Substanzen voraus. Ohne diese Annahme wäre ein Vergleich mit der Summe der Chemikalienbelastung im Wasser oder im Fisch nicht begründbar. Eine steigernde oder hemmende Wirkung einzelner Substanzen in der Mischung würde ein von der Erwartung abweichendes Ergebnis hervorrufen.

Eine konzentrationsadditive Wirkung von CYP1A-induzierenden Substanzen ist auch Voraussetzung für das TEQ-Konzept, das einen praktikablen Ansatz liefert, sich dem Problem der Mischexposition im Freiland anzunähern. Bei diesem Konzept wird die EROD-Aktivität, die auf der Induktion einer beliebigen Substanz oder eines Gemisches beruht, in Relation zur Induktion durch 2,3,7,8-TCDD gesetzt (siehe Kap. 1). Der TEQ-Ansatz kommt häufig in Freilandstudien zum Einsatz (Bols et al. 1997, Clemons et al. 1997, Giesy et al. 1997, Whyte et al. 1998), obwohl bisher nur für PCB, PCDD und PCDF Untersuchungen zur additiven Wirkweise vorliegen (Janz und Metcalfe, 1991, Walker et al. 1996, Zabel et al. 1995, Zabel et al. 1996). Die EROD-Aktivität wird jedoch nicht nur durch PCB, sondern auch durch PAH induziert. Um das TEQ-Konzept einsetzen zu können, ist es daher wichtig zu wissen, daß nicht nur PCB, sondern auch PAH konzentrationsadditiv wirken. Swartz et al. (1995) haben ein Modell entwickelt, das die additive Wirkweise von PAH beschreibt. Empirische Daten beruhen dabei auf Experimenten mit nur drei PAH. Alle anderen Daten wurden modelliert, und das gefundene Ergebnis entspricht zu 86.6% der Erwartung. Um empirisch herauszufinden, ob PAH additiv wirken, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Mischung aus vier Substanzen untersucht.

In Umweltproben kommen PAH und PCB meist gemeinsam vor. Bei der Anwendung des TEQ-Konzeptes ist daher die Wirkung einer Mischung mit Vertretern aus beiden Substanzgruppen ein weiterer wichtiger Aspekt. Da sowohl PAH als auch PCB die EROD-Aktivität über den gleichen Mechanismus (Ah-Rezeptor) induzieren (Lorenzen et al. 1990, Pollenz und Necela 1998, Wang et al. 1998), kann angenommen werden, daß beide Substanzgruppen auch in einer gemeinsamen Mischung additiv wirken. Die beiden Gruppen unterscheiden sich jedoch dadurch, daß PAH im Organismus relativ schnell abgebaut werden können, während PCB meist stabil sind. Dadurch kann die induzierende Wirkung durch PAH im Gegensatz zu der durch PCB mit der Zeit nachlassen. Es stellt sich die Frage, ob der Metabolismus von PAH die angenommene additive Wirkung in einer Mischung mit Vertretern beider Substanzgruppen beeinträchtigt. In diesem Kapitel wird daher eine binäre Mischung aus einem PAH und einem PCB zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf ihre additive Wirkweise untersucht.

5.1.1 Theorie der Kombinationswirkung

Zur Analyse von Kombinationswirkungen können drei verschiedene Konzepte eingesetzt werden (nach Altenburger et al. 1993):

1. Das Konzept der Effekt-Summation (Plackett und Hewlett 1948). Es besagt, daß der Effekt einer Mischung aus der Summe der Effekte der einzelnen Substanzen besteht. Rufen also die Konzentrationen c_1 und c_2 die Effekte $E(c_1)$ und $E(c_2)$ hervor, so gilt $E(c_1+c_2)=E(c_1)+E(c_2)$. Diesem Konzept scheinen jedoch keine pharmakologischen Voraussetzungen zugrunde zu liegen (Altenburger et al. 1993). Es kann auch nur dann gelten, wenn die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Effekts linear verläuft (Berenbaum 1989). Dies ist in der Toxikologie selten der Fall.

2. Das Konzept der Effekt-Multiplikation (Bliss 1939). Es beruht auf der Annahme, daß die Substanzen in einer Mischung auf verschiedene biologische Systeme in einem Organismus wirken („different sites and modes of action") (Berenbaum 1985). Der Effekt einer Mischung ist hierbei das Produkt der Effekte der einzelnen Substanzen, also $E(c_1+c_2)= E(c_1)*E(c_2)$. Dabei müssen die Effekte der einzelnen Substanzen durch exponentielle Konzentrations-Wirkungs-Kurven beschrieben werden (Berenbaum 1985).

3. Das Konzept der Konzentrations-Additivität (Loewe und Muischnek 1926). Es geht davon aus, daß eine Substanz wie die Verdünnung einer anderen Substanz wirkt. Das bedeutet, daß ein Effekt auch dann beobachtet werden kann, wenn eine Substanz vollständig oder teilweise durch die äqui-effektive Menge der anderen Substanz ersetzt wird. Dieses Konzept setzt voraus, daß die untersuchten Substanzen den gleichen Wirkort und eine ähnliche Wirkung im Organismus haben. Das Konzept der Konzentrationsadditivität ist im Gegensatz zu den Konzepten der Effektsummation und Effektmultiplikation unabhängig von der Form der Konzentrations-Wirkungskurve.

Für die EROD-Aktivität in Fischen ist bekannt, daß sie durch Bindung an den Ah-Rezeptor induziert wird. Damit wird bei Betrachtung des Effekts der EROD-Induktion die Voraussetzung für die Anwendung des Konzepts der Konzentrations-Additivität erfüllt.

5.1.2 Experimentelle Anwendung

Bei der experimentellen Anwendung des theoretischen Konzepts der Konzentrations-Additivtät gibt es verschiedene Methoden. Häufig verwendet werden die Methode des Isobologramms und die der Toxic unit summation. Die graphische Methode des Isobologramms geht auf Loewe und Muischnek zurück (1926) und wurde mehrfach validiert (Altenburger et al. 1990, Gennings et al. 1992). Die Methode der Toxic unit summation bildet das algebraische Äquivalent und ist im Gegensatz zur Methode des Isobologramms auch bei Mischungen aus mehreren Komponenten anwendbar. Beide Methoden beruhen auf der Einteilung in „Toxische Einheiten" (Toxic units).

5.1.2.1 Isobologramm

Bei der Methode des Isobologramms werden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für zwei Substanzen in einem dreidimensionalen Koordinatensystem dargestellt, wobei die x-Achse die Konzentrationen der Substanz S_1, die y-Achse die Konzentrationen der Substanz S_2, und die z-Achse den Effekt abbildet. Die Konzentrationen müssen linear aufgetragen werden. Dieses Koordinatensystem wird auf zwei Dimensionen reduziert, indem man sich auf die Darstellung der x- und y-Achse beschränkt. Dabei betrachtet man statt der gesamten Konzentrations-Wirkungs-Kurven nur noch einen festgesetzten Effekt (z.B. den EC50), und trägt die dazugehörigen Effektkonzentrationen für jede Substanz auf der entsprechenden Koordinate auf. Die Verbindung dieser beiden äqui-effektiven Konzentrationen ist die Isobole gleichen Effekts (Abb. 5.1).

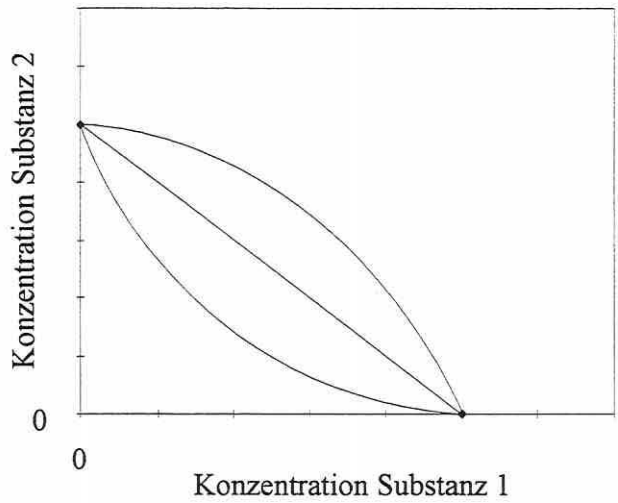

Abb.5.1. Isobologramm für eine Mischung aus S1 und S2. Auf den Koordinaten x und y werden die äqui-effektiven Konzentrationen x_1 und x_2 bei $E(x_1) = E(x_2)$ aufgetragen. Die geradlinige Verbindung der beiden Konzentrationen ist die Isobole gleichen Effekts (Additivitätslinie). Bei Synergismus verläuft die Isobole elliptisch unterhalb der Additivitätslinie, bei Antagonismus oberhalb.

Die Isobole sagt alle Kombinationen von S_1 und S_2 voraus, die denselben Effekt hervorrufen, wenn S_1 und S_2 additiv wirken. Sie wird deshalb auch Additivitätslinie genannt. Rufen Kombinationen von S_1 und S_2 Effekte hervor, die unterhalb der Isobolen für Additivität liegen, ist die Wirkung synergistisch. Liegen die Effekte oberhalb der Additivitätslinie, ist die Wirkung antagonistisch. Die Isobolen für Synergismus und Antagonismus verlaufen elliptisch (Abb. 5.1).

Problematisch ist die Einschätzung, ob ein Effekt systematisch oder zufällig von der Isobolen abweicht. Für diese Entscheidung liefert die Methode des Isobologramms von Loewe und Muischnek kein Instrument.

5.1.2.2 Toxic units

Die Konzentrationen x, die den festgesetzten Effekt E(x) bewirken, lassen sich auch in sogenannten „Toxic units" (Toxischen Einheiten) ausdrücken. Dabei entsprechen die Konzentrationen x_1 bei $E(x_1)$ und x_2 bei $E(x_2)$ jeweils einer toxischen Einheit, die für sich genommen den festgesetzten Effekt hervorrufen. Für alle Kombinationen aus S_1 und S_2 im Mischungsexperiment gilt:

$$E(\lambda \cdot x_1 + (1-\lambda) \cdot x_2) = E(x_1) = E(x_2) \qquad 5.1$$

für $0 \leq \lambda \leq 1$

Bei einer Einteilung in Toxische Einheiten können Mischungen auch aus mehreren Substanzen zusammengesetzt werden. Es gilt:

$$E(\lambda_1 \cdot x_1 + \ldots + \lambda_n \cdot x_n) = E(x_1) = \ldots = E(x_n) \qquad 5.2$$

wobei $\sum_{i=1}^{n} \lambda_i = 1$, und $0 \leq \lambda_i \leq 1$ für alle i = 1,...,n

Aus dieser Funktion leitet sich die Vorhersage für alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kombinationsexperimente ab. Die im folgenden beschriebene Vorgehensweise bei der Durchführung eines Kombinationsexperimentes gilt sowohl für Mischungen aus zwei als auch für Mischungen aus mehreren Substanzen. Die Mischungen aus zwei Substanzen wurden sowohl mit der Methode des Isobologramms als auch mit der Methode der Toxic unit summation ausgewertet (siehe auch Kap. 5.1.2.4). Mischungen aus mehr als zwei Substanzen können nur über die Methode der Toxic unit summation ausgewertet werden.

5.1.2.3 Ansatz eines Mischungsexperiments (Beispiel)

1. Die Konzentrationen x_1 bis x_n, die allein den festgesetzten Effekt hervorrufen, werden für jede Substanz aus vollständigen Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Funktion 5.3) ermittelt. Die Funktion 5.3 ist die Umkehrfunktion der Funktion 4.1, mit der alle in dieser Arbeit ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven geschätzt wurden.

$$x_i = EC50 * \left(\frac{\max - \min}{y - \min} - 1 \right)^{\frac{1}{b}} \qquad 5.3$$

Dabei sind die x_i die Konzentrationen bei dem Effekt y (z.B. doppelte EROD-Aktivität der DMSO-Kontrolle in [pmol/mg/min]) für die Substanzen S_1 bis S_n, max = Maximum [pmol/mg/min], min = Minimum [pmol/mg/min], b = Steigungsparameter und EC50 = Konzentration beim halben maximalen Effekt in nM.

Aus der Funktion 5.3 ergibt sich z.B. für den Effekt y der doppelten EROD-DMSO-Aktivität für BaP eine Konzentration von x_1 = 10nM und für PCB126 eine Konzentration von x_2 = 20nM.

2. Wenn nur diese beiden Substanzen in die Mischung eingesetzt werden sollen, wird der Anteil jeder Substanz in der Mischung wie folgt ermittelt: BaP: 0,5*10nM = 5nM und PCB126: 0,5*20nM = 10nM (Funktion 5.1).

3. Aus den Substanzen BaP und PCB126 wird eine Stammlösung im Verhältnis 5nM (BaP) zu 10nM (PCB126) angesetzt und mit dieser Stammlösung eine vollständige Konzentrations-Wirkungs-Kurve erhoben (Mischungsexperiment). Parallel zum Mischungsexperiment werden vollständige Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die einzelnen in die Mischung eingesetzten Substanzen (also jeweils für BaP und PCB126) erhoben. Das ist die Kontrolle im Mischungsexperiment (siehe auch Toxic unit summation, Kap. 5.1.2.4).

4. Aus der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Mischung wird wiederum eine Konzentration zu dem festgesetzten Effekt y ermittelt, sie setzt sich aus Anteilen von BaP und PCB126 zusammen. Dies sind die Konzentration c_1 für BaP und c_2 für PCB126. Theoretisch müßte bei Konzentrationsadditivität gelten: $c_1 = x_1/2$. Daraus würde ein TUS von 1 resultieren. Die Abweichung von TUS = 1 wird mit der Toxic unit summation beurteilt.

5.1.2.4 Toxic unit summation

Auf der Einteilung in toxische Einheiten beruht die „Toxic unit summation (TUS)", die der Ergebnisbeurteilung von Mehrkomponentenmischungen dient. Es gilt:

$$TUS = \sum_{i=1}^{n} \frac{c_i}{x_i} \qquad 5.4$$

dabei bezeichnet c_i die Konzentration der Gemischkomponente S_i (i = 1, ..., n) innerhalb der Gesamtkonzentration $\sum c_i$, welche in der Gemischtestung einen bestimmten Effekt y hervorruft, und x_1 bis x_n die Konzentrationen der Substanzen S_1 bis S_n, die denselben Effekt in der Einzeltestung verursachen. Folgerungen hieraus sind:

1. Vorhersage ≈ Beobachtung, dann TUS ≈ 1 oder Übereinstimmung mit Konzentrationsadditivität

2. Vorhersage > Beobachtung, dann 0 < TUS < 1 oder Unterschätzung der Toxizität

3. Vorhersage < Beobachtung, dann TUS > 1 oder Überschätzung der Toxizität

Wie auch beim Einsatz des Isobologramms stellt sich hier das Problem, wie eine Abweichung von der Additivität, hier eine Abweichung von 1, zu beurteilen ist.

Im Gegensatz zur Methode des Isobologramms bietet die Methode der Toxic unit summation die Möglichkeit, das Ergebnis eines Mischungsexperiments sowohl auf die Vorhersage als auch auf eine im Mischungsexperiment parallel gemessene Kontrolle zu beziehen. Die Vorhersage für das Mischungsexperiment wurde aus Konzentrations-Wirkungskurven der Einzelsub-

stanzen abgeleitet. Zur Kontrolle werden im Mischungsexperiment noch einmal Konzentrations-Wirkungs-Kurven derselben Einzelsubstanzen erhoben. Die geschätzten Funktionsparameter aus diesen Kontrollen können von denen aus der Vorhersage abweichen. Um den Bezug entweder zur Vorhersage oder zur Kontrolle herzustellen, wird x_i in der Funktion 5.4 entweder aus der Vorhersage oder der Kontrolle hergeleitet.

5.1.3 Testsystem

Als Testsystem für die Kombinationswirkungsexperimente diente die EROD-Induktion in der Zellkultur, und zwar in den in vitro-Systemen RTL-W1 und Primärhepatocyten. Wie in Kapitel 4 beschrieben, sind diese beiden in vitro-Systeme für Untersuchungen zu Fragestellungen dieser Art geeignet.

5.1.3.1 Additivität von PAH

Für den Nachweis der Additivität von verschiedenen PAH wurden die Substanzen Benzo(a)pyren, Benzo(b)fluoranthen, Chrysen und 3-Methylcholanthren als eindeutige Induktoren (siehe Kap. 4.2) ausgewählt. Als Zellkultursystem diente die Zellinie RTL-W1. Als festgesetzter Effekt wurde die zehnfache EROD-Aktivität gegenüber der Kontrolle nach 24h Inkubation ausgewählt und über vollständige Konzentrations-Wirkungskurven für jede Substanz ermittelt. Es wurde ein festgelegter Effekt betrachtet, um zu gewährleisten, daß sowohl in der Vorhersage als auch im Mischungsexperiment der gleiche Effekt betrachtet wird. Aus diesem Grund wurde nicht der EC50 als Effekt ausgewählt. Bei dem EC50 handelt es sich aufgrund von Schwankungen in Minima und Maxima der EROD-Induktion von Versuch zu Versuch nicht um einen gleichbleibenden Effekt. Die Auswahl des Effekts orientierte sich an der Lage der Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Der Effekt sollte im Bereich der größten Steigung des Plots liegen. Liegt ein betrachteter Effekt im Bereich des Minimums oder Maximums der Kurve, kann die dazugehörige Konzentration eventuell nicht eindeutig bestimmt werden oder ist mit einem großen Fehler behaftet.

Zur Ermittlung der zum Effekt y gehörenden Konzentration x_i wurde aus der Funktion 4.1 die Umkehrfunktion bezüglich x_i gebildet (Funktion 5.3). Die vier Substanzen wurden in äquieffektiven Konzentrationen im Mischungsexperiment eingesetzt. Bei konzentrationsadditiver Wirkung der Substanzen gilt:

$$E(10*C)_{mix} = E\left(\frac{x_1}{4} + \frac{x_2}{4} + \frac{x_3}{4} + \frac{x_4}{4}\right) \qquad 5.5$$

mit x_i = Konzentrationen bei 10*C von Substanz S_1 bis S_4 in nM,
C = Lösungsmittelkontrolle der EROD-Aktivität [pmol/mg/min] und E_{mix} = Effekt in der Mischung [pmol/mg/min].

Zur Kontrolle wurden parallel zu jedem Mischungsexperiment die Konzentrations-Wirkungskurven für die einzelnen Substanzen aufgenommen. Das Ergebnis des Mischungsexperiments kann damit sowohl auf die Vorhersage als auch auf die Kontrolle bezogen werden. Das Experiment wurde dreimal wiederholt, wobei die Kontrolle eines Experiments als Vorhersage für das darauffolgende diente.

Da die Ergebnisse aus einem vier-Komponenten-Gemisch nicht graphisch über das Isobologramm dargestellt werden können, bildet die Toxic unit summation die Grundlage für die Bewertung der Ergebnisse.

5.1.3.2 Additivität von PAH und PCB

Bei der Auswahl eines binären Gemisches aus einem PAH und einem PCB spielten folgende Überlegungen eine Rolle: Es sollte nicht nur untersucht werden, ob die beiden Substanzen additiv wirken, sondern auch, wie sich die Mischung über die Zeit verhält. Bei einer Kinetik kann von Bedeutung sein, daß eine Substanz schnell (z.B. ein PAH), eine andere jedoch langsam metabolisiert wird (z.B. ein PCB). Erwartet wurde, daß mit der metabolisch bedingten intrazellulären Abnahme eines Stoffes die Mischung über die Zeit weniger als additiv wirkt. Betrachtet wurde wieder der Zeitpunkt 24h, zu dem die Mischung konzentrationsadditiv wirken sollte. Nimmt man an, daß nach 24h Inkubation die maximale EROD-Induktion erreicht wird, wird eine Rechtsverschiebung der Kurve über diesen Zeitpunkt hinaus erwartet, wenn das Medium nach 24h nicht gewechselt wird. Für die Mischung bedeutet das formal, daß die Toxizität im Mischungsexperiment mit zunehmender Inkubationszeit (48h) in Bezug auf die Voraussetzung für 24h unter Anwendung der „Toxic unit summation" überschätzt wird.

Die Stoffauswahl fiel auf Benzo(a)pyren als in wenigen Stunden durch Fischhepatocyten metabolisierbare Substanz (Ferraris et al. 1996) und 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126) als schlecht metabolisierbare Substanz (Sean W. Kennedy, persönliche Mitteilung). Beide Stoffe sind gute Induktoren der EROD-Aktivität (Hahn et al. 1996, Pacheco und Santos 1997, Tysklind et al. 1995, Wolkers et al. 1996). Als Zellsystem wurden die Primärhepatocyten ausgewählt, um eine vollständige metabolische Kapazität der Zellen unter Einbezug der Phase II zu gewährleisten.

Zur Bestimmung des festgesetzten Effekts gelten dieselben Kriterien wie in Kapitel 5.1.3.1. Es wurden vollständige Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelt. Betrachtet wurde die doppelte Aktivität der EROD-Lösungsmittelkontrolle, in der Funktion 5.3 wurde y daher durch 2*C (C = EROD-Lösungsmittelkontrolle) ersetzt. Damit liegen die betrachteten Effekte auch für Primärhepatocyten im Bereich der größten Steigung der Kurven. Für die Mischungsexperimente wurden äqui-effektive Konzentrationen eingesetzt, es gilt also:

$$E(2*C)_{mix} = E\left(\frac{x_1}{2} + \frac{x_2}{2}\right) \qquad 5.6$$

mit x_i = Konzentrationen der Substanzen S1 und S2 [nM] beim Effekt $E(2*C_i)$ und
C = EROD-Lösungsmittelkontrolle [pmol/mg/min].

Die Mischung wurde nach 24h und nach 48h in zwei unabhängigen Experimenten gemessen, wobei parallel zum Mischungsexperiment Konzentrations-Wirkungskurven für die einzelnen Substanzen erhoben wurden. In einem weiteren Experiment wurde die Kinetik über 48h in Primärhepatocyten in Zellen aus einer Isolierung bestimmt. Die Vorhersage für die Ergebnisse in der Mischung bezog sich jeweils auf 24h, um eine Abweichung von dieser Vorhersage nach 48h bestimmen zu können. Die Resultate wurden mit der Methode des Isobologramms graphisch ausgewertet. Um zusätzlich den Bezug auf die zeitgleiche Kontrolle zu ermöglichen, wurde außerdem das Verfahren der Toxic unit summation angewendet.

5.1.4 Interpretation

Bei der Beurteilung der Abweichung der Ergebnisse in den Mischungsexperimenten von der Erwartung für Additivität stellt sich in Bezug auf den jeweiligen Mischungsansatz die Frage:

1. Wie ist die Abweichung der TUS von 1 im Mischungsexperiment aus mehreren Substanzen zu beurteilen?

2. Bedeutet die Abweichung des Ergebnisses für binäre Mischungen von der Vorhersage, dargestellt im Isobologramm, daß die Substanzen synergistisch oder antagonistisch wirken?

Um beide Fragen beantworten zu können, muß der Standardfehler des im Mischungsexperiment gefundenen Ergebnisses für den Wert x^* ermittelt werden. Der Wert x^* bezeichnet eine Konzentration zu dem festgelegten Effekt $y^* = f(10*C)$ oder $y^* = f(2*C)$ im Mischungsexperiment, die sich aus relativen Anteilen der Konzentrationen c_1 bis c_n der in die Mischung eingesetzten Substanzen S_1 bis S_n ergibt. Die Konzentrationen c_1 bis c_n wurden als äqui-effektive Konzentrationen in der Vorhersage für die Mischung ermittelt (also $c_i = x_i / n$). Der Wert x^* wird über die Funktion 5.3 geschätzt. Zur Verdeutlichung wird die Funktion 5.3 hier noch einmal als Funktion x aufgeführt:

$$x(\min, \max, b, EC50, y) = EC50\left(\frac{\max - \min}{y - \min} - 1\right)^{\frac{1}{b}} \qquad 5.3 \text{ (oder x)}$$

wobei min, max, b und EC50 = geschätzte Parameter der Funktion und y = f(min, max, EC50, b, x) sind.

Werden in die Funktion x die geschätzten Werte für die Parameter min, max, b, EC50 und y^* = festgelegte EROD-Aktivität eingesetzt, so erhält man einen festen Wert x^*. Unter der Annahme, daß die Parameter min, max, b, EC50 und y Standardfehler aufweisen, kann auch ein Standardfehler für x^* ermittelt werden. Der Standardfehler von x^* wird aus den Standardfehlern aller Funktionsparameter der Funktion 5.3 sowie den partiellen Ableitungen von x nach den Funktionsparametern geschätzt.

Für den Standardfehler von x^* gilt:

$$\text{Stderr}(x^*) = \sqrt{\sum_{i=1}^{5} \frac{\partial x(\min, \max, b, EC50, y^*)}{\partial p_i} \hat{\sigma}_i} \qquad 5.7$$

x* bezeichnet den Wert für eine zusammengesetzte Konzentration, die sich aus den gegebenen Schätzungen der Parameter min, max, EC50 und b und dem vorgegebenen EROD-Wert y* ergibt. p_i bezeichnet die Parameter max, min, EC50, b und y, und $\hat{\sigma}_i$ bezeichnet die jeweilige Schätzung der dazugehörigen Standardabweichung. Die Ableitungen werden an der Stelle gebildet, an der x den Wert x* annimmt, bzw. an der y = f(min, max, b, EC50, x) gerade gleich y* ist.

Die Gleichungen für die partiellen Ableitungen von x nach allen Funktionsparametern (max, min, EC50, b und f) sind im Anhang (Kap. A.4) dargestellt. Bei der Berechnung der

Ableitungen wurden für die Funktionsparameter max, min, EC50 und b jeweils die von Sigma Plot geschätzten Werte eingesetzt, für den Funktionsparameter f wurde der festgelegte Effekt y eingesetzt. Damit bezieht sich auch der Standardfehler von x* direkt auf den festgesetzten Effekt y.

Die Standardfehler von max, min, EC50 und b wurden in Sigma Plot berechnet. Der Standardfehler von f(min, max, EC50, b,x) wurde geschätzt auf Basis der Standardabweichung der tatsächlich gemessenen EROD-Aktivitäten vom jeweiligen Wert der Funktion f(min, max, EC50, b,x) gemäß

$$\text{Stdabw}(f(x)) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(y_i^m - y_i^p\right)^2}{n-1}} \qquad 5.8$$

wobei i = 1,..,n die n Messwerte bezeichnet und y_i^m für die gemessene EROD-Aktivität steht, während y_i^p den entsprechenden Wert der Funktion f(min, max, EC50,b,x) angibt.

Bei Unterstellung von Normalverteilung für den Schätzfehler von x beinhaltet das Intervall von x^* minus zweimal den Standardfehler bis x^* plus zweimal den Standardfehler mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% den wahren Wert x. Dieses Intervall wird als 95%-Konfidenzintervall bezeichnet.

Beurteilung der Abweichung der Ergebnisse von der Erwartung für Additivität

Zu Frage 1:

Aus der Gleichung für die Toxic unit summation (Funktion 5.4) konnte der Standardfehler für die TUS-Werte nicht direkt bestimmt werden. Problematisch bei der Berechnung ist hier, daß die Konzentrationen c_i (Funktion 5.4) als perfekt korreliert angenommen werden müssen, die Werte für x_i (Funktion 5.4) jedoch unabhängig voneinander sind. Um dennoch ein Maß für die Abweichung der TUS-Werte von 1 zu erhalten, wurden Mittelwert und Standardfehler der TUS-Werte mit einer Monte Carlo Simulation geschätzt (TUS_{MC}-Werte).

Vorgehen bei der Simulation:

1. Ziehung von c_i:
   Die Ziehung von Werten für c_1 erfolgte aus der Normalverteilung, die durch Mittelwert und Standardabweichung von c_1 vollständig charakterisiert ist. Die Werte für c_2 bis c_n (soweit n>2) wurden durch Multiplikation mit einem Faktor ermittelt. Der Faktor berechnet sich aus dem Verhältnis von c_1 zu c_2 (usw. bis c_1 zu c_n), das sich aus der Vorhersage für die Mischung ergibt. Die Substanzen wurden ja in einem festen Verhältnis zueinander in die Mischung eingesetzt. Daraus ergibt sich eine vollständige Korrelation der c_i.

2. Ziehung der x_i:
   Die Werte von x_i (i = 1, ..., n) wurden in n unabhängigen Ziehungen aus der Normalverteilung mit den entsprechenden Mittelwerten und Standardabweichungen ermittelt.

3. Aus den Ziehungen für c_i und x_i ergibt sich ein TUS_{MC}-Wert (Funktion 5.4)

4. Die Ziehungen mit der Berechnung des TUS_{MC}-Wertes (Schritt 1 bis 3) erfolgten pro Versuch 100000 mal.

5. Aus den 100000 TUS_{MC}-Werten zu einem Versuch wurde unter Annahme von Normalverteilung das 95%-Konfidenzintervall um ihren Mittelwert errechnet. Wenn dieses Intervall die Zahl 1 einschließt, läßt sich ein wahrer Wert von TUS = 1 nicht widerlegen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kriterium eingeführt, um die Ergebnisse zu bewerten. Wenn das 95%-Intervall den Wert von 1 einschließt und der Standardfehler maximal 15% des Mittelwertes beträgt, wurde Konzentrationsadditivität angenommen.

Zu Frage 2:

Zur Beantwortung der Frage, wann das Ergebnis im binären Gemisch von der Vorhersage der Additivität abweicht, wurde die im Mischungsexperiment gefundene Konzentration für den betrachteten Effekt mit dem 95%-Intervall in das Isobologramm eingetragen. Der Eintrag erfolgt im Isobologramm auf dem sogenannten Mischungsstrahl. Dieser Mischungsstrahl beschreibt alle möglichen Lagen des Ergebnisses im Isobologramm beim eingesetzten Mischungsverhältnis der beiden Substanzen. Das Mischungsverhältnis wird dabei in toxischen Einheiten ausgedrückt. Im vorliegenden Fall erfolgt der Eintrag also auf dem Mischungsstrahl „0,5+0,5". An dem Punkt, an dem sich die Linie für Additivität und der Mischungsstrahl überschneiden, liegt theoretisch Additivität vor. Trägt man das Ergebnis mit dem 95%-Konfidenzintervall auf diesem Strahl ein, läßt sich bei Überlappung des Intervalls mit der Additivitätslinie die Hypothese, daß Additivität nicht gilt, nicht zurückweisen. Wenn das 95%-Konfidenzintervall und die Additivitätslinie nicht überlappen, kann man mit 95%iger Sicherheit sagen, daß Additivität nicht gilt. Um die Ergebnisse beurteilen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit eigene Bewertungskriterien aufgestellt. Bei einer Überlappung des Konfidenzintervalls mit der Additivitätslinie wurde Konzentrationsadditivität angenommen, wenn der Standardfehler von x^* weniger als 15% von x^* betrug.

5.2 Additivität von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen

5.2.1 Ergebnisse

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Einzelsubstanzen als auch der Mischungsexperimente lassen sich wie in Kapitel 4 durch die Funktion 4.1 beschreiben. In allen Konzentrations-Wirkungs-Kurven war die EROD-Aktivität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant erhöht (One way ANOVA, $p < 0,05$). Auf eine graphische Darstellung wurde in diesem Kapitel verzichtet. Die Ergebnisse für drei Mischungsexperimente mit den Substanzen 3-Methylcholanthren, Chrysen, Benzo(b)fluoren und Benzo(a)pyren in RTL-W1-Zellen werden in Tabelle 5.1 bis 5.3 gezeigt. Dargestellt sind die Parameter max, min, EC50 und b der Kurvenfunktion 4.1, ihre Standardfehler, die EROD-DMSO-Kontrolle, die berechneten Konzentrationen bei der zehnfachen Aktivität gegenüber den DMSO-Kontrollen, als auch die daraus resultierenden Konzentrationen für jede Substanz im Mischungsexperiment. Die Ergebnisse für den EC50 sowie die Konzentration bei der zehnfachen Kontrolle werden der Übersichtlichkeit halber nur als Konzentration von Benzo(a)pyren angegeben. Die dazugehörigen Konzentratio-

nen für 3-Methylcholanthren, Chrysen und Benzo(b)fluoren ergeben sich aus dem eingesetzten Verhältnis in der Mischung, das in der Spalte „Vorhersage für die Mischung, Konz. x/4 [nM]" angegeben wird.

Tab. 5.1. Die Tabelle zeigt alle relevanten Parameter für die erste Mischung aus vier PAH in RTL-W1-Zellen. Gezeigt werden die geschätzten Funktionsparameter min, max, EC50, b und f, die zur Berechnung der Konzentration x bei dem festgesetzten Effekt 10*C dienten. C = EROD-DMSO-Kontrolle. Standardabweichungen in Klammern. In Bezug auf die Vorhersage bezeichnet die Konzentration x/4 (= c_i) die Konzentration für die jeweilige Substanz, die in die Mischung eingesetzt wurde. In Bezug auf die Kontrolle bezeichnet x/4 (= c_i) die Konzentration, die in die Mischung hätte eingesetzt werden müssen. Die Berechnung der TUS-Werte bezieht sich daher einmal auf die x/4 (oder c_i) aus der Vorhersage und einmal auf die x/4 (oder c_i) aus der Kontrolle.

Mischung 1	Substanz	max[1]	min[1]	EC50 [nM]	b	C[1]	Konz. x bei 10*C [nM]	Stderr[1] von f	x/4 [nM]
Vorhersage für Mischung 1	3-MC	42,10 (3,48)	3,13 (2,09)	103,85 (20,5)	-2,06 (0,74)	1,78	81,28 (23,7)	3,19	20,32
	Chrysen	44,95 (2,15)	1,76 (1,08)	465,22 (64,7)	-1,39 (2,35)	2,12	402,8 (83,4)	1,93	100,7
	BbF	33,6 (2,88)	3,42 (2,57)	75,1 (22,6)	-1,56 (0,68)	2,35	116,66 (6,3)	3,28	29,16
	BaP	37,84 (3,22)	3,38 (3,10)	46,94 (13,1)	-1,58 (0,68)	2,67	74,92 (36,5)	3,35	18,73
Ergebnis für Mischung 1	Mischung 1	49,67 (5,09)	1,57 (0,96)	16,65 (3,26) BaP+...	-1,34 (0,23)	1,08	5,69 (1,86) BaP+...	1,34	
Kontrolle für Mischung 1	3-MC	36,5 (4,60)	0,77 (3,94)	49,74 (20,3)	-0,93 (0,36)	1,76	43,9 (26,5)	2,05	10,97
	Chrysen	42,32 (2,36)	1,11 (0,88)	588,34 (9,29)	-1,11 (0,16)	1,48	313,64 (78,5)	1,43	78,41
	BbF	35,78 (2,28)	2,83 (2,34)	42,80 (9,35)	-1,18 (0,32)	1,44	25,43 (9,65)	1,74	6,35
	BaP	35,70 (3,89)	0,18 (1,79)	35,44 (11,3)	-0,84 (0,21)	1,55	25,49 (11,7)	1,25	6,37

[1] = Angaben in [pmol/mg/min]

Aus den in Tabelle 5.1 bis 5.3 dargestellten Daten wurden die Werte für TUS berechnet. Dies zeigen Gleichungen 5.9 und 5.9* beispielhaft für Mischung 1 in Bezug auf die Kontrolle (Funktion 5.9) und in Bezug auf die Vorhersage (Funktion 5.9*). Die Variablen c_i aus der Funktion 5.4 bezeichnen die Konzentrationen der vier Substanzen in der Mischung, bei denen in der Summe der betrachtete Effekt aufgetreten ist. Die Variablen x_i bezeichnen die Konzentrationen, bei denen derselbe Effekt für die einzelne Substanz gemessen wurde. Diese Konzentrationen beziehen sich einmal auf die Vorhersage für das Mischungsexperiment und einmal auf die Kontrolle im Mischungsexperiment.

$$TUS = \sum_{i=1}^{n} \frac{c_i}{x_i} = \frac{c_1}{x_1} + \frac{c_2}{x_2} + \frac{c_3}{x_3} + \frac{c_4}{x_4} \qquad 5.4$$

In Bezug auf die Kontrolle:

$$TUS = \sum_{i=1}^{n} \frac{c_i}{x_i} = \frac{6{,}17\text{nM}}{43{,}90\text{nM}} + \frac{30{,}59\text{nM}}{313{,}64\text{nM}} + \frac{8{,}85\text{nM}}{25{,}43\text{nM}} + \frac{5{,}69\text{nM}}{25{,}49\text{nM}} = 0{,}81 \qquad 5.9$$

In Bezug auf die Vorhersage:

$$TUS = \sum_{i=1}^{n} \frac{c_i}{x_i} = \frac{6{,}17\text{nM}}{81{,}28\text{nM}} + \frac{30{,}59\text{nM}}{402{,}8\text{nM}} + \frac{8{,}85\text{nM}}{116{,}66\text{nM}} + \frac{5{,}69\text{nM}}{74{,}82\text{nM}} = 0{,}30 \qquad 5.9^{*}$$

Tab. 5.2. Die Tabelle zeigt alle relevanten Parameter für die zweite Mischung (neuer Mischungsansatz) aus vier PAH in RTL-W1-Zellen. Gezeigt werden die geschätzten Funktionsparameter min, max, EC50, b und f, die zur Berechnung der Konzentration x bei dem festgesetzten Effekt 10*C dienten. C = EROD-DMSO-Kontrolle. Standardabweichungen in Klammern. In Bezug auf die Vorhersage bezeichnet die Konzentration x/4 (= c_i) die Konzentration für die jeweilige Substanz, die in die Mischung eingesetzt wurde. In Bezug auf die Kontrolle bezeichnet x/4 (= c_i) die Konzentration, die in die Mischung hätte eingesetzt werden müssen. Die Berechnung der TUS-Werte bezieht sich daher einmal auf die x/4 (oder c_i) aus der Vorhersage und einmal auf die x/4 (oder c_i) aus der Kontrolle.

Mischung 2	Substanz	max[1]	min[1]	EC50 [nM]	b	C[1]	Konz. x bei 10*C [nM]	Stderr[1] von f	x/4 [nM]
Vorhersage für Mischung 2	3-MC	32,99 (2,52)	3,44 (1,24)	72,69 (12,5)	-1,74 (0,46)	1,74	68,21 (16,1)	1,53	17,05
	Chrysen	31,16 (1,52)	2,05 (1,09)	112,48 (16,1)	-1,73 (0,38)	1,74	119,81 (24,8)	1,61	29,95
	BbF	31,37 (1,05)	6,43 (1,29)	31,50 (4,27)	-1,98 (0,48)	1,74	27,87 (5,41)	1,41	6,96
	BaP	37,15 (2,02)	8,13 (1,39)	48,4 (7,89)	-1,58 (0,39)	1,74	29,98 (8,15)	1,41	7,49
Ergebnis für Mischung 2	Mischung 2	44,90 (4,47)	0,84 (1,30)	18,36 (3,77) BaP+...	-1,08 (0,19)	1,28	7,35 (2,47) BaP+...	1,25	
Kontrolle für Mischung 2	3-MC	36,5 (4,60)	0,77 (3,94)	49,74 (20,3)	-0,93 (0,36)	1,76	43,9 (26,5)	2,05	10,97
	Chrysen	42,32 (2,36)	1,11 (0,88)	588,34 (9,29)	-1,11 (0,16)	1,48	313,64 (78,5)	1,43	78,41
	BbF	35,78 (2,28)	2,83 (2,34)	42,80 (9,35)	-1,18 (0,32)	1,44	25,43 (9,65)	1,74	6,35
	BaP	35,70 (3,89)	0,18 (1,79)	35,44 (11,3)	-0,84 (0,21)	1,55	25,49 (11,7)	1,25	6,37

[1] = Angaben in [pmol/mg/min]

Tab. 5.3. Die Tabelle zeigt alle relevanten Parameter für die dritte Mischung (neuer Mischungsansatz) aus vier PAH in RTL-W1-Zellen. Gezeigt werden die geschätzten Funktionsparameter min, max, EC50, b und f, die zur Berechnung der Konzentration x bei dem festgesetzten Effekt 10*C dienten. C = EROD-DMSO-Kontrolle. Standardabweichungen in Klammern. In Bezug auf die Vorhersage bezeichnet die Konzentration x/4 (= ci) die Konzentration für die jeweilige Substanz, die in die Mischung eingesetzt wurde. In Bezug auf die Kontrolle bezeichnet x/4 (= ci) die Konzentration, die in die Mischung hätte eingesetzt werden müssen. Die Berechnung der TUS-Werte bezieht sich daher einmal auf die x/4 (oder ci) aus der Vorhersage und einmal auf die x/4 (oder ci) aus der Kontrolle.

Mischung 3	Substanz	max[1]	min[1]	EC50 [nM]	b	C[1]	Konz. x bei 10*C [nM]	Stderr[1] von f	x/4 [nM]
Vorhersage für Mischung 3	3-MC	36,5 (4,60)	0,77 (3,94)	49,74 (20,3)	-0,93 (0,36)	1,76	43,9 (26,5)	2,05	10,97
	Chrysen	42,32 (2,36)	1,11 (0,88)	588,34 (9,29)	-1,11 (0,16)	1,48	313,64 (78,5)	1,43	78,41
	BbF	35,78 (2,28)	2,83 (2,34)	42,80 (9,35)	-1,18 (0,32)	1,44	25,43 (9,65)	1,74	6,35
	BaP	35,70 (3,89)	0,18 (1,79)	35,44 (11,3)	-0,84 (0,21)	1,55	25,49 (11,7)	1,25	6,37
Ergebnis für Mischung 3	Mischung 2	32,51 (6,20)	2,53 (2,85)	13,18 (4,76) BaP+...	-2,02 (1,30)	2,24	6,70 (12,0) BaP+...	5,19	
Kontrolle für Mischung 3	3-MC	44,83 (7,75)	0,74 (3,21)	118,08 (48,1)	-1,17 (0,50)	1,19	46,83 (34,5)	3,34	11,7
	Chrysen	42,90 (2,24)	1,76 (0,82)	419,76 (33,4)	-2,89 (0,59)	1,27	295,39 (39,6)	1,67	73,84
	BbF	30,57 (3,81)	2,19 (3,46)	74,21 (31,3)	-1,6 (1,04)	1,49	65,10 (41,1)	4,51	16,27
	BaP	38,7 (17,5)	1,96 (0,82)	57,06 (61,3)	-1,46 (0,20)	1,52	38,51 (6,24)	1,05	9,62

[1] = Angaben in [pmol/mg/min]

Die Ergebnisse für die drei Mischungsexperimente sind in Form der Toxic unit summation (TUS-Werten) in Tabelle 5.4 in Bezug auf die Vorhersage und die Kontrolle dargestellt. Dabei bezeichnet „TUS" die Werte, die aus den in Tabelle 5.1 bis 5.3 dargestellten Konzentrationen berechnet wurden. Die Abkürzung „TUS_{MC}" bezeichnet die TUS-Werte, die über die Monte Carlo-Simulation geschätzt wurden und Stderr (TUS_{MC}) die dazugehörigen geschätzten Standardfehler.

Tab. 5.4. Dargestellt sind die Ergebnisse für drei Mischungsexperimente mit jeweils vier PAH in RTL-W1-Zellen, ausgedrückt in TUS, TUS_{MC} und Stderr (TUS_{MC}). Die TUS-Werte wurden berechnet, die Indikation „MC" bedeutet, daß die Werte über Monte Carlo Simulation geschätzt wurden. Erläuterungen siehe Text.

	TUS in Bezug auf die Vorhersage	TUS_{MC} in Bezug auf die Vorhersage	Stderr (TUS_{MC}) in Bezug auf die Vorhersage	TUS in Bezug auf die Kontrolle	TUS_{MC} in Bezug auf die Kontrolle	Stderr (TUS_{MC}) in Bezug auf die Kontrolle
Mischung 1	0,30	0,36	7,33	0,81	1,12	51,85
Mischung 2	0,98	1,04	0,64	1,03	1,07	67,13
Mischung 3	1,05	1,54	43,98	0,79	1,34	196,03

Nach allgemeiner Übereinkunft gilt bei TUS ≈ 1 Übereinstimmung mit der Annahme der Konzentrationsadditivität, bei 0 < TUS < 1 Unterschätzung der Toxizität und bei TUS > 1 Überschätzung der Toxizität. Unklar ist dabei, was TUS ≈ 1 bedeutet. Betrachtet man nur die Ergebnisse für die TUS-Werte, die aus den Konzentrationen im Mischungsexperiment ermittelt wurden, liegen die Werte nahe bei 1 (Tab. 5.4). Dies gilt z.B. für die Mischung 2 sowohl in Bezug auf die Vorhersage als auch in Bezug auf die Kontrolle. Vergleicht man die berechneten TUS-Werte mit den geschätzten TUS_{MC}-Werten, so weichen sie in Abhängigkeit vom geschätzten Standardfehler für TUS_{MC} voneinander ab. Bei größeren geschätzten Standardfehlern für TUS_{MC} scheint auch die Differenz von TUS und TUS_{MC} größer zu sein (Abweichung von TUS_{MC} bis zu 70% von TUS). Die geschätzten Standardfehler sind in den meisten Fällen erheblich größer als der geschätzte Parameter (TUS_{MC}) selbst. Im besten Fall liegt das 95% Intervall bei der Mischung 2 in Bezug auf die Vorhersage bei -0,24 bis + 2,32, mit TUS_{MC} = 1,04. Die hohen Standardfehler resultieren aus den bereits hohen Standardfehlern in den Plots für die einzelnen Substanzen (siehe Tab. 5.1 bis 5.3).

5.2.2 Diskussion

In drei Mischungsexperimenten mit jeweils vier PAH sollte gezeigt werden, ob PAH bei der EROD-Induktion konzentrationsadditiv wirken. Dazu wurde als experimentelles Modell die RTL-W1-Zellinie ausgewählt, das Versuchsdesign beruht auf der Methode der Toxic unit summation. Die Ergebnisse in Tabelle 5.4 zeigen, daß die Werte für TUS in Bezug auf die Vorhersage und auf die Kontrolle in den meisten Fällen nahe dem erwarteten Wert von 1 liegen. Eine Ausnahme bildet nur der TUS-Wert in Bezug auf die Vorhersage bei Mischung 1. Ansonsten ist die Abweichung von 1 maximal ca 20%. Aus diesen Ergebnissen könnte nach gängiger Methode (bei TUS ≈ 1 gilt Additivität) gefolgert werden, daß Konzentrationsadditivität vorliegt. Betrachtet man jedoch die geschätzten Standardfehler von TUS_{MC} (Tab. 5.4), sind die Werte von TUS nicht mehr aussagekräftig. Aufgrund der sehr hohen Standardfehler von TUS_{MC} läßt sich die Hypothese, daß die Werte nur zufällig nahe bei 1 liegen, nicht widerlegen. Die hohen Standardfehler von TUS_{MC} beruhen auf den bereits hohen Standardfehlern für die Konzentration x bei dem betrachteten Effekt f(x) in den Plots für die Einzelsubstanzen (Tab. 5.1 bis 5.3). Der hohe Standardfehler für die Konzentration x beruht darauf, daß sich die erhobenen Daten in diesen Fällen offenbar nur bedingt durch die vier-Parameter-Funktion 4.1 beschreiben ließen. Das kann auch dann auftreten, wenn die Konzentrations-Wirkungs-Kurve „optisch" gut an die vorgegebenen Daten angepaßt erscheint. Der hohe Standardfehler von x und damit auch der von TUS_{MC} ist damit auf die jeweilige Kurvenanpassung und nicht etwa auf die Varianz der einzelnen Datenpunkte zurückzuführen. Die Varianz einzelner Datenpunkte, also die Standardabweichung einer EROD-Aktivität bei einer bestimmten Konzentration, könnte auf die Varianz der Zellen oder auf methodische Ursachen zurückgeführt werden (z.B. schlechte Durchmischung der Schadstoff-Stammlösung im Medium).

Aus den hohen Standardfehlern von TUS_{MC} ergibt sich zusätzlich ein methodisches Problem, welches die Verwendung der Daten für die TUS-Berechnung fragwürdig macht. Wenn die Standardabweichung und damit auch der Standardfehler in die Größenordnung des geschätzten Parameters selbst kommt, wird die Annahme der zugrunde gelegten Normalverteilung fragwürdig, weil dann ein erheblicher Teil der Wahrscheinlichkeitsmasse im negativen Bereich liegt. Ignoriert man dieses Problem, läßt sich die Hypothese von TUS = 1 mit den erhobenen Daten trotz der hohen Standardfehler nicht verwerfen. Allerdings gilt dasselbe z.B. für die Aussage TUS = x mit 0 < x < 2. Da die Standardfehler weit größer sind als 30%, werden

die in dieser Arbeit aufgestellten Kriterien zur Konzentrationsadditivität (siehe Kap. 5.1.4) nicht ausreichend erfüllt. Dennoch kann mit den erhobenen Daten die Hypothese, daß die vier PAH konzentrationsadditiv wirken, weder bestätigt noch verworfen werden.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß Mischungsexperimente nicht nur aufgrund eines TUS-Wertes beurteilt werden können. In die wahrscheinliche Schwankungsbreite von TUS gehen die Standardfehler der Kurven für die Einzelsubstanzen entscheidend mit ein. Es ist deshalb wichtig, alle Vorhersagen und Kontrollen für ein Mischungsexperiment sowie das Ergebnis der Mischung selbst aus Plots zu ermitteln, die nicht viel Spielraum für eine Konzentration x bei einem festgelegten Effekt f(x) zulassen. Diese hier gezeigte Fehlerquelle wird häufig mißachtet.

5.3 Additivität von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen und Polychlorierten Biphenylen

5.3.1 Ergebnisse

Die Konzentrations-Wirkungskurven in Primärhepatocyten lassen sich auch für Benzo(a)pyren und PCB126 sowie die binären Mischungen durch die Funktion 4.1 beschreiben. Die EROD-Induktion war im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant (One way ANOVA, $p < 0,05$).

In den Tabellen 5.5 bis 5.8 sind die Ergebnisse für alle Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt. Gezeigt sind sowohl die Parameter der Kurvenfunktionen, ihre Standardfehler, die berechneten Konzentrationen für die doppelte EROD-Aktivität gegenüber den DMSO-Kontrollen als auch die daraus resultierenden Konzentrationen für die Mischungsexperimente (x/2 in nM) sowie die Ergebnisse der Mischungsexperimente selbst. In Experimenten, die mit ** gekennzeichnet sind, wurde als Effekt die Induktion des doppelten Minimums statt der doppelten DMSO-Kontrolle berechnet. Dies geschah in den Fällen, in denen sich aufgrund geringer maximaler Induktion keine doppelte Aktivität der DMSO-Kontrolle berechnen lies. In Mischung 2 wurde der Effekt des doppelten Minimums zusätzlich zum Effekt der doppelten DMSO-Kontrolle betrachtet, weil die Kontrolle für die EROD-Aktivität im Experiment die des Minimums deutlich überstieg (C = 58,4 pmol/mg/min, Min = 29,11 pmol/mg/min).

Tab. 5.5. Die Tabelle zeigt alle relevanten Parameter für die Vorhersage zu den Mischungen aus Benzo(a)pyren und PCB126 in Primärhepatocyten. Alle folgenden Mischungen basieren auf dieser Vorhersage. Gezeigt werden die geschätzten Funktionsparameter min, max, EC50 und b, die zur Berechnung der Konzentration x bei dem festgesetzten Effekt y* = 2*C dienten, sowie der Standardfehler der Funktion f(min, max, EC50,b,x) an der Stelle y*. C=EROD-DMSO-Kontrolle. t = Meßzeitpunkt. Der Wert x/2 bezeichnet die Konzentration, die in die Mischung eingesetzt wurde.

t	Substanz	max[1]	min[1]	EC50 [nM]	b	C[1]	x bei 2*C [nM]	Stderr[1] von f	x/2 [nM]
24h	PCB 126	184,25 (5,55)	54,31 (2,96)	0,53 (0,03)	-3,64 (0,64)	62,07	0,552 (0,045)	5,86	0,276
24h	BaP	166,68 (5,79)	58,65 (2,36)	108,14 (9,54)	-2,33 (0,40)	62,07	130,16 (16,6)	3,64	65,08

[1] in [pmol/mg/min], Standardabweichung in Klammern

Tab. 5.6. Ergebnisse für Mischungsexperiment 1 aus Benzo(a)pyren und PCB126 in Primärhepatocyten zum Zeitpunkt 24h. Gezeigt werden die geschätzten Funktionsparameter min, max, EC50 und b, die zur Berechnung der Konzentration x bei dem festgesetzten Effekt y^{*}=2*C dienten, sowie der Standardfehler der Funktion f(min, max, EC50,b,x) an der Stelle y^{*}. C=EROD-DMSO-Kontrolle. t = Meßzeitpunkt. Der Wert x/2 bezeichnet die Konzentration, die in die Mischung hätte eingesetzt werden müssen (Kontrolle im Mischungsexperiment). Die Indikation ** bedeutet, daß statt der doppelten DMSO-Kontrolle das doppelte Minimum als festgesetzter Effekt betrachtet wurde.

	t	Substanz	max[1]	min[1]	EC50 [nm]	b	C[1]	x bei 2*C [nM]	Stderr[1] von f	x/2 [nM]
Mischung 1	24h	PCB 126	90,00 (1,30)	33,81 (0,61)	0,21 (0,011)	-1,64 (0,12)	35,2	0,307 (0,030)	1,35	
		BaP			49,51			72,45 (7,12)		
Mischung 1	24h**	PCB 126	90,00 (1,30)	33,81 (0,61)	0,21 (0,011)	-1,64 (0,12)	35,2	0,270** (0,024)	1,35	
		BaP			49,51			63,73** (5,66)		
Kontrolle zu Mischung 1	24h	PCB 126	106,5 (2,88)	38,29 (1,12)	0,79 (0,043)	-2,75 (0,34)	40,8	0,966 (0,0752)	1,093	0,483
	24h	BaP	82,07 (0,80)	26,44 (0,55)	90,15 (3,31)	-0,94 (0,04)	29,11	122,34 (6,94)	0,142	61,17

[1] in [pmol/mg/min], Standardabweichung in Klammern

Tab. 5.7. Ergebnisse für Mischungsexperiment 2 aus Benzo(a)pyren und PCB126 in Primärhepatocyten zum Zeitpunkt 48h. Gezeigt werden die geschätzten Funktionsparameter min, max, EC50 und b, die zur Berechnung der Konzentration x bei dem festgesetzten Effekt y^{*} = 2*C dienten, sowie der Standardfehler der Funktion f(min, max, EC50,b,x) an der Stelle y^{*}. C = EROD-DMSO-Kontrolle. t = Meßzeitpunkt. Der Wert x/2 bezeichnet die Konzentration, die in die Mischung hätte eingesetzt werden müssen (Kontrolle im Mischungsexperiment). Die Indikation ** bedeutet, daß statt der doppelten DMSO-Kontrolle das doppelte Minimum als festgesetzter Effekt betrachtet wurde.

	t	Substanz	max[1]	min[1]	EC50 [nM]	b	C[1]	x bei 2*C [nM]	Stderr[1] von f	x/2 [nM]
Mischung 2	48h	PCB126	165,89 (3,67)	29,11 (3,01)	0,27 (0,015)	-6,37 (3,04)	58,4	0,295 (0,0235)	6,10	
		BaP			63,66			69,56 (5,54)		
Mischung 2	48h**	PCB126 und BaP	165,89 (3,67)	29,11 (3,01)	0,27 (0,015) 63,66	-6,37 (3,04)	58,4	0,331** (0,026) 78,17** (6,14)	6,10	
Kontrolle zu Mischung 2	48h	PCB	84,51 (3,76)	32,60 (2,18)	0,46 (39,0)	-17,47 (1810)	37,49	0,501 (62,6)	2,38	0,250
	48h	BaP	98,62 (3,75)	30,9 (2,86)	229,96 (38,2)	-1,52 (0,39)	34,38	268,82 (57,9)	2,25	134,41

[1] in [pmol/mg/min], Standardabweichung in Klammern

Tab. 5.8. Ergebnisse für Mischungsexperiment 3 aus Benzo(a)pyren und PCB126 in Primärhepatocyten zu den Zeitpunkten 24h und 48h. Die Daten für Mischung 3a und 3b wurden in Primärhepatocyten aus einem Fisch erhoben. Gezeigt werden die geschätzten Funktionsparameter min, max, EC50 und b, die zur Berechnung der Konzentration x bei dem festgesetzten Effekt $y^{*} = 2*C$ dienten, sowie der Standardfehler der Funktion f(min, max, EC50,b,x) an der Stelle y^{*}. C = EROD-DMSO-Kontrolle. t = Meßzeitpunkt. Der Wert x/2 bezeichnet die Konzentration, die in die Mischung hätte eingesetzt werden müssen (Kontrolle im Mischungsexperiment). Die Indikation ** bedeutet, daß statt der doppelten DMSO-Kontrolle das doppelte Minimum als festgesetzter Effekt betrachtet wurde.

	t	Substanz	max[1]	min[1]	EC50 [nM]	b	C[1]	x bei 2*C [nM]	Stderr[1] von f	x/2 [nM]
Mischung 3a	24h**	PCB126	78,59 (2,57)	34,34 (1,79)	0,31 (0,042)	-1,56 (0,580)	40,56	0,687** (0,359)	1,137	
		BaP			73,09			161,99** (84,64)		
Kontrolle zu Mischung 3a	24h**	PCB126	66,83 (2,58)	31,46 (1,07)	0,87 (0,081)	-3,33 (0,88)	31,46**	1,627** (55,6)	2,33	0,813**
	24h**	BaP	79,79 (1,95)	32,25 (2,01)	107,82 (16,3)	-1,83 (0,375)	32,25**	162,11** (33,4)	1,55	81,05**
Mischung 3b	48h	PCB126	129,83 (5,46)	22,48 (3,06)	0,36 (0,032)	-2,43 (0,565)	25,78	0,239 (0,0422)	5,796	
		BaP						56,35 (9,94)		
Mischung 3b	48h**	PCB126	129,83 (5,46)	22,48 (3,06)	0,36 (0,032)	-2,43 (0,565)	22,48**	0,208** (0,0437)	5,79	
		BaP						49,13** (10,37)		

[1] in [pmol/mg/min], Standardabweichung in Klammern

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse zeigen die Abbildungen 5.2 bis 5.4 die Isobologramme für die Mischungen 1, 2 und 3 aus PCB126 und BaP in Primärhepatocyten.

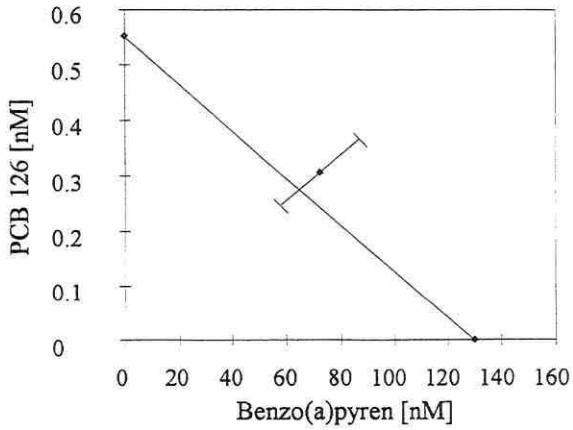

Abb.5.2. Das Isobologramm zeigt das Ergebnis der Mischung 1 (24h) aus PCB126 und BaP in Primärhepatocyten bei 24h. Die Konzentration in der Mischung ist mit dem doppelten Standardfehler auf dem Mischungsstrahl eingetragen.

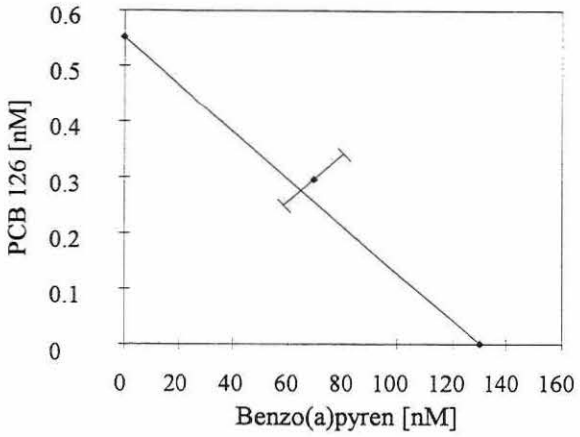

Abb. 5.3. Das Isobologramm zeigt das Ergebnis der Mischung 2 (48h) aus PCB126 und BaP in Primärhepatocyten bei 48h. Die Konzentration in der Mischung ist mit dem doppelten Standardfehler auf dem Mischungsstrahl eingetragen.

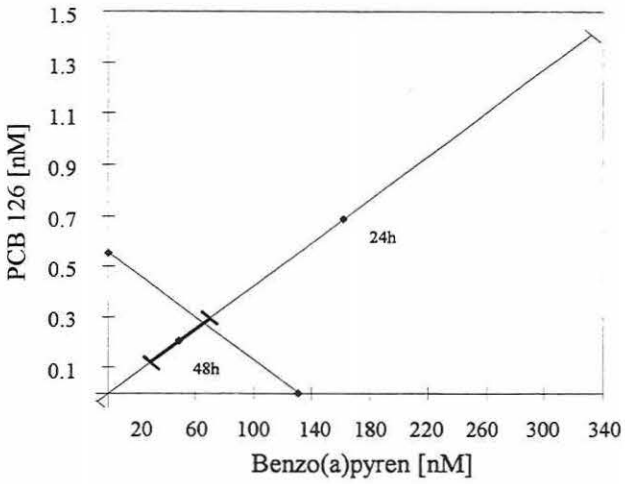

Abb.5.4. Das Isbologramm zeigt die Ergebnisse der Mischung 3a (24h) und 3b (48h) aus PCB126 und Bap in Primärhepatocyten. Die Konzentrationen in den Mischungen sind mit den doppelten Standardfehlern auf dem Mischungsstrahl aufgetragen. Die Daten wurden in einem Experiment erhoben. Die Konzentrationen der Mischungen sind mit den doppelten Standardfehlern auf dem Mischungsstrahl eingetragen.

In den Abbildungen 5.2 bis 5.4 ist zu erkennen, daß die Konfidenzintervalle für die Effektkonzentrationen bei Mischung 1 (24h), bei Mischung 2 (48h), und bei Mischung 3a (24h) sowie 3b (48h), mit der Isobolen für Additivität überlappen.

Um auch im binären Gemisch die Resultate des Mischungsexperiments auf die zeitgleiche Kontrolle der einzelnen Substanzen beziehen zu können, wurden die Ergebnisse über die Toxic unit summation ausgewertet (Tab. 5.9). Bei TUS handelt es sich um die berechneten TUS-Werte, bei TUS_{MC} um die über Monte Carlo Simulation geschätzten TUS_{MC}-Werte.

Tab. 5.9 Berechnete TUS- und geschätzte TUS_{MC}-Werte mit den dazugehörigen Standardfehlern von TUS_{MC} für alle binären Mischungen aus PCB126 und BaP in Primärhepatocyten. **: Effekt gleich doppeltes Minimum statt doppelter DMSO-Kontrolle.

Experiment	t	TUS in Bezug auf die Vorhersage	TUS_{MC} in Bezug auf die Vorhersage	Stderr TUS_{MC} (Vorhersage)	TUS in Bezug auf die Kontrolle	TUS_{MC} in Bezug auf die Kontrolle	Stderr TUS_{MC} (Vorhersage)
Mischung 1	24h	1,11	1,12	0,14	0,90	0,91	0,09
Mischung 1	24h	0,97**			0,80**		
Mischung 2	48h	1,06	1,08	0,12	0,84**	0,27	2,22
Mischung 2	48h	1,20**	1,21	0,13	0,95**	0,31	2,66
Mischung 3a	24h	2,48**	2,51	1,33	1,42**	1,06	3,25
Mischung 3b	48h	0,86	0,87	0,16			
Mischung 3b	48h	0,75**	0,76	0,17			

Tabelle 5.10 zeigt die daraus resultierenden 95% Konfidenzintervalle für die berechneten TUS-Werte.

Tab. 5.10 Berechnete TUS-Werte für drei Mischungsexperimente aus PCB126 und BaP in Primärhepatocyten und die geschätzten 95% Konfidenzintervalle. **: Effekt gleich doppeltes Minimum statt doppelter DMSO-Kontrolle.

Experiment	t	TUS in Bezug auf die Vorhersage	95% Konfidenz-intervall	doppelter Stderr in %	TUS in Bezug auf die Kontrolle	95% Konfidenz-intervall	doppelter Stderr in %
Mischung 1	24h	1,11	0,84-1,4	22	0,90	0,73-1,09	20
Mischung 2	48h	1,06	0,84-1,32	22	0,84	-4,17-4,71	528
Mischung 2	48h	1,20**	0,95-1,47	21	0,95**	-4,37-6,27	560
Mischung 3a	24h	2,48**	-0,18-5,14	107	1,42**	-5,08-7,92	457
Mischung 3b	48h	0,86	0,55-1,19	37			
Mischung 3b	48h	0,75**	0,42-1,10	45			

Da in den Experimenten mit PCB126 und Benzo(a)pyren besonderes Augenmerk auf das Verhalten der Mischung über die Zeit gerichtet wurde, soll der Kurvenverlauf zu den verschiedenen Zeitpunkten noch einmal graphisch veranschaulicht werden. Abbildung 5.5 zeigt dazu den Plot für die Mischung 1 (24h), sowie die Plots für die Mischung 3 bei 24h und 48h. Die beiden voneinander unabhängigen Mischungsexperimente für 24h wurden in einer Abbildung zusammengefaßt, um die Auswirkungen relativ geringer Änderungen in der Funktion auf das Ergebnis der Mischung erläutern zu können.

In der Abbildung 5.5 ist zu erkennen, daß die Minima für beide 24h-Mischungen mit 33,8 und 34,3 pmol/mg/min quasi identisch sind. Die Maxima weichen um 10 pmol/mg/min voneinander ab (siehe Tab. 5.6 und 5.8), womit auch der EC50 für Mischung 1 mit 0,21 nM PCB126 + 49,51 nM BaP kleiner ist als der für Mischung 3a mit 0,31 nM PCB + 73,09 nM BaP. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt das Minimum ab, bei der Mischung 3b (48h) liegt es nur noch bei 22,4 pmol/mg/min, der Wert für das Maximum ist jedoch im Vergleich zu beiden 24h-Experimenten deutlich gestiegen.

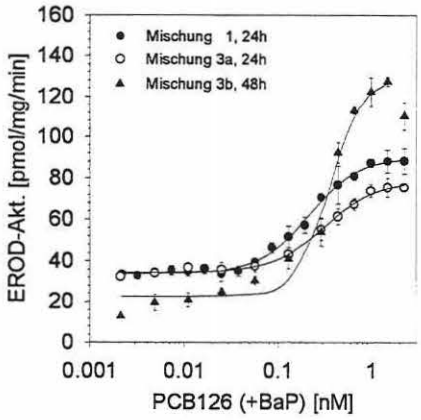

Abb. 5.5. Die Abbildung zeigt die Plots für die Mischung 1 (24h) und die Mischung 3 bei 24h und 48h.

5.3.2 Diskussion

Zum Nachweis der Additivität von PAH und PCB wurde ein binäres Gemisch aus PCB126 und Benzo(a)pyren über einen Zeitraum von 48h getestet. Dabei sollte untersucht werden, ob die vermuteten Unterschiede in der Metabolismusrate von Benzo(a)pyren und PCB126 einen Einfluß auf das Ergebnis in der Mischung haben. Die Resultate sind in Kapitel 5.3.1 in Form von Isobolgrammen (Abb. 5.2 bis 5.4) oder als Toxic unit summation (Tab. 5.9 und 5.10) dargestellt.

In den Abbildungen 5.2 bis 5.4 ist zu erkennen, daß die Konfidenzintervalle für die Effektkonzentrationen bei Mischung 1 (24h), bei Mischung 2 (48h), und bei Mischung 3a (24h) sowie 3b (48h), mit der Isobolen für Additivität überlappen. Die Hypothese, daß die beiden Substanzen konzentrationsadditiv wirken, läßt sich damit in allen drei Mischungen nicht zurückweisen. Die Überlappung der Konfidenzintervalle mit der Isobolen bildete ein Kriterium für Additivität (siehe Kap. 5.1.4), es wurde in jedem Fall erfüllt. Das zweite Kriterium war, daß der doppelte Standardfehler nicht größer als 30% sein sollte. Dieses Kriterium wird nur von den Ergebnissen der Mischungen 1 und 2 erfüllt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse läßt sich nach den hier festgelegten Kriterien die Aussage nicht verwerfen, daß PCB126 und Benzo(a)pyren sowohl nach 24h als auch nach 48h additiv wirken.

Der relativ hohe Standardfehler von x in der Mischung 3a verwundert zunächst, da der Plot durch die gegebenen Datenpunkte gut beschrieben zu sein scheint (Abb. 5.4). Bei einer Funktion mit vier geschätzten Parametern kann das jedoch eine „optische Täuschung" sein. Der Standardfehler von x beruht auf einem vergleichsweise hohen Fehler von b, also der Steigung der Funktion. Entscheidend für den großen Fehler für die Effektkonzentration ist auch die Lage des betrachteten Effekts. Bei der Mischung 3a liegt f(x) fast schon auf dem Plateau der Kurve. In diesem Bereich des Plots ruft eine geringfügige Veränderung im betrachteten Effekt E(x) eine relativ große Veränderung in der dazugehörigen Konzentration x hervor. Der betrachtete Effekt wird durch eine Konzentration von 0,687 nM PCB126 + 161,99 nM BaP hervorgerufen und weist einen Fehler von 0,359 nM PCB126 + 84,64 nM BaP auf. Daher kann

hier keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Mischung konzentrationsadditiv ist und „nahe" der Erwartung von 0,279 nM PCB126 + 65,08 nM BaP liegt oder nicht.

Beim Vergleich der beiden Kurven für 24h in Abbildung 5.5 zeigt sich, daß auch für den Betrachter scheinbar geringfügige Unterschiede im Kurvenverlauf einen erheblichen Einfluß auf das Ergebnis in der Mischung haben können. Die beiden Kurven für 24h unterscheiden sich in der Höhe des Maximums lediglich um 10 pmol/mg/min, dies jedoch signifikant (ANOVA, repeated measurements, $p < 0,05$). In der Mischung 1 ist der Effekt additiv (Abb. 5.2), in Mischung 3a ist dies aufgrund des großen Fehlers nicht zu beurteilen. Der entscheidende Unterschied liegt in der Lage der betrachteten Effektkonzentrationen auf der Kurve. In der Mischung 1 liegt der festgesetzte Effekt wie auch bei der Vorhersage im Steigungsbereich der Kurve, bei Mischung 3a bereits im Bereich des Plateaus, obwohl sich die betrachteten Effekte mit E(0,307 nM PCB126 + 72,45 nM BaP) = 70,4 pmol/mg/min (Mischung 1) und E(0,687 nM PCB126 + 161,99 nM BaP) = 68,68 pmol/mg/min (Mischung 3a) nur geringfügig unterscheiden. Das Ergebnis von Mischung 3a ist damit aufgrund des höheren Standardfehlers von x, der auf dem flacheren Kurvenverlauf und der damit veränderten Lage des Effekts beruht, nicht mit den Resultaten der anderen Mischungen zu vergleichen. Das Ergebnis zeigt eindrücklich, wie wichtig die Erhebung kompletter Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Systemen ohne definiertes Maximum (z.B. 100% Letalität) zur Beurteilung von Mischungsexperimenten ist. Bei Messung einzelner Datenpunkte kann die Lage des betrachteten Effekts nicht beurteilt werden.

Um auch die binären Mischungen auf im Mischungsexperiment parallel gemessene Kontrollen beziehen zu können, wurden sie über die Toxic unit summation ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.9 dargestellt. In Bezug auf die Vorhersage ergibt sich für die Toxic unit summation das gleiche Ergebnis wie mit der Methode des Isobologramms, mit der ja nur eine Aussage in Bezug auf die Vorhersage getroffen werden kann. Die geschätzten TUS_{MC}-Mittelwerte sind mit den berechneten TUS-Werten nahezu identisch und liegen für Mischung 1, 2 und 3b mit TUS_{MC} = 1,12, 1,08 und 0,87 in Bezug auf die Vorhersage nahe bei 1 (Tab. 5.9). Die geschätzten Standardfehler beschreiben 95%-Konfidenzintervalle für TUS von 0,55 bis 1,4 (Tab. 5.10). Der Wert von TUS = 1 wird also von den 95%-Intervallen eingeschlossen. Damit ist das erste Kriterium für Konzentrationsadditivität von allen drei Mischungen erfüllt und die Hypothese, daß die Substanzen PCB126 und Benzo(a)pyren konzentrationsadditiv wirken, läßt sich nicht ablehnen. Das zweite Kriterium, daß der doppelte Standardfehler nicht größer als 30% sein soll, wird jedoch wiederum nur von den Ergebnissen aus den Mischungen 1 und 2 erfüllt (Tab. 5.10). Mit den vorliegenden Ergebnissen läßt sich also auch mit der Methode der Toxic unit summation und den in dieser Arbeit aufgestellten Kriterien die Aussage treffen, daß die Substanzen PCB126 und Benzo(a)pyren nach 24h und 48h konzentrationsadditiv wirken.

In Bezug auf die Kontrolle ist nur der TUS-Wert für die Mischung 1 (24h) aussagekräftig. Er liegt bei 0,90 mit einem Konfidenzintervall von 0,73-1,09. Dies kann als weitere Bestätigung für die Annahme, daß die Substanzen additiv wirken, gewertet werden.

Über den Bezug des Mischungsergebnisses auf die Vorhersage und die Kontrolle sollte das Verhalten der Mischung über die Zeit beurteilt werden. Es wurde erwartet, daß nach 48h ein Teil des Benzo(a)pyrens metabolisiert ist und deshalb höhere nominale Konzentrationen für das Erreichen des gleichen Effekts eingesetzt werden müssen. Dies resultiert theoretisch in einem TUS_{48h}-Wert = 1 in Bezug auf die Kontrolle und in einem TUS_{48h}-Wert > 1 in Bezug auf die Vorhersage. Sowohl die berechneten als auch die geschätzten TUS-Werte entsprechen tendenziell dieser Vorhersage (Tab. 5.9), allerdings sind die TUS-Werte in Bezug auf die Kontrollen nicht statistisch abgesichert.

Die beschriebene Verlagerung der TUS-Werte nach 48h gründet sich auf die Annahme, daß sich die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die EROD-Induktion mit zunehmender Inkubationsdauer im Konzentrations-Wirkungsdiagramm nach rechts verschiebt, derselbe Effekt also bei höheren Konzentrationen auftritt. Betrachtet man Abbildung 5.5, so entspricht der Kurvenverlauf bei 48h jedoch nicht dieser Erwartung. Das Minimum ist gegenüber 24h deutlich geringer und läßt sich über die intrazelluläre Abnahme des Induktors aufgrund von Metabolismus interpretieren. Allerdings nimmt auch die EROD-Aktivität in Zellen ohne Schadstoff von 24h nach 48h ab (Tab. 5.8). Die Abnahme des Minimums muß also nicht kausal mit dem Metabolismus von Benzo(a)pyren zusammenhängen. Das Maximum der EROD-Induktion nimmt zwischen 24h und 48h noch deutlich zu. Der genaue Zeitpunkt der maximalen EROD-Induktion ist damit nicht bekannt. Er kann zwischen 24h und 48h liegen oder noch nicht erreicht worden sein. Mit den vorhandenen Daten kann daher nicht beurteilt werden, ob eine Rechtsverschiebung der Kurve bereits stattgefunden hat.

Das Ergebnis der additiven Wirkung von PCB126 und Benzo(a)pyren bei 48h in der Mischungen 2 in Bezug auf die Vorhersage spricht eher dafür, daß der Metabolismus im betrachteten Zeitraum noch keinen entscheidenden Einfluß auf das Mischungsergebnis hat. Die Betrachtung eines noch längeren Zeitraums ist mit dem System der Primärzellkulur ohne Mediumwechsel nicht möglich, da sich die Zellen durch eine hohe Verstoffwechselung von Aminosäuren zu NH_3 selbst vergiften würden.

Zusammenfassende Betrachtung

In der Umwelt auftretende Xenobiotika können von Fischen metabolisiert und ausgeschieden werden. Für diesen Vorgang sind Biotransformationsenzyme verantwortlich, dabei unterscheidet man zwischen den Phasen I und II der Biotransformation. Eine besondere Rolle im Zusammenhang mit dem Fremdstoffwechsel spielt die Unterfamilie CYP1A der Phase I-Enzyme. CYP1A wird durch Xenobiotika induziert und aufgrund dieser Eigenschaft seit den siebziger Jahren als Biomarker eingesetzt. Dabei diente der Biomarker CYP1A häufig dazu, einen Schastoffgradienten in aquatischen Systemen mit hoher chemischer Belastung zu detektieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich Biotransformationsenzyme in der Leber von Fischen auch dann als Biomarker eignen, wenn sie zur Differenzierung von Fließgewässern mit diffuser Belastungssituation eingesetzt werden. Dazu wurde die Induktion von Enzymen der Phase I und II der Biotransformation in der Leber von Bachforellen und Bachschmerlen gemessen, die an das Wasser zweier kleiner Fließgewässer im Raum Stuttgart exponiert wurden. Das Belastungsmuster der beiden Gewässer ist durch Schadstoffeinträge aus der Luft sowie durch Oberflächenabfluß von landwirtschaftlich genutzten Flächen und Kläranlageneinleitern gekennzeichnet. Stellvertretend für die Phase I wurde die Induktion von Cytochrom P4501A (CYP1A) als spezifisch auf Xenobiotika reagierendes Enzym gemessen. Zur Charakterisierung der Phase II Enzyme wurde die Aktivität der Glutathion-S-Transferase bestimmt. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß sich die Induktion von CYP1A in der Leber beider Fischarten dazu eignet, zwischen den beiden Fließgewässern zu unterscheiden und eine chemische Belastung im Vergleich zur Laborkontrolle anzuzeigen. Dies gilt sowohl für die Induktion des Proteingehalts von CYP1A, der immunchemisch mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmt wurde, als auch für die katalytische Aktivität von CYP1A, die als Aktivität der Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) gemessen wurde. Die größere Induktionsantwort wurde in dem Gewässer mit der durchschnittlich höheren chemischen Belastung beobachtet. Für das stellvertretende Enzym der Phase II konnte keine eindeutige Induktion in Abhängigkeit von der Belastungssituation der beiden Gewässer ermittelt werden. Die Aktivität der Glutathion-S-Transferase weicht zwar von der Aktivität der Laborkontrolle ab, die Abweichung ist jedoch positiv sowie negativ und korreliert nicht mit dem Belastungsmuster der untersuchten Bäche.

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob die im Freiland beobachteten Unterschiede der CYP1A-Antwort zwischen den Bächen ursächlich auf den Einfluß von Chemikalien zurückzuführen sind. Zur Klärung dieser Frage wurde eine Kombination von in vivo- und in vitro-Systeme eingesetzt. In einem in vivo-Versuch wurde die in Freilandtieren analysierte Körperdosis von Schadstoffen nachgestellt und die Induktion von Cytochrom P4501A gemessen. Direktes Resultat dieses Versuches war, daß die erwartete Körperdosis für die betrachteten Schadstoffe in vivo erreicht wurde, die Induktion von CYP1A jedoch deutlich geringer war als im Freiland. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Einsatz des TEQ-Konzeptes. Über diesen Ansatz wird nicht nur die Summe der Schadstoffrückstände betrachtet, sondern zusätzlich die Relevanz der einzelnen Substanzen für die Induktion von CYP1A gewichtet. Wichtige Substanzgruppen für die Induktion sind Polychlorierte Biphenyle (PCB) und Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH). Die Betrachtung der

Ergebnisse über den TEQ-Ansatz hat gezeigt, daß es im Falle der metabolisierbaren PAH offensichtlich nicht möglich ist, eine Induktionsantwort über die Rückstände der nicht metabolisierten Muttersubstanzen im Organismus abschätzen zu können. Die im Vergleich zum in vivo-Versuch höhere Induktionsantwort im Freiland könnte dann auf der Induktion durch PAH, die schnell metabolisiert wurden und damit nicht mehr als Muttersubstanz nachweisbar waren, beruhen. Zur Abschätzung der Belastung mit PAH ist es daher erforderlich, die Konzentration der Metabolite in der Galle des Fisches zu bestimmen.

Das TEQ-Konzept beruht auf der Annahme, daß Dioxin-ähnliche Substanzen wie PAH und PCB additiv auf die Induktion von Cytochrom P4501A wirken. Die additive Wirkweise dieser Substanzgruppen wurde bisher nur ansatzweise für Polychlorierte Biphenyle gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die additive Wirkweise auch für die Substanzgruppe der PAH und für eine Kombination von PAH und PCB zutrifft. Dazu wurden zwei in vitro-Zellkultursysteme aus der Leber von Regenbogenforellen eingesetzt. Die Auswahl fiel auf die Zellinie RTL-W1 (rainbow trout liver-Waterloo 1) und auf Primärhepatocyten aus der Regenbogenforelle. Kriterien für die Auswahl dieser beiden Systeme waren, daß es sich bei beiden Systemen um nicht transformierte Leberzellen handelt und daß beide aus der Regenbogenforelle stammen.

Um beide in vitro-Systeme für Kombinationswirkungsexperimente zur additiven Wirkweise von PAH und PCB einsetzen zu können, mußte zunächst das Induktionsverhalten der beiden Zellkultursysteme mit Einzelsubstanzen untersucht werden. Dazu wurde die Induktionskapazität von neun PAH in beiden Systemen ermittelt. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß sich die Zellinie RTL-W1 und die Primärhepatocyten in ihrer Induktionsantwort grundsätzlich nicht unterscheiden. In beiden Systemen wird die katalytische Aktivität von CYP1A durch die Substanzen Benz(a)anthracen, Benzo(k)fluoranthen, Benzo(a)pyren, Chrysen und 3-Methylcholanthren induziert. Erstellt man eine Reihenfolge der Induktionskapazität dieser Substanzen über den EC50, so ist sie in beiden Systemen nahezu identisch. Die beiden Systeme sind damit in ihrer Empfindlichkeit miteinander vergleichbar. Auf die Substanzen Anthracen, Fluoranthen, Phenanthren und Pyren haben die RTL-W1-Zellen nie mit einer Induktion von CYP1A reagiert, die Primärhepatocyten jedoch in einigen Fällen. Die Ursache für diese in einigen Experimenten auftretende Induktion konnte nicht geklärt werden.

Ein großer Unterschied der beiden in vitro-Systeme liegt in der basalen katalytischen Aktivität von CYP1A (EROD). Die basale EROD-Aktivität in den RTL-W1-Zellen ist im Durchschnitt ca 30fach geringer als die in Primärhepatocyten, dabei ist die basale Aktivität in den RTL-W1 Zellen stabiler als in den Primärhepatocyten. Aufgrund der niedrigen Basalaktivität weisen die RTL-W1-Zellen höhere Induktionsfaktoren (Max:Kontrolle) bei gleichzeitig geringeren Induktionsspannen (Max-Kontrolle) als die Primärhepatocyten auf. Ein weiterer Unterschied liegt in der Varianz der beiden Systeme hinsichtlich ihrer Induktionsantwort. In den Primärhepatocyten variiert die Höhe und Lage des Maximums stärker als in den RTL-W1-Zellen. Die Varianz in der Höhe des Maximums drückt sich in den größeren Standardabweichungen für die mittlere Induktionsspanne in den Primärhepatocyten aus. Der zeitliche Verlauf der Induktion ist in beiden in vitro-Systemen sehr ähnlich. Nach 24 Stunden Inkubation mit dem Schadstoff weisen beide Zellkultursysteme eine signifikante Induktion von Cytochrom P4501A auf.

Da sich die beiden Zellkultursysteme in ihren Kulturbedingungen dadurch unterscheiden, daß RTL-W1-Zellen in serumhaltigem Zellkulturmedium gehalten werden müssen, wurde der Einfluß des Serumgehalts im Medium auf die Induktionskapazität eines exemplarischen PAH

in beiden in vitro-Systemen untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die Zugabe von Serum die Induktionsspanne sowohl in RTL-W1-Zellen als auch in Primärhepatocyten verändern kann. In den Primärhepatocyten tritt dieser Effekt jedoch nicht in allen untersuchten Fällen auf. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß das Serum einen positiven Effekt auf die physiologische Konstitution der Leberzellen haben könnte und darüber die Induktion in den Zellen fördern kann. Dies gilt besonders für die Primärhepatocyten. Die Beeinflussung ist jedoch nicht so gravierend, daß ein regelmäßiger Einsatz von Serum auch in der Kultur von Primärhepatocyten begründet werden kann.

Der Vergleich der beiden Zellkultursysteme hat gezeigt, daß beide in vitro-Systeme für Induktionsanalysen von CYP1A-induzierenden Substanzen oder Proben (z.B. Sedimentextrakte, Organextrakte etc.) geeignet sind. Da sich beide Systeme in ihrer grundsätzlichen Induktionsantwort nicht unterscheiden (beide Systeme reagieren auf dieselben Substanzen mit vergleichbarer Empfindlichkeit) kann die aufwendige Primärzellkultur für freilandrelevante Induktionsanalysen durch die Zellinie RTL-W1 ersetzt werden.

In den Untersuchungen zur Kombinationswirkung von PAH und PCB kamen beide in vitro-Systeme zum Einsatz. Für die Untersuchung der additiven Wirkweise von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen wurde die RTL-W1-Zellinie eingesetzt, da hier bei der Auswahl des in vitro-Systems nur wichtig war, daß das Zellsystem eine gute Induktionskapazität aufweist. Theoretische Grundlage für das Versuchsdesign ist die konzentrationsadditive Wirkung der Substanzen, die eingesetzte Methode war die der Toxic Unit Summation. Statistisch konnte die Hypothese, daß die untersuchten Substanzen nicht konzentrationsadditiv wirken, nicht zurückgewiesen werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden eigene Kriterien zur Bewertung der Mischungsergebnisse aufgestellt. Unter Anwendung dieser Kriterien auf die erhobenen Daten konnte nicht eindeutig gezeigt werden, daß die untersuchten PAH konzentrationsadditiv wirken.

In einem weiteren Kombinationsexperiment wurde ein Gemisch aus einem PAH (Benzo(a)pyren) und einem PCB (PCB 126) untersucht. Hier sollte gezeigt werden, daß Vertreter aus zwei verschiedenen Stoffgruppen konzentrationsadditiv in der Induktion von CYP1A wirken. Dabei sollte zusätzlich der Einfluß des zeitlichen Verlaufs der Induktion und damit der angenommene Metabolismus von Benzo(a)pyren in Betracht gezogen werden. Um die metabolische Kapazität des in vitro-Systems zu gewährleisten, wurde hier das System der Primärhepatocyten eingesetzt. Es wurde angenommen, daß die Mischung aufgrund der Abnahme der Konzentration des einen Induktors mit zunehmender Inkubationszeit weniger als additiv wirkt. Theoretisch wurde das Konzept der Konzentrationsadditivität sowie die Methode des Isobolograms als auch die der Toxic Unit Summation eingesetzt. Die Ergebnisse haben unter Anwendung der eingeführten Bewertungskriterien gezeigt, daß die Mischung sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden konzentrationsadditiv wirkt. Damit scheint der Metabolismus im untersuchten Zeitrahmen noch keinen wesentlichen Einfluß auf die konzentrationsadditive Wirkung in der Mischung zu haben. Die Annahme der Konzentrationsadditivität von PAH und PCB, die die Voraussetzung für den Einsatz des TEQ-Konzepts bildet, ist damit mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten valide.

Ein weiterer Versuch, der die Induktionsantwort im Freiland ursächlich auf die Belastung mit PAH und PCB zurückführen sollte, war ein Extraktversuch unter Kombination von Freiland- und in vitro-Systemen. Auch die Interpretation dieses Versuchs setzt Konzentrationsadditivität der genannten Substanzgruppen voraus. Fische wurden im Freiland exponiert, in einem Teil der Lebern die Indukion von CYP1A bestimmt, und aus dem

verbleibenden Teil der jeweiligen Leber ein PAH/PCB-Extrakt hergestellt. Dieser Extrakt wurde auf seine Induktionskapazität in der Zellinie RTL-W1 getestet. Wenn die Induktion im Freiland hauptsächlich auf die PAH und PCB zurückzuführen ist, sollten die Ergebnisse aus dem Freiland mit denen in vitro in einer linearen Regression korrelieren. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß sich der lineare Zusammenhang mit einem Regressionskoeffizienten von ca 0,6 beschreiben läßt. Die Induktion im Freiland läßt sich also zu ca 60% über die Inhaltstoffe des Extrakts erklären. Das Ergebnis aus dem Extraktversuch gibt einen Hinweis darauf, daß die CYP1A-Induktion im Freiland zu ca 40% durch andere Faktoren bestimmt werden kann. Dieser Befund ist deshalb wichtig, da die Induktion von CYP1A bisher als ein Biomarker betrachtet wurde, der besonders spezifisch auf Xenobiotika reagiert. Die Diskrepanz zwischen Freiland und in vitro im Extraktversuch kann chemische als auch biologische Ursachen haben. Chemische Ursachen wären z.b. die Hemmung der Induktion von CYP1A durch Chemikalien, die im Freiland, jedoch nicht in vitro wirken können. Als biologische Ursachen wären z.B. der Einfluß der Temperatur, des Ernährungszustandes der Fische oder ihres Sexualzyklus zu nennen. Auch die Wirkung dieser Faktoren ist in vitro weitestgehend ausgeschaltet. Der Extraktversuch kann damit Hinweise darauf geben, wie die Wirkung von Chemikalien und anderer nicht chemischer Einflußgrößen im Freiland zu wichten ist. Die Kombination von Freilanduntersuchungen mit in vivo-und in vitro-Experimenten kann daher Interpretationshilfen für Freilandstudien liefern.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß mit dem Biomarker CYP1A auch zwischen aquatischen Standorten, die durch eine diffuse und relativ schwache Belastung charakterisiert sind, differenziert werden kann. Da die Umweltbelastung in aquatischen Systemen in den letzten Jahren zurückgegangen ist, ist dies für den zukünftigen Einsatz dieses Markers im Biomonitoring von besonderer Bedeutung. Durch die Kombination von in vivo- und in vitro-Systemen konnte außerdem eine quantitative Abschätzung vorgenommen werden, inwieweit die gemessene Biomarkerantwort auf den Einfluß von Schadstoffen zurückgeht. Die Kombination dieser Systeme bietet damit ein weites Feld zukünftiger Ursachenforschung. Dies gilt nicht nur im Hinblick auf den Endpunkt CYP1A. Durch die Auswahl eines geeigneten in vitro-Systems für den jeweils betrachteten Endpunkt öffnet sich eine Vielzahl von Möglichkeiten auf dem Gebiet der aquatischen Toxikologie.

Literatur

Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley, M.S. Jr, Jimenez, B.D., Ryon, M.G., Shugart, L.R., McCarthy, J.F. und D.E. Hinton 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. Mar. Environ. Res. 28, 459-464.

Ahokas, J.T., Holdway, D.A., Brennan, S.E., Goudey, R.W. und H.B. Bibrowska 1994. MFO activity in Carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated pulp and paper mill effluent in Lake Coleman, Victoria, Australia, in relation to AOX, EOX, and muscle PCDD/PCDF. Environ. Toxicol. Chem. 13, 41-50.

Altenburger, R., Bödeker, W., Faust, M. und L.H. Grimme 1993. Aquatic Toxicology, Analysis of Combination Effects. In: Corn M (ed) Handbook of hazardous materials. San Diego, USA: Academic Press, 1993, 15-27.

Altenburger, R., Bödeker, W., Faust, M. und H. Grimme 1990. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 20, 98-114.

Andersson, T. 1986. Cytochrome P-450-dependent metabolism in isolated liver cells from fed and starved rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Fish Physiol. Biochem. 1, 105-111.

Andersson, T. und A. Goksøyr 1994. Distribution and induction of cytochrome P450 1A1 in the rainbow trout brain. Fish Physiol. Biochem. 13, 335-342.

Andersson, T. und U. Koivusaari 1985. Influence of environmental temperature on the induction of xenobiotic metabolism by β-naphthoflavone in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 80, 43-50.

Andersson, T. und U. Koivusaari 1986. Oxidative and confugative metabolism of xenobiotics in isolated liver cells from thermally acclimated rainbow trout. Aquat. Toxicol. 8, 85-92.

Ankley, G.T., Reinert, R.E., Wade, A.E. und R.A. White 1985. Temperature compensation in the hepatic mixed-function oxidase system of bluegill. Comp. Biochem. Physiol. 81C, 125-129.

Babich, H. und E. Borenfreund 1987. Polycyclic aromatic hydrocarbon in vitro cytotoxicity to bluegill BF-2 cells: mediation by S-9 microsomal fraction and temperature. Toxicol. Lett. 36, 107-116.

Baksi, S.M. und J.M. Frazier 1990. Isolated fish hepatocytes-model systems for toxicology research. Aquat. Toxicol. 16, 229-256.

Bankey, L.A., Van Veld, P.A., Borton, D.L., LaFleur, L. und J.J. Stegeman 1994. Responses of cytochrome P4501A in freshwater fish exposed to bleached kraft mill effluent in experimental stream channels. Can. J. Fish. Aquatic. Sci. 52, 439-447.

Behrens, A., Schirmer, K., Bols, N.C. und H. Segner 1998. Microassay for rapid measurement of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in intact fish hepatocytes. Mar. Environ. Res. 46, 369-373.

Berenbaum, M.C. 1985. The expected effect of a combination of agents: the general solution. J. Theor. Biol. 114, 413-431.

Berenbaum, M.C. 1989. What is synergy? Pharmacol. Rev. 41, 93-141.

Berndtson, A.K. und T.T. Chen 1994. Two unique CYP1 genes are expressed in response to 3-Methylcholanthrene treatment in rainbow trout. Arch. Biochem. Biophys. 310, 187-195.

Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skare, J.U. und A. Goksøyr 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjørden, Norway. Aquatic. Toxicol. 36, 75-98.

Blanck, J., Lindström-Seppä, P., Agren, J.J., Hänninen, O., Rein, H. und K. Ruckpaul 1989. Temperature compensation of hepatic microsomal cytochrome P-450 activity in rainbow trout. I. Thermodynamic regulation during water cooling in autumn. Comp. Biochem. Physiol. 93C, 55-60.

Bliss, C.I. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. Ann. App. Biol. 102, 780-781.

Bols, N.C., Whyte, J.,Clemons, J., Denise, T., van den Heuvel, M. und G. Dixon 1997. Use of liver cell lines to develop TCDD equivalency factors to derive TCDD equivalent concentrations in environmental samples. Chapter 23, in: Ecotoxicology: Responses, Biomarkers and Risk Assessment, an OECD workshop (J.T. Zelikoff, ed), SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA.

Braunbeck, T., Hauck, C., Scholz, S. und H. Segner 1995/1996. Mixed function oxygenase in cultured fish cells: contribution of in vitro studies to the understanding of MFO induction. Z. angew. Zool. 81, 55-72.

Brumley, C.M., Haritos, V.S., Ahokas, J.T. und D.A. Holdway 1995. Validation of biomarkers of marine pollution exposure in sand flathead using Aroclor 1254. Aquat. Toxicol. 31, 249-262.

Brumley, C.M., Haritos, V.S., Ahokas, J.T. und D.A. Holdway 1998. The effects of exposure duration and feeding status on fish bile metabolites: Implications for biomonitoring. Ecotoxicol. Environ. Saf. 39, 147-153.

Brüschweiler B. J.,Würgler, F.E. und K.H. Fent 1996. Inhibitory effects of heavy metals on cytochrome P4501A induction in permanent fish hepatoma cells. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31, 475-482.

Bucheli, T.D. und K. Fent 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. Crit. Rev. Environ. Sci. Techn. 25, 201-268.

Burke, M.D. und R.T. Mayer 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. Drug Metabol. Dispos. 2, 583-588.

Campbell, P.M., Kruzynski, G.M., Birtwell, I.K. und R.H. Devlin 1996. Quantitation of dose-dependent increases in CYP1A1 messenger RNA levels in juvenile chinook salmon exposed to treated bleached-kraft mill effluent using two field sampling techniques. Environ. Toxicol. Chem. 15, 1119-1123.

Carpenter, H., Frederickson, L.S., Williams, D.E., Buhler, D.R. und L.R. Curtis 1990. The effect of thermal acclimation on the activity of arylhydrocarbon hydroxylase in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. 97C, 127-132.

Celander, M.,Stegeman, J.J. und L. Förlin 1996. CYP1A1-, CYP2B- and CYP3A-like proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: CYP1A1-specific down-regulation after prolonged exposure to PCB. Mar. Environ. Res. 42, 283-286.

Chiarolini, A., Donato, M.T., Gomez-Lechon, M.J., Pala, M., Valerio, F. und M. Ferro 1997. Comparison of rat hepatocyte and differentiated hepatoma cell line culture as bio-indicators of CYP 1A1 inducers in urban air. Biomarkers 2, 279-285.

Clemons, J.H., Dixon, D.G. und N.C. Bols 1997. Derivation of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors (TEFs) for selected dioxins, furans and PCBs with rainbow trout and rat liver cell lines and the influence of exposure time. Chemosphere 34, 1105-1119.

Clemons, J.H., Myers, C.R., Lee, L.E.J., Dixon, D.G. und N.C. Bols 1998. Induction of cytochrome P4501A by binary mixtures of polychlorinated biphenyls (PCBs) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in liver cell lines from rat and trout. Aquat. Toxicol. 43, 179-194.

Collier, T.K., Connor S.D., Eberhart, B-T.L., Anulacion, B.F., Goksøyr, A., Varanasi, U. 1992. Using Cytochrome P450 to monitor the aquatic environment. Initial results from regional and national surveys. Mar. Environ. Res. 34, 195-199.

Collier, T.K., Anulacion, B.F., Stein, J.E., Goksøyr, A. und U. Varanasi 1995. A field evaluation of cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flatfish. Environ. Toxicol. Chem. 14, 143-152.

Courtenay, S., Grunwald, C., Kreamer, G.-L., Alexander, R. und I. Wirgin 1993. Induction and clearance of cytochrome P4501A mRNA in Atlantic tomcod caged in bleached kraft mill effluent in the Miramichi River. Aquatic. Toxicol. 27, 225-244.

Cravedi, J.-P., Paris, A., Monod, G., Devaux, A., Flouriot, G. und Y. Valotaire 1996. Maintenance of cytochrome P450 content and phase I and phase II enzyme activities in trout hepatocytes cultured as spheroidal aggregates. Comp. Biochem. Physiol. 113C, 241-246.

De Bernardo, S., Weigele, M., Toome, V., Manhart, K., Leimgruber, W., Böhlen, P., Stein, S. und S. Udenfriend 1974. Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines. Arch. Biochem. Biophys. 163, 390-399.

Depledge, M.H. 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Nondestructive biomarkers in vertebrates, eds. Fossi, M.C. und C. Leonzio. Lewis Publishers, Boca Raton, 1994.

De Wolf, W., De Bruijn, J.H.M., Seinen, W. und J.L.M. Hermens 1992. Influence of biotransformation on the relationship between bioconcentration factors and octanol-water partition coefficients. Environ. Scie. Technol. 26, 1197-1201.

Eggens, M.L., Opperhuizen, A. und J.P. Boon 1996. Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichtys flesus*, from the Dutch Wadden Sea. Chemosphere 33, 1579-1596.

Elliott, J.E., Norstrom, R.J., Lorenzen, A., Hart, L.E., Philibert, H., Kennedy, S.W., Stegeman, J.J.,Bellward, G.D. und K.M. Cheng 1996. Biological effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) chicks. Environ. Toxicol. Chem. 15, 782-793.

Fenet, H., Casellas, C. und J. Bontoux 1998. Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in European Eel and Rainbow Trout. Ecotoxicol. Environ. Saf. 40, 137-143.

Ferraris, M., Dosanjh, M.K. und E. Marafante 1996. Metabolism of benzo(a)pyrene in fish hepatocytes cultured on microplates. Polycycl. Aromat. Comp. 11, 91-98.

Flouriot, G., Monod, G., Valotaire, Y., Devaux, A. und J.-P. Cravedi 1995. Xenobiotic metabolizing enzyme activities in aggregate culture of rainbow trout hepatocytes. Mar. Environ. Res. 39, 293-297.

Förlin, L. und M. Celander 1993. Induction of cytochrome P450 1A in teleosts: environmental monitoring in Swedish fresh, brackish and marine waters. Aquat. Toxicol. 26, 41-56.

Förlin, L. und C. Haux 1990. Sex differences in hepatic cytochrome P-450 monooxygenase activities in rainbow trout during an annual reproductive cycle. J. Endocrinol. 124, 207-213.

Förlin, L., Haux, C., Karlsson-Norrgren, L., Rumm, P. und A. Larsson 1986. Biotransformation enzyme activities and histopathology in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, treated with cadmium. Aquat. Toxicol. 8, 51-64.

Gadagbui, B. K-M. und A. Goksøyr 1996. CYP1A and other biomarker responses to effluents from a textile mill in the Volta River (Ghana) using caged tilapia (*Oreochromis niloticus*) and sediment-exposed mudfish (*Clarias anguillaris*). Biomarkers 1, 252-261.

Gallagher E.P., Stapleton, P.L., Slone, D.H., Schlenk, D., und D.L. Eaton 1996. Channel catfish glutathione S-transferase isoenzyme activity toward (±)-*anti*-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. Aquat. Toxicol. 34, 135-150.

Gasiewicz, T.A. und G. Rucci 1991. α-Naphthflavon acts as an antagonist of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin by forming an inactive complex with the Ah receptor. Mol. Pharmacol. 40, 607-612.

Gennings, C, Carter, W.H., Jr, Campbell, E.D., Staniswalis, J.D., Martin, T.J., Martin B.R. und K.L. White, Jr 1992. Isobolographic characterisation of drug interactions incorporating biological variability. J. Pharmacol. Exp. Ther. 252, 208-217.

Giesy, J.P., Jude, D.J., Tillitt, D.E., Gale, R.W., Meadows, J.C., Zajieck, J.L., Peterman, P.H., Verbrugge, D.A., Sanderson, J.T., Schwartz, T.R. und M.L. Tuchman 1997. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, debenzofurans, biphenyls and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalents in fishes from Saginaw Bay, Michigan. Environ. Toxicol. Chem. 16, 713-724.

Gooch, J.W., Elskus, A.A., Kloepper-Sams, P.J., Hahn, M.E., Stegeman, J.J. 1989. Effects of ortho- and non-ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners on the hepatic monooxygenase system in scup (*Stenotomus chrysops*). Toxicol. Appl. Pharmacol. 98, 422-433.

Goksøyr, A. 1987. Characterization of the cytochrome P-450 mono-oxygenase system in fish liver. Metabolism and effects of organic xenobiotics. PhD-thesis, Department of Biochemistry, University of Bergen, Norway.

Goksøyr, A. 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. Arch. Toxicol. Suppl. 17, 80-95.

Goksøyr, A., Beyer, J., Husøy, A.-M., Larsen, H.E., Westrheim, K., Wilhelmsen, S. und J. Klungsoyr 1994. Accumulation and effects of aromatic and chlorinated hydrocarbons in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged in a polluted fjord (Sørfjorden, Norway). Aquat. Toxicol. 29, 21-35.

Goksøyr, A und A.-M. Husøy 1992. The cytochrome P4501A1 response in fish: application of immunodetection in environmental monitoring and toxicological testing. Mar. Environ. Res. 34, 147-150.

Goksøyr, A. und A.-M. Husøy 1998. Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. In: Fish Ecotoxicology, T. Braunbeck, D.E. Hinton und B. Streit (eds.), Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1998.

Goksøyr, A., Larsen, H.E. und A.-M. Husøy 1991. Application of a cytochrome P-450 IA1-ELISA in environmental monitoring and toxicological testing of fish. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 100C, 157-160.

Gregus, Z. und C.D. Klaassen 1996. Mechanisms of toxicity. In: Casarett and Doull's Toxicology, The basic science of poisons 1996, Curtis D. Klaassen, Mary O. Amdur, John Doull (eds.), The McGraw-Hill Companies, Inc.

Grøsvik, B.E., Larsen, H.E. und A. Goksøyr 1997. Effects of piperonyl butoxide and β-naphthoflavon on cytochrome P450 1A expression and activity in Atlantic salmon (Salmo salari): a temperature and time study. Environ. Toxicol. Chem. 16, 415-423.

Guosheng, C., Ying, X., Lihong, X., Yongyuan, Z., Schramm, K.-W. und A. Kettrup 1998. Influence of dioxin and metal-contaminated sediment on Phase I and II biotransformation enzymes in Silver Crucian Carp. Ecotoxicol. Environ. Saf. 40, 234-238.

Haasch, M.L., Wejksnora, P.J., Stegeman, J.J. und J.J. Lech 1989. Cloned rainbow trout liver $P_1$450 complementary DNA as a potential environmental monitor. Toxicol. Appl. Pharmacol. 98, 362-368.

Habig, W.H., Pabst, M.J. und W.B. Jakoby 1974. Glutathione-S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130-7139.

Hahn, M.E. 1998. Review: The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective. Comp. Biochem. Physiol. 121 C, 23-53.

Hahn, M.E. und K. Chandran 1996. Uroporphyrin accumulation associated with cytochrome P4501A induction in fish hepatoma cells exposed to aryl hydrocarbon receptor agonists, including 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and planar chlorbiphenyls. Arch. Biochem. Biophys. 329

Hahn, M.E., Lamb, T.M., Schultz, M.E., Smolowitz, R.M. und J.J. Stegeman 1993. Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). Aquat. Toxicol. 26, 185-208.

Hahn, M.E., Poland, A., Glover, E. und J.J. Stegeman 1992. The Ah receptor in marine animals: Phylogenetic distribution and relationship to P4501A inducibility. Mar. Environ. Res. 34, 87-92.

Hahn, M.E., Poland, A., Glover, E. und J.J. Stegeman 1994. Photoaffinigy labeling of the Ah receptor: Phylogenetic survey of diverse vertebrate and invertebrate species. Arch. Biochem. Biophys. 310, 218-228.

Hahn, M.E., Woodward,B.L., Stegeman, J.J. und S.W. Kennedy 1996. Rapid assessment of induced cytochrome P4501A protein and catalytic activity in fish hepatoma cells grown in multiwell plates: response to TCDD, TCDF, and two planar PCBS. Environ. Toxicol. Chem. 15, 582-591.

Huuskonen, S. und P. Lindström-Seppä 1995. Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (Perca fluviatilis): the effects of unbleached pulp mill effluents. Aquat. Toxicol. 31, 27-41.

Janz, D.M. and C.D. Metcalfe 1991. Nonadditive interactions of mixtures of 2,3,7,8-TCDD and 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl on aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Chemosphere 23, 467-472.

Jedamski-Grymlas, J., Kammann, U., Tempelmann, A., Karbe, L. und D. Siebers 1995. Biochemical responses and environmental contaminants in breams (*Abramis brama* L.) caught in the river Elbe. Ecotoxicol. Environ. Saf.. 31, 49-56.

Kantoniemi, A., Vähäkangas, K. und A. Oikari 1996. The capacity of liver microsomes to form benzo(a)pyrene-diolepoxide-DNA adducts and induction of cytochrome P450 1A in feral fish exposed to pulp mill effluents. Ecotoxicol. Environ. Saf. 35, 136-141.

Karels, A.E., Soimasuo, M., Lappivaara, J., Leppänen, H., Aaltonen, T., Mellanen, P. und A.O.J. Oikari 1998. Effects of ECF-bleached kraft mill effluent on reproductive steroids and liver MFO activity in populations of perch and roach. Ecotoxicology 7, 123-132.

Kennedy, S.W., Jones, S.P. und L.J. Bastien 1995. Efficient analysis of cytochrome P4501A catalytic activity, porphyrins, and total proteins in chicken embryo hepatocytes cultures with a fluorescence plate reader. Anal. Biochem. 226, 362-370.

Kennedy, S.W., Lorenzen, A., Jones, S.P., Hahn, M.E. und J.J. Stegeman 1996. Cytochrome P4501A induction in avian hepatocyte cultures: a promising approach for predicting the sensitivity of avian species to toxic effects of halogenated aromatic hydrocarbons. Toxicol. Appl. Pharmacol. 141, 214-230.

Klaunig, J.E., Ruch, R.J. und P.J. Goldblatt 1985. Trout hepatocyte culture: isolation and primary culture. In vitro Cell. Dev. Biol. 21, 221-228.

Kloepper-Sams, P.J. und J.J. Stegeman 1989. The temporal relationship between P-450E protein content, catalytic activity, and mRNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* following treatment with β-naphthoflavon. Arch. Biochem. Biophys. 268, 525-535.

Kloepper-Sams, P. und S. Swanson 1992. Bioindicator field monitoring: Use of fish biochemical parameters at a modern bleached kraft pulp mill site. Mar. Environ. Res. 34, 163-168.

Kobayashi, K., Oshima, Y., Taguchi, C. und Y. Wang 1987. Induction of drug-metabolizing enzymes by long-term administration of PCB and duration of their induced activities in carp. Nippon Suisan Gakk. 53, 487-491.

Kobayashi, Y., Matsuura, A., Kotani, E., Fukuda, T., Aoyagi T., Tobinaga, S., Yoshida, T. und Y. Kuroiwa 1993. Structural Requirements for the induction of hepatic microsomal cytochrome P450 by imidazole- and pyridine-containing compounds in rats. J. Biochem. 114, 697-701.

Kocarek, T.A., Schuetz, E.G. und P.S. Guzelian 1992. Expression of multiple forms of cytochrome P450 mRNA in primary cultures of rat hepatocytes maintained on matrigel. Mol. Pharmacol. 43, 328-334.

Kocarek, T.A., Schuetz, E.G. und P.S. Guzelian 1993. Transient induction of cytochrome P450 1A1 mRNA by culture medium component in primary cultures of adult rat hepatocytes. In Vitro Cell. Dev. Biol. 29A, 62-66.

Koivusaari, U., Harri, M. und O. Hänninen 1981. Seasonal variation of hepatic biotransformation in female and male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 70C, 149-157.

Larsen, H.E., Celander, M. und A. Goksøyr 1992. The cytochrome P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*): II. Variations in hepatic catalytic activities and isozyme patterns during an annual reproductive cycle. Fish Physiol. Biochem. 10, 291-301.

Lee, L.E.J., Clemons, J.H., Bechtel, D.G., Caldwell, S.J., Han, K-B, Pasitschniak-Arts, M., Mosser, D.D. und N.C. Bols 1993. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. Cell Biol.Toxicol. 9, 279-294.

Loewe, S. und H. Muischnek 1926. Über Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmitte der Fragestellung: Naunyn-Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol 114, 313-326.

Lorenzana, R.M., Hedström, O.R. und D.R. Buhler 1988. Localization of cytochrome P-450 in head trunk kidney of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Toxicol. Appl. Pharmacol. 96, 159-167.

Lorenzen, A. und A.B. Okey 1990. Detection and characterization of [3H] 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin binding to Ah receptor in a rainbow trout hepatoma cell line. Toxicol. Appl. Pharmacol. 106, 53-62.

Lorenzen, A., Kennedy, S.W, Bastien, L.J, und M.E. Hahn 1997. Halogenated aromatic hydrocarbon-mediated porphyrin accumulation and induction of cytochrome P4501A in chicken embryo hepatocytes. Biochem. Pharmacol. 53, 373-384.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und R.J. Randall 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Lubet, R.A., Nims, R.W., Mayer, R.T., Cameron, J.W. und L.M. Schechtman 1985. Measurement of cytochrome P-450 dependent dealkylation of alkoxyphenoxazones in hepatic S9s and hepatocyte homogenates: effects of dicumarol. Mutat. Res. 142, 127-131.

Machala, M., Petrivalsky, M., Nezveda, K., Ulrich, R., Dusek, L., Piacka, V. und Z. Svobodova 1997. Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase

and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants-a field study. Environ. Toxicol. Chem.. 16, 1410-1416.

Martin-Alguacil, N., Babich, H., Rosenberg, D.W. und E. Borenfreund 1991. In vitro response of the Brown Bullhead Catfish cell line, BB, to aquatic pollutants. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 113-117.

Masfaraud, J.-F., Devaux, A., Pfohl-Leszkowicz, A., Malaveille, C. und G. Monod 1992. DNA adduct formation and 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to Benzo(a)pyrene. Toxicol. In Vitro 6, 523-531.

Melancon, M.J. und J.J. Lech 1983. Dose-effect relationship for induction of hepatic monooxygenase activity in rainbow trout and carp by Aroclor 1254. Aquat. Toxicol. 4, 51-61.

Monod, G. und E. Vindimian 1991. Effect of storage conditions and subcellular fractionation of fish liver on cytochrome P-450-dependent enzymatic activities used for the monitoring of water pollution. Water Res. 25, 173-177.

Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.J., McMaster, M.E. und C.B. Portt 1992. Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1427-1439.

Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.J., McMaster, M.E., Portt, C.B., Van den Heuvel, M.R. und M.R. Servos 1994. Survey of receiving-water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 2. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1089-1101.

Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R. und D.J. Waxman 1991. The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. DNA Cell Biol. 10, 1-14.

Novi, S., Pretti, C., Gognetti, A.M., Longo, V., Marchetti, S. und P.B. Gervasi 1998. Biotransformation enzymes and their induction by ß-naphthoflavone in adult sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquat. Toxicol. 41, 63-81.

Otto, D.M.E. und T.W. Moon 1996. Phase I and II enzymes and antioxidation responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31, 141-147.

Pacheco, M. und M.A. Santos 1997. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicol. Environ. Saf. 38, 252-259.

Pangrekar, J., Kandaswami, C., Kole, P., Kumar, S. und H.C. Sikka 1995. Comparative metabolism of benzo(a)pyrene, chrysene and phenanthrene by brown bullhead liver microsomes. Mar. Environ. Res. 39, 51-55.

Parkinson, A. 1996. Biotransformation of Xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology, The basic science of poisons. 1996, Curtis D. Klaassen, Mary O. Amdur, John Doull (eds.),The McGraw-Hill Companies, Inc.

Payne J.F. 1976. Field evaluation of benzo(a)pyrene hydroxylase induction as a monitor for marine pollution. Science (Wash. D.C.) 191, 945-946.

Payne, J.F. und W.R. Penrose 1975. Induction of aryl hydrocarbon benzo(a)pyrene hydroxylase in fish by petroleum. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 14, 112-116.

Peakall, D. 1992. Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman and Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.

Pesonen, M., Goksøyr, A. und T. Andersson 1989. Induction of Xenobiotic metabolizing enzyme activities in primary culture of rainbow trout hepatocytes. Mar. Environ. Res. 28, 113-116.

Pesonen, M., Goksøyr, A. und T. Andersson 1992. Expression of P4501A1 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to ß-Naphtoflavone or 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Arch. Biochem. Biophys. 1, 228-233.

Petrivalsky, M., Machala, M., Nezveda, K., Piacka, V., Svobodova, Z. und P. Drabek 1997. Glutathione-dependent detoxifying enzymes in rainbow trout liver: search for specific biochemical markers of chemical stress. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1417-1421.

Placket, R.L. und P.S. Hewlett 1948. Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particular insecticides. I. The toxicity of a mixture of poisons. Ann. Appl. Biol. 35, 347-358.

Pollenz , R.S. und B. Necela 1998. Characterization of two continuous cell lines derived from *Oncorhynchus mykiss* for models of Ah-receptor mediated signal transduction. Direct comparison to the mammalian Hepta-1c1c7 cell line. Aquat. Toxicol. 41, 31-49.

Riddick, D.S., Huang, Y., Harper, P.A. und A.B. Okey 1994. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin versus 3-Methylcholanthrene: Comparative Studies of Ah receptor binding, transformation, and induction of CYP1A1. J. Biol. Chem. 269, 12118-12128.

Safe, S. 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations whicht support the development of toxic equivalency factors (TEFs). Crit. Rev. Toxicol. 21, 51-88.

Sanderson, J.T., Kennedy, S.W. und J.P. Giesy 1998. In vitro induction of Ethoxyresorufin-O-Deethylase and porphyrins by halogenated aromatic hydrocarbons in avian primary hepatocytes. Environ. Toxicol. Chem. 17, 2006-2018.

Schirmer, K., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. und N.C. Bols 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from rainbow trout gill. Toxicology 127, 129-141.

Scholz, S. 1996. Induktion von CYP1A1 durch Xenobiotika in Leberzellkulturen von Regenbogenforellen. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, UFZ-Bericht Nr. 13/1996.

Scholz, S., Behn, I., Honeck, H., Hauck, H., Braunbeck, T. und H. Segner 1997. Development of a monoclonal antibody for ELISA of CYP1A in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Biomarkers 2, 287-294.

Scholz, S., Braunbeck, T. und H. Segner 1998. Viability and differential function of rainbow trout liver cells in primary culture: Coculture with two permanent fish cells. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal 34, 762-771.

Schwirzer, S.M.G., Hofmaier, A.M., Kettrup, A., Nerdinger, P.E., Schramm, K.-W., Thoma, H., Wegenke, M. und F.J. Wiebel 1998. Establishment of a simple cleanup procedure and bioassay for determining 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity equivalents of environmental samples. Ecotoxicol. Environ. Saf. 40, 77-82.

Segner H. 1998a. Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. In: Fish Ecotoxicology, eds. Braunbeck, T., Hinton, D.E. und B. Streit, 1998, Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland.

Segner H. 1998b. Review. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. Comp. Biochem. Physiol. A 120, 71-81.

Sikka, H.C., Rutkowski, J.P. und C. Kandaswami 1990. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by liver microsomes from brown bullhead and carp. Aquat. Toxicol. 16, 101-112.

Sleiderink, H.M., Oostingh, I., Goksøyr, A. und J.P. Boon 1995. Sensitivity of cytochrome P450 1A in Dab (*Limanda limanda*) of different age and sex as a biomarker for environmental contamination in the southern North Sea. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 28, 423-430.

Soimasuo, R., Jokinen, I., Kukkonen, J., Petänen, T., Ristola, T. und A. Oikari 1995. Biomarker responses along a pollution gradient: Effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. Aquat. Toxicol. 31, 329-345.

Stagg, R.M., McIntosh, A. und P. Mackie 1995. Elevation of hepatic monooxygenase activity in the dab (*Limanda Limanda* L.) in relation to environmental contamination with petroleum hydrocarbons in the northern North Sea. Aquat. Toxicol. 33, 245-264.

Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Klotz, A.V., Wolke, R.E. und N.R. Orme-Johnson 1982. Cytochrome P-450 and monooxygenase activity in cardiac microsomes from the fish Stenotomus chrysops. Mol. Pharmacol. 21, 517-526.

Stegeman, J.J. und P.J. Kloepper-Sams 1987. Cytochrome P-450 isoenzymes and monooxygenase activity in aquatic animals. Environ. Health. Persp. 71, 87-95.

Stegeman, J.J., Woodin, B.R. und A. Goksøyr 1988. Apparent cytochrome P-450 induction as an indication of exposure to environmental chemicals in the flatfish Platichthys flesus. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46, 55-60.

Stegeman, J.J., Miller, M.R. und D.E. Hinton 1989. Cytochrome P4501A1 induction and localization in endothelium of vertebrate (Teleost) heart. Mol. Pharmacol. 36, 723-729.

Stegeman, J.J., Smolowitz, R.M. und M.E. Hahn 1991. Immunohistochemical localization of environmentally induced cytochrome P450Ia1 in multiple organs of the marine teleost *Stenotomus chrysops* (scup). Toxicol. Appl. Pharmacol. 110, 1-17.

Stegeman, J.J. und M. Hahn 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species, in Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives, Ostrander, G.K. and Malins, D., Eds., Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994, 87-206.

Stien, X., Risso, C., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., und M. Lafaurie 1997. Effect of copper chloride in vitro and in vivo on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. Environ. Toxicol. Chem. 16, 214-219.

Swartz, R.C., Schults, D.W., Ozretich, R.J., Lamberson, J.O., Cole, F.A., DeWitt, T.H., Redmond, M.S. und S.P. Ferraro 1995. ΣPAH: A model to predict the toxicity of poynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments. Environ. Toxicol. Chem.. 14, 1977-1987.

Tysklind, M., Bosveld, A.T.C., Andersson, P., Verhallen, E., Sinnige, T., Seinen, W., Rappe, C. und M. van den Berg 1995. Inhibition of Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in mixtures of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polychlorinated biphenyls. Environ. Sci. Poll. Res. 2, 211-216.

Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W. und M. Weigele 1972. A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. Science 178, 871-872.

Ueng, T.-H., Ueng, Y.-F. und S.S. Park 1992. Comparative induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenases in the livers and gills of tilapia and carp. Aquat. Toxicol. 23, 49-64.

van den Heuvel, M.R., Munkittrick, K.R., Stegeman, J.J. und D.G. Dixon 1995. Second-round interlaboratory comparison of hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase activity in white sucker (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached-kraft pulp mill effluent. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1513-1520.

van den Hurk, P., Roberts, M.H. Jr und M. Faisal 1998. Interaction of cadmium and benzo[a]pyrene in mummichog (*Fundulus heteroclitus*): Biotransformation in isolated hepatocytes. Mar. Environ. Res. 46, 529-532.

van der Oost, R., Vindimian, E., van den Brink, P.J., Satumalay, K., Heida, H. und N.P.E. Vermeulen 1997. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analysis of relationships between contaminant exposure and biomarkers. Aquat. Toxicol. 39, 45-75.

Van Veld, P.A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Patton, J.S. und R.F. Lee 1988. Induction of monooxygenase activity in the intestine of spot (*Leiostomus xanthurus*), a marine teleost, by dietary polycyclic aromatic hydrocarbons. Drug Metab. Dispos. 16, 659-665.

Van Veld, P.A., Westbrook, D.J., Woodin, B.R., Hale, R.C., Smith, C.L., Huggett, R.J. und J.J. Stegeman 1990. Induced cytochrome P-450 in intestine and liver of spot (*Leiostomus xanthurus*) from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. Aquat. Toxicol. 17, 119-132.

Van Veld, P.A., Vogelbein,W.K., Cochran,M.K., Goksøyr,A. und J.J. Stegeman 1997. Route-specific cellular expression of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary benzo(a)pyrene. Toxicol. Appl. Pharmacol. 142, 348-359.

Vigano, L., Arillo, M., Bagnasco, C., Bennicelli, C. und F. Melodia 1993. Xenobiotic metabolizing enzymes in uninduced and induced rainbow trout (*Oncorhynchus myikss*): effects of diets and food deprivation. Comp. Biochem. Physiol. 104C, 51-55.

Vigano, L., Arillo, A., Melodia, F., Arlati, P. und C. Monti 1998. Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the River Po, Italy. Environ. Toxicol. Chem. 17, 404-411.

Walker, M.K., Cook, P.M., Butterworth, B.C., Zabel, E.W. und R.E. Peterson 1996. Potency of a complex mixture of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and bephenyl congeners compared to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in causing fish early life stage mortality. Fund. Appl. Toxicol. 30, 178-186.

Wang, W.-D., Chen, Y.-M, und C.-H. Hu 1998. Detection of Ah receptor and Ah receptor nuclear translocator mRNAs in the oocytes and developing embryos of zebrafish (*Danio rerio*)[1,2]. Fish Physiol. Biochem.18, 49-57.

Whyte, J.J., van den Heuvel, M.R., Clemons, J.H., Huestis, S.Y., Servos, M.R., Dixon, D.G. und N.C. Bols 1998. Mammalian and teleost cell line bioassay and chemically derived 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalent concentrations in lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Superior and Lake Ontario, North America. Environ. Toxicol. Chem. 17, 2214-2226.

Willett, K., Gardinali, P. und S. Safe 1996. Induction equivalency factors for halogenated aromatic hydrocarbons and polynuclear aromatic hydrocarbons using the H4IIE rat hepatoma bioassay. Organohalogen compounds 29, 375-379. in: 16th Symposium on Chlorinated Dioxins and related compounds. Amsterdam, August 12-16, 1996. Ecotoxicology, Toxicology, Metabolism/Toxicokinetics 29.

Willett, K.L., Gardinali, P.R., Sericano, J.L., Wade, T.L. und S.H. Safe 1997a. Characterization of the H4IIE rat hepatoma cell bioassay for evaluation of environmental samples containing polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, 442-448.

Willett, K.L., McDonald, S.J., Steinberg, M.A., Beatty, K.B., Kennicutt, M.C. und S.H. Safe 1997b. Biomarker sensitivity for polynuclear aromatic hydrocarbon contamination in two marine fish species collected in Galveston Bay, Texas. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1472-1479.

Willett, K.L., Randerath, K., Zhou, G.-D. und S.H. Safe. 1998. Inhibition of CYP1A1 activities by the PAH Fluoranthene. Biochem. Pharmacol. 55, 831-839.

Williams, P.J., Simon, C.C. und C.E. Wilson 1998. Annual sex steroid profiles and effects of gender and season on cytochrome P450 mRNA induction in Atlantic Tomcod (*Microgadus Tomcod*). Environ. Toxicol. Chem. 17, 1582-1588.

Wolkers, J., Jørgensen, E.H., Nijmer, S.M. und R.F. Witkamp 1996. Time-dependent induction of two distinct hepatic cytochrome P4501A catalytic activities at low temperatures in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) after oral exposure to benzo(a)pyrene. Aquat. Toxicol. 35, 127-138.

Zabel, E.W., Walker, M.K., Hornung, M.W., Clayton, M.K. und R.E. Peterson 1995. Interactions of poychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners for producing rainbow trout early life stage mortality. Toxicol. Appl. Pharmacol. 134, 204-213.

Zabel, E.W., Pollenz, R. und R.E. Peterson 1996. Relative potencies of individual polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners and congener mixtures based on induction of cytochrome P4501A mRNA in a rainbow trout gonadal cell line (RTG-2). Environ. Toxicol. Chem. 15, 2310-2318.

Zaleski, J., Steward, A.R. 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.

Zaroogian, G. und R.A. Voyer 1995. Interactive cytotoxicities of selected organic and inorganic substances to brown cells of Mercenaria mercenaria. Cell Biol. Toxicol. 11, 263-271.

Tab. A.1-1. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in der Zellinie RTL-W1 nach 24h Exposition an Benz(a)anthracen. Die verschiedenen Versuche wurden mit neuen Zellpassagen und neu angesetzten schadstoffhaltigen Medien durchgeführt.

V		C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.50 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	3000 [nM]	6000 [nM]	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
1	Mw	0.86	1.71	1.10	1.77	2.48	3.69	5.13*	11.27*	12.40*	14.00*	14.02*	9.15*	16.30	13.16	1.73	14.02	166.33	-2.21	LCA
	Std	0.22	0.62	0.29	1.02	1.73	2.00	3.02	2.58	3.05	1.44	0.26	0.97							
2	Mw	0.37	0.38	0.50	0.39	0.38	0.62	1.73	1.73	3.84*	4.70*	6.32*		18.94	6.64	0.34	7.01	545.08	-1.23	LCA
	Std	0.18	0.07	0.28	0.10	0.00	0.08	1.22	0.17	1.75	0.57	1.15								
3	Mw	0.85	1.09	0.96	1.44	1.98	3.37*	3.56*	5.18*	8.92*	9.61*	12.29*	11.27*	14.34	11.34	1.18	12.19	317.01	-1.22	LCA
	Std	0.37	0.41	0.16	0.64	0.64	1.13	0.23	0.36	0.56	1.62	0.93	0.51							

Tab. A.1-2. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in der Zellinie RTL-W1 nach 24h Exposition an Benzo(a)pyren. Die verschiedenen Versuche wurden mit neuen Zellpassagen und neu angesetzten schadstoffhaltigen Medien durchgeführt.

V		C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	5000 [nM]	10000 [nm]	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
1	Mw	0.83	1.93	1.84	4.50*	7.86*	10.75*	13.00*	15.34*	17.07*	15.33*	4.16*	0.26	19.86	15.66	0.76	16.49	39.60	-1.28	LCA
	Std	0.16	0.69	0.23	0.59	3.04	1.66	2.35	1.60	2.47	0.51	0.97	0.25							
2	Mw	0.39	0.83	1.39	1.82	3.25*	3.82*	5.15*	5.45*	6.00*	6.10*	1.42	0.17	16.17	5.92	0.35	6.31	38.78	-1.05	LCA
	Std	0.06	0.21	0.08	0.70	0.31	1.66	0.67	0.56	0.64	0.60	0.96	0.14							
3	Mw	0.70	0.79	0.84	1.34	1.85	4.26*	6.17*	10.11*	10.01*	9.96*	3.39*	0.12	14.88	9.72	0.88	10.42	93.61	-1.05	LCA
	Std	0.05	0.20	0.20	0.28	0.23	1.01	1.20	2.46	1.08	0.24	0.70	0.04							

V = Versuch, C = Lösungsmittelkontrolle, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne, Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration in nM bei halber maximaler Induktion, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1, Meth. = verwendete Methode zur EROD-Messung, Mw = Mittelwert, Std = Standardabweichung, LCA = Live Cell Assay
* = Signifikanter Unterschied der EROD-Aktivität zur Lösungsmittelkontrolle (One Way ANOVA, $p<0,001$)

Tab. A.1-3. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in der Zellinie RTL-W1 nach 24h Exposition an Benzo(b)fluoren. Die verschiedenen Versuche wurden mit neuen Zellpassagen und neu angesetzten schadstoffhaltigen Medien durchgeführt.

V		C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]	16000 [nM]	22500 [nm]	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
1	Mw	1.20	1.51	1.90	2.71	5.31*	7.74*	9.83*	15.26*	16.79*	20.27*	16.62*	9.13*	4.70	4.40	15.57	17.49	1.62	18.69	103.00	-1.36	LCA
	Std	0.38	0.90	1.15	1.39	3.34	2.31	1.31	2.88	1.53	3.04	0.75	0.23	0.79	0.65							
2	Mw	0.49	0.69	0.90	0.94	1.81	2.68*	4.35*	5.53*	6.88*	7.53*	8.78*	7.85*	3.16*	2.82*	17.12	7.90	0.54	8.39	142.27	-1.14	LCA
	Std	0.17	0.20	0.43	0.41	1.24	1.40	1.15	1.55	0.88	1.43	1.21	0.28	0.44	0.22							
3	Mw	1.00	1.52	1.13	1.59	3.27	3.59*	6.53*	9.89*	12.40*	13.06*	13.98*	8.35*	5.75*	1.95	14.05	13.05	1.38	14.05	156.66	-1.49	LCA
	Std	0.25	0.26	0.42	0.28	2.33	0.30	1.18	0.87	1.20	1.14	0.80	0.36	0.73	2.59							

Tab. A.1-4. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in der Zellinie RTL-W1 nach 24h Exposition an Chrysen. Die verschiedenen Versuche wurden mit neuen Zellpassagen und neu angesetzten schadstoffhaltigen Medien durchgeführt.

V		C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
1	Mw	0.81	1.15	0.95	1.61	1.17	2.74	2.66	7.64*	9.04*	13.34*	13.76*	15.06*	18.17	13.91	1.12	14.72	327.20	-1.53	LCA
	Std	0.25	0.47	0.30	0.32	0.48	0.62	0.45	1.34	2.20	1.27	0.32	3.22							
2	Mw	0.70	0.67	0.66	0.62	0.80	1.31	1.40	3.10*	3.77*	5.51*	8.03*	7.07*	11.24	7.17	0.64	7.87	534.99	-1.25	LCA
	Std	0.24	0.21	0.16	0.35	0.28	0.30	0.19	1.53	0.26	0.80	1.18	0.84							
3	Mw	0.52	0.90	0.64	0.86	0.97	1.49	2.45*	4.35*	5.98*	9.85*	11.63*	12.48*	24.26	12.10	0.77	12.62	503.35	-1.35	LCA
	Std	0.20	0.23	0.07	0.48	0.16	0.41	0.39	1.49	0.65	0.45	1.28	1.40							

V = Versuch, C = Lösungsmittelkontrolle, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne, Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration in nM bei halber maximaler Induktion, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1, Meth. = verwendete Methode zur EROD-Messung, Mw = Mittelwert, Std = Standardabweichung, LCA = Live Cell Assay
* = Signifikanter Unterschied der EROD-Aktivität zur Lösungsmittelkontrolle (One Way ANOVA, $p<0,001$)

Tab. A.1-5. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in der Zellinie RTL-W1 nach 24h Exposition an 3-Methylcholanthren. Die verschiedenen Versuche wurden mit neuen Zellpassagen und neu angesetzten schadstoffhaltigen Medien durchgeführt.

V		C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	5000 [nM]	10000 [nM]	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
1	Mw	0.98	1.96	2.08	3.10	5.41*	9.58*	12.35*	13.78*	12.40*	11.96*	14.11*	16.17*	14.09	12.83	1.81	13.81	46.75	-1.98	LCA
	Std	0.21	0.25	0.51	0.90	1.50	1.96	4.01	2.85	1.46	0.75	1.33	2.08							
2	Mw	0.30	0.46	0.59	0.96	1.59*	2.51*	3.28*	4.52*	5.62*	5.49*	5.82*	0.67	18.63	5.65	0.39	5.95	100.05	-1.20	LCA
	Std	0.14	0.16	0.13	0.25	0.18	1.26	0.11	0.91	0.51	0.64	0.80	0.20							
3	Mw	0.56	0.97	0.83	1.85	1.98	3.19*	5.15*	7.52*	8.78*	11.14*	9.81*	4.61*	18.80	9.97	1.06	10.53	147.10	-1.49	LCA
	Std	0.34	0.73	0.18	1.28	0.32	0.43	0.57	0.74	1.21	1.43	1.02	1.61							

Tab. A.1-6. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in der Zellinie RTL-W1 nach 24h Exposition an Anthracen. Die verschiedenen Versuche wurden mit neuen Zellpassagen und neu angesetzten schadstoffhaltigen Medien durchgeführt.

V		C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	2500 [nM]	5000 [nM]	10000 [nM]	20000 [nM]	Meth.
1	Mw	1.59	2.33	1.52	1.36	1.41	1.88	1.49	2.20	1.19	1.28	1.37	1.43	1.01	1.45	LCA
	Std	0.67	0.74	0.50	0.20	0.31	0.36	0.35	0.30	0.38	0.06	0.14	0.32	0.10	0.47	
2	Mw	0.37	0.29	0.29	0.30	0.33	0.25	0.25	0.35	0.40	0.24	0.40	0.35	0.27	0.34	LCA
	Std	0.13	0.07	0.13	0.11	0.16	0.10	0.18	0.15	0.11	0.16	0.27	0.09	0.11	0.14	
3	Mw	0.61	0.82	0.50	0.52	0.65	0.56	0.57	0.44	0.71	0.63	0.64	0.58	0.63	0.77	LCA
	Std	0.09	0.16	0.19	0.11	0.14	0.16	0.23	0.14	0.16	0.05	0.09	0.28	0.04	0.16	

V = Versuch, C = Lösungsmittelkontrolle, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne, Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration in nM bei halber maximaler Induktion, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1, Meth. = verwendete Methode zur EROD-Messung, Mw = Mittelwert, Std = Standardabweichung, LCA = Live Cell Assay
* = Signifikanter Unterschied der EROD-Aktivität zur Lösungsmittelkontrolle (One Way ANOVA, $p<0,001$)

Tab. A.1-7. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in der Zellinie RTL-W1 nach 24h Exposition an Fluoranthen. Die verschiedenen Versuche wurden mit neuen Zellpassagen und neu angesetzten schadstoffhaltigen Medien durchgeführt.

V		C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]	Meth.
1	Mw	1.83	1.64	1.61	1.57	1.64	1.99	2.82	2.05	1.46	1.40	1.14	0.75	LCA
	Std	0.85	0.64	0.42	0.24	0.27	0.12	0.40	0.12	0.34	0.16	0.11	0.18	
2	Mw	0.48	0.56	0.48	0.48	0.45	0.47	0.39	0.35	0.53	0.44	0.39	0.08	LCA
	Std	0.06	0.05	0.10	0.08	0.03	0.04	0.05	0.12	0.03	0.04	0.10	0.09	
3	Mw	0.79	0.90	0.82	0.98	1.04	1.07	0.82	0.88	1.13	1.16	0.65	0.39	LCA
	Std	0.18	0.45	0.13	0.22	0.13	0.19	0.15	0.09	0.09	0.20	0.05	0.08	

Tab. A.1-8. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in der Zellinie RTL-W1 nach 24h Exposition an Phenanthren. Die verschiedenen Versuche wurden mit neuen Zellpassagen und neu angesetzten schadstoffhaltigen Medien durchgeführt.

V		C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]	Meth.
1	Mw	1.56	1.29	1.47	1.09	1.48	1.40	1.36	1.18	1.47	1.01	1.36	1.25	LCA
	Std	0.83	0.42	0.19	0.42	0.43	0.31	0.27	0.34	0.55	0.38	0.48	0.17	
2	Mw	0.41	0.47	0.85	0.37	0.44	0.38	0.56	0.34	0.38	0.53	0.54	0.26	LCA
	Std	0.04	0.07	0.26	0.12	0.19	0.26	0.27	0.12	0.20	0.09	0.01	0.07	
3	Mw	0.87	1.20	1.05	0.82	1.09	0.87	1.04	1.29	0.94	0.90	0.94	0.91	LCA
	Std	0.17	0.26	0.36	0.17	0.23	0.14	0.12	0.40	0.12	0.04	0.23	0.07	

Tab. A.1-9. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in der Zellinie RTL-W1 nach 24h Exposition an Pyren. Die verschiedenen Versuche wurden mit neuen Zellpassagen und neu angesetzten schadstoffhaltigen Medien durchgeführt.

V		C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]	16000 [nM]	32000 [nM]	64000 [nM]	128000 [nM]	Meth.
1	Mw	1.91	1.93	1.97	1.67	1.87	1.80	1.65	1.67	2.14	2.72	3.26	3.80	2.34	0.86	0.56	0.46	LCA
	Std	0.44	0.59	0.41	0.73	0.13	0.57	0.27	0.25	0.43	0.55	0.58	0.39	0.16	0.14	0.26	0.14	
2	Mw	0.58	0.47	0.48	0.41	0.53	0.42	0.54	0.43	0.53	0.98	0.66	0.15	0.12	0.13	0.15	0.01	LCA
	Std	0.29	0.21	0.15	0.02	0.17	0.12	0.22	0.10	0.28	0.18	0.19	0.09	0.15	0.16	0.08	0.04	
3	Mw	0.89	0.81	0.72	0.67	0.69	0.53	0.68	0.62	0.74	0.77	1.63	2.82	1.14	0.33	0.20	0.22	LCA
	Std	0.27	0.25	0.10	0.11	0.31	0.29	0.09	0.09	0.04	0.19	0.23	0.13	0.30	0.09	0.12	0.03	

V = Versuch, C = Lösungsmittelkontrolle, Meth. = Methode der EROD-Messung, LCA = Live Cell Assay

Tab. A.2-1. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach 24h Exposition an Benz(a)anthracen. Die verschiedenen Versuche und Isolierungen (Fische) sind durchnumeriert. Innerhalb eines Versuchs wurden dieselben schadstoffhaltigen Medien verwendet.

V	F	G		C [nM]	62,5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	6000 [nM]						U	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
10	7	w, reif	Mw	26.01	35.10*	36.22*	41.61*	47.79*	56.95*	46.39*						RTG	2.16	30.34	35.12	56.35	378.43	-2.51	LCA
			Std	0.97	0.33	0.42	0.84	1.03	3.74	4.11													
10	8	m, reif	Mw	10.46	35.13*	37.99*	39.32*	39.44*	47.39*	50.82*						RTG	4.86	40.47	37.23	50.93	751.02	-3.4	LCA
			Std	0.81	1.74	2.51	5.52	2.69	1.60	1.43													
				C [nM]	5.89 [nM]	11.70 [nM]	23.43 [nM]	46.87 [nM]	93.75 [nM]	187.50 [nM]	375 [nM]	750 [nM]	1500 [nM]	3000 [nM]	6000 [nM]								
11	10	m	Mw	27.50	42.16*	55.42*	60.33*	68.25*	73.01*	85.42*	107.35*	97.48*	112.30*	114.74*	130.97*	Ma	6.09	140.14	2.43e-7	167.64	153.72	-0.31	LCA
			Std	2.93	2.08	3.39	7.62	2.04	0.85	3.75	17.36	18.32	7.03	5.89	3.96								
11	11	m	Mw	6.43	90.16*	93.60*	106.36*	93.70*	135.27*	42.92	22.75	64.31	121.99*	15.25	156.65*	Ma							LCA
			Std	6.09	26.34	1.71	43.84	32.31	33.31	41.63	31.94	25.80	27.68	16.38	39.65								
				C [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62,5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]												
13	15	m	Mw	55.05	47.78	49.96	53.27	72.53	67.53	20.41*	26.74*					Ma							LCA
			Std	3.87	11.03	2.91	6.15	2.66	13.92	9.56	2.95												
				C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62,50 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	3000 [nM]	6000 [nM]								
15	19	w	Mw	58.81	56.62	67.09	87.53	77.59	74.15	64.36	85.28	86.35	90.12	108.86*	98.28*	Ma							LCA
			Std	6.93	28.39	10.05	12.22	7.45	19.08	5.44	10.11	17.15	7.86	1.25	16.86								
15	19	w	Mw	55.03	75.25	72.62	87.50	74.05	89.66	67.73	80.18	99.33	89.63	89.73	99.97	Ma							LCA
			Std	19.25	12.49	11.79	25.11	20.88	14.39	18.05	30.59	10.31	16.48	4.74	10.80								

V = Versuch, F = Fisch, G = Geschlecht (w = weiblich, m = männlich), C = Lösungsmittelkontrolle, U = Untergrund, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne,
Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration in nM bei halber maximaler Induktion, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1,
Meth. = verwendete Methode zur EROD-Messung, Mw = Mittelwert, Std = Standardabweichung,
RTG = Zellinie rainbow trout gonad, Ma = Matrigel, LCA = Live Cell Assay, Stop = Stop-Assay nach S.W. Kennedy
* = Signifikanter Unterschied der EROD-Aktivität zur Lösungsmittelkontrolle (One Way ANOVA, $p<0,001$)

Tab. A.2-2. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach 24h Exposition an Benzo(a)pyren. Die verschiedenen Versuche und Isolierungen (Fische) sind durchnumeriert. Innerhalb eines Versuchs wurden dieselben schadstoffhaltigen Medien verwendet.

V	F	G		C	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]						U	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth
4	1	w	Mw	40.39	58.17*	62.64*	63.39*	54.07	64.14*						RTG							LCA
			Std	12.37	3.38	2.00	2.19	8.08	13.65													
				C	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]													
5	2	w	Mw	4.24	8.69*	10.63*	15.98*	19.20*	24.53*						RTG							LCA
			Std	1.03	1.04	0.98	1.21	1.82	2.13													
5	2	w	Mw	8.04	13.56*	17.73*	22.23*	29.86*	36.25*						RTG							LCA
			Std	0.86	1.41	2.86	1.55	1.12	1.48													
6	3	n.b.	Mw	0.66	0.32	2.03	3.64*	2.33	0.80						RTG							LCA
			Std	0.23	0.40	1.00	1.16	1.22	0.20													
7	4	w	Mw	9.78	6.41	18.00	22.58*	24.31*	27.12*						RTG							LCA
			Std	1.55	7.10	3.60	6.35	5.86	5.51													
				C	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.50 [nM]	125 [nM]	250 [nM]													
10	8	m, reif	Mw	10.46	29.09*	35.01*	42.40*	48.92*	62.84*	65.82*					RTG	7.02	63.05	25.43	73.51	54.88	-1.19	LCA
			Std	0.81	4.42	6.85	7.95	11.36	10.22	1.31												
10	7	w, reif	Mw	26.01	38.59*	34.08	44.39*	50.22*	60.78*	67.86*												LCA
			Std	0.97	2.39	2.80	1.98	3.86	1.17	12.35												
				C	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.50 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	2000 [nM]	4000 [nM]								
11	10	m	Mw	38.05	36.90	43.25	46.47	53.50	61.41	112.24*	115.12*	116.83*	96.53*	109.32*	107.22*	Ma	2.99	76.00	44.88	114.05	74.89	-6.22	LCA
			Std	3.11	3.79	7.14	5.96	5.68	14.60	7.30	12.39	6.56	15.19	8.43	39.04								
11	9	m, reif	Mw	25.24	30.77	27.20	29.92	34.85	34.06	52.29*	54.11*	47.13*	62.03*	58.74*	72.99*	Ma	3.92	73.84	17.88	99.08	905.98	-0.38	LCA
			Std	4.56	6.93	1.47	8.54	8.42	6.81	13.55	11.54	7.08	13.54	2.35	2.44								
				C	1.95 [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.50 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	5000 [nM]	10000 [nM]							
15	19	w	Mw	68.57	101.53	97.78	67.94	94.63	76.63	90.78	79.67	130.29*	104.69	90.01	60.89	73.77	Ma						LCA
			Std	8.84	13.22	19.49	10.19	8.56	13.86	32.27	16.34	17.32	17.34	8.47	7.61	2.74							

Tab. A.2-2 Fortsetzung (EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach Exposition an Benzo(a)pyren)

V	F	G		C	1.95 [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.50 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	5000 [nM]	10000 [nM]	U	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
16	21	w	Mw	36.90	32.43	37.06	43.51	41.73	33.07	25.28	22.98*	45.31	47.91	46.96	37.68	1.89	Ma							LCA
			Std	5.10	5.09	7.10	3.92	7.05	2.36	9.53	12.82	10.15	5.53	0.37	5.97	0.88								
18	25	n.p.	Mw	41.47	59.92	78.01	59.11	59.98	86.38	81.92	108.67*	107.72*	132.44*	129.87*	54.49	26.87	Ma							Stop
			Std	0.84	12.04	23.66	13.08	9.22	34.61	9.28	34.43	20.87	31.59	22.58	2.64	9.31								
18	26	n.p.	Mw	69.01	60.60	64.36	53.83	60.80	58.65	84.97	121.48*	151.69*	164.89*	133.11*	29.16*	12.17*	Ma							Stop
			Std	5.25	6.45	8.53	9.31	9.93	6.70	10.66	20.56	49.81	17.00	7.14	0.66	1.96								
				C	31.25 [nM]	62.50 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]														
19	27	w	Mw	14.33	20.32*	27.60*	37.30*	45.73*	49.26*	51.92*							Ma	3.62	38.44	14.07	52.77	94.62	-1.49	Stop
			Std	0.74	1.88	2.73	1.88	4.23	4.32	4.91														
				C	3.90 [nM]	15.62 [nM]	62.50 [nM]	250 [nM]	1000 [nM]	10000 [nM]														
20	30	w, reif	Mw	29.12	29.26	35.20	49.66*	66.57*	76.91*	9.98*							Ma							Stop
			Std	1.28	0.73	1.55	4.33	2.37	1.50	1.29														
				C	3.90 [nM]	15.62 [nM]	62.50 [nM]	250 [nM]	1000 [nM]	10000 [nM]														
22	33	w	Mw	25.46	30.27	36.15*	44.34*	71.96*	78.44*	24.94							Ma	3.13	54.33	32.25	79.79	107.82	-1.83	Stop
			Std	0.69	1.44	3.55	2.61	7.35	7.27	5.11														
				C	1.95 [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.50 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	5000 [nM]	10000 [nM]								
22	34	w	Mw	45.69	38.85	41.92	41.79	43.49	41.54	49.67	63.96*	75.61*	76.71*	79.65*	56.43*	14.68*	Ma							Stop
			Std	2.02	3.10	2.26	2.25	0.70	0.71	1.01	6.34	5.47	8.85	4.84	5.97	2.58								

V = Versuch, F = Fisch, G = Geschlecht (w = weiblich, m = männlich), C = Lösungsmittelkontrolle, U = Untergrund, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne,
Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration in nM bei halber maximaler Induktion, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1,
Meth. = verwendete Methode zur EROD-Messung, Mw = Mittelwert, Std = Standardabweichung,
RTG = Zellinie rainbow trout gonad, Ma = Matrigel, LCA = Live Cell Assay, Stop = Stop-Assay nach S.W. Kennedy
* = Signifikanter Unterschied der EROD-Aktivität zur Lösungsmittelkontrolle (One Way ANOVA, $p<0,001$)

Tab. A.2-3. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach 24h Exposition an Benzo(b)fluoren. Die verschiedenen Versuche und Isolierungen (Fische) sind durchnumeriert. Innerhalb eines Versuchs wurden dieselben schadstoffhaltigen Medien verwendet.

V	F	G		C [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	8000 [nM]							U	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
8	5	m	Mw	19.47	22.89*	23.00*	26.75*	30.70*	32.50*							RTG	1.66	12.95	22.54	32.42	567.6	-2.95	LCA
			Std	1.58	0.49	1.54	1.12	2.03	2.11														
				C [nM]	43.93 [nM]	87.86 [nM]	175.73 [nM]	351.46 [nM]	702.92 [nM]	1405 [nM]	2811 [nM]	5623 [nM]	11246 [nM]	22493 [nM]	44987 [nM]								
9	6	m	Mw	20.11	19.08	20.53	21.03	25.11	25.50	25.75*	22.37	24.98	23.84	22.21	21.19	RTG							LCA
			Std	1.00	1.46	1.07	1.89	1.93	3.92	2.19	2.14	3.05	3.31	2.18	0.43								
				C [nM]	21.97 [nM]	43.94 [nM]	87.89 [nM]	175.78 [nM]	351.5 [nM]	703 [nM]	1406 [nM]	2812 [nM]	5625 [nM]	11250 [nM]	22500 [nM]								
11	10	m	Mw	25.10	38.31	48.27*	54.52*	62.88*	82.59*	97.63*	99.90*	100.15*	102.73*	92.30*	106.60*	Ma	4.03	76.24	41.23	101.34	216.24	-1.73	LCA
			Std	2.12	0.85	6.68	3.04	4.76	1.78	2.11	18.09	6.16	9.80	19.33	10.88								
11	11	m, reif	Mw	4.86	12.39	6.05	11.05	13.02	78.97	79.66	45.02	1.46	114.48	61.79	123.26	Ma							LCA
			Std	0.37	4.89	4.10	6.49	11.65	80.96	33.53	17.41	1.35	40.84	28.61	46.52								
				C [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]												
13	15	m	Mw	103.00	66.98	66.16	91.77	101.15	65.52	38.66*	52.81*					Ma							LCA
			Std	12.27	6.80	8.46	36.37	29.24	17.60	8.31	33.08												

V = Versuch, F = Fisch, G = Geschlecht (w = weiblich, m = männlich), C = Lösungsmittelkontrolle, U = Untergrund, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne,
Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration in nM bei halber maximaler Induktion, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1,
Meth. = verwendete Methode zur EROD-Messung, Mw = Mittelwert, Std = Standardabweichung,
RTG = Zellinie rainbow trout gonad, Ma = Matrigel, LCA = Live Cell Assay, Stop = Stop-Assay nach S.W. Kennedy
* = Signifikanter Unterschied der EROD-Aktivität zur Lösungsmittelkontrolle (One Way ANOVA, $p<0,001$)

Tab. A.2-4. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach 24h Exposition an Chrysen. Die verschiedenen Versuche und Isolierungen (Fische) sind durchnumeriert. Innerhalb eines Versuchs wurden dieselben schadstoffhaltigen Medien verwendet.

V	F	G		C [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	8000 [nM]							U	IF	IS	Min	Min	EC50	b	Meth.
8	5	m	Mw	24.21	30.17	31.84*	36.28*	34.13*	34.73*							RTG							LCA
			Std	0.80	2.07	1.19	3.30	2.52	7.31														
				C [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	2000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]								
9	6	m	Mw	21.10	19.63	21.94	23.07	23.47	31.59*	19.05	20.17	20.35	18.66*	18.14*	17.95*	RTG							LCA
			Std	1.32	0.57	1.68	0.52	1.29	2.14	0.87	0.48	0.39	0.88	0.20	1.73								
11	10	m	Mw	32.07	36.49	36.07	39.48	40.46	50.61*	77.38*	74.73*	95.45*	94.23*	90.99*	114.56*	Ma	3.29	73.58	32.67	105.65	276.68	-1.07	LCA
			Std	1.19	3.14	3.19	2.60	5.95	3.99	3.90	9.70	4.92	7.64	17.40	12.96								
				C [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	2000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]									
11	9	m, reif	Mw	14.24	17.00	19.30	22.29	28.71*	35.87*	45.27*	45.68*	48.74*	51.19*	61.78*		Ma	4.95	56.37	0.58	70.61	262.6	-0.46	LCA
			Std	3.00	2.48	2.19	0.96	3.32	12.76	4.94	2.22	8.71	1.17	2.04									

V = Versuch, F = Fisch, G = Geschlecht (w = weiblich, m = männlich), C = Lösungsmittelkontrolle, U = Untergrund, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne,
Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration in nM bei halber maximaler Induktion, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1,
Meth. = verwendete Methode zur EROD-Messung, Mw = Mittelwert; Std = Standardabweichung,
RTG = Zellinie rainbow trout gonad, Ma = Matrigel, LCA = Live Cell Assay, Stop = Stop-Assay nach S.W. Kennedy
* = Signifikanter Unterschied der EROD-Aktivität zur Lösungsmittelkontrolle (One Way ANOVA, $p<0,001$)

Tab. A.2-5. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach 24h Exposition an 3-Methylcholanthren. Die verschiedenen Versuche und Isolierungen (Fische) sind durchnumeriert. Innerhalb eines Versuchs wurden dieselben schadstoffhaltigen Medien verwendet.

V	F	G		C [nM]	3.9 [nM]	7.81 [nM]	15.62[nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	180 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	8000 [nM]			U	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
12	13	m	Mw	12.59	13.06	12.72	13.14	13.73	15.03	19.30	24.57*	25.51*	27.17*	30.70*	34.01*			Ma	2.64	20.69	12.31	33.28	187.53	-1.33	LCA
			Std	0.55	0.44	2.06	0.51	1.00	1.89	6.81	3.22	7.28	8.38	3.35	5.22										
12	12	m	Mw	17.83	19.41	18.76	23.67	29.48*	39.39*	47.08*	56.34*	59.09*	52.76*	57.39*	52.63*			Ma	3.14	38.17	19.38	56	53.9	-2	LCA
			Std	2.97	3.50	2.40	0.39	1.69	4.95	8.47	3.98	6.45	3.60	4.54	3.08										
12	14	n.p.	Mw	33.25	34.04	46.50	51.89	59.17	76.61	39.15	40.50	38.52	40.33	42.94	50.25			Ma							LCA
			Std	3.27	4.74	4.99	6.50	4.31	6.09	11.05	21.65	21.76	27.31	21.52	22.81										
				C [nM]	2.92 [nM]	5.85 [nM]	11.70 [nM]	23.40 [nM]	46.80 [nM]	93.75 [nM]	187.5 [nM]	375 [nM]	750 [nM]	1500 [nM]	3000 [nM]	6000 [nM]	12000 [nM]								
14	17	n.p.	Mw	31.62	17.02	20.73	23.27	29.08	25.50	40.29	28.79	191.35*	214.65*	271.42*	242.73*	107.15	102.39	Ma							LCA
			Std	10.75	8.40	4.30	5.78	6.60	13.64	9.52	8.60	61.62	48.59	75.05	155.30	22.36	19.51								

VS				C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	5000 [nM]	10000 [nm]										
1	36	m, reif	Mw	8.00	14.30	18.42*	20.56*	13.85	17.15*	12.64	23.19*	16.33*	18.40*	16.92*	15.49			Ma							LCA
			Std	1.60	4.78	2.01	5.19	2.17	2.61	6.08	3.32	3.37	3.49	2.50	3.13										
2	37	n.p.	Mw	12.20	12.04	28.55	19.39	9.71	25.11	54.97	65.19	152.67	65.39	138.24	51.12			Ma							LCA
			Std	6.44	3.51	18.85	5.62	7.29	8.38	63.94	47.25	139.25	4.66	105.63	11.30										
				C [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]															
3	38	n.p.	Mw	41.97	66.35	67.98	60.73	58.47	37.30	29.51								Ma							LCA
			Std	6.45	5.29	15.50	27.38	10.23	11.59	12.40															
				C [nM]	15.70 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]														
4	39	n.p.	Mw	12.65	18.34	22.61	22.91	23.64	23.91	22.22	32.18*							Ma							LCA
			Std	1.42	3.56	2.83	3.78	4.60	11.30	4.68	5.33														
5	40	n.p.	Mw	12.02	21.97	21.91	24.01	29.38*	21.58	13.07	9.49							Ma							LCA
			Std	6.07	1.23	9.71	8.45	1.46	8.49	6.88	3.37														
				C	31.25	62.5	125	250	500	1000															

Tab. A.2-5. Fortsetzung

				C [nM]	15.70 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]													
7	41	n.p.	Mw	14.21	29.15*	31.39*	39.12*	48.19*	49.39*	44.71*									Ma					Stop
			Std	0.85	4.59	3.22	3.45	3.76	7.02	3.56														
				C	1.95	3.90	7.81	15.62	31.25	62.5	125	250	500	1000	2000	4000								
8	42	w	Mw	29.78	29.40	26.30	27.58	32.48	33.36	46.54*	57.61*	68.79*	84.83*	77.66*	60.50*	55.27*		Ma	2.79	53.45	27.74	83.23	107.48	-1.54	Stop
			Std	3.46	1.58	3.23	3.56	1.51	3.89	4.43	6.56	10.41	9.18	2.82	1.74	4.43									

V = Versuch, F = Fisch, G = Geschlecht (w = weiblich, m = männlich), C = Lösungsmittelkontrolle, U = Untergrund, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne,
Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration in nM bei halber maximaler Induktion, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1,
Meth. = verwendete Methode zur EROD-Messung, Mw = Mittelwert, Std = Standardabweichung,
RTG = Zellinie rainbow trout gonad, Ma = Matrigel, LCA = Live Cell Assay, Stop = Stop-Assay nach S.W. Kennedy
* = Signifikanter Unterschied der EROD-Aktivität zur Lösungsmittelkontrolle (One Way ANOVA, $p<0,001$)

Tab. A.2-6. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach 24h Exposition an Anthracen. Die verschiedenen Versuche und Isolierungen (Fische) sind durchnumeriert. Innerhalb eines Versuchs wurden dieselben schadstoffhaltigen Medien verwendet.

V	F	G		C	9.76 [nM]	19.53 [nM]	39.06 [nM]	78.12 [nM]	156.25 [nM]	312.5 [nM]	625 [nM]	1250 [nM]	2500 [nM]	5000 [nM]	10000 [nM]	U	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
10	8	m, reif	Mw	10.46	10.05	9.51	8.58	8.07*	8.52	14.90*	13.74*	13.91*	12.50*	14.58*	14.65*	RTG	1.34	3.58	9.04	14.04	272.5	-184.08	LCA
			Std	0.81	0.97	0.95	1.37	0.46	0.26	1.27	0.89	1.46	0.20	2.80	2.06								
10	7	w, reif	Mw	26.01	26.72	26.97	27.15	26.59	30.97	23.64	23.24	25.22	24.75	22.05	18.23	RTG							LCA
			Std	0.97	2.82	1.71	0.54	1.11	1.86	3.42	2.41	1.81	1.22	2.71	3.19								
11	10	m	Mw	17.68	28.13	30.44	26.98	28.96	30.33*	58.80*	61.58*	62.12*	75.06*	66.33*	66.23*	Ma	3.75	48.65	28.54	66.33	249.4	-5.98	LCA
			Std	1.62	3.83	3.70	0.77	2.34	2.85	4.68	7.03	5.47	3.93	17.12	16.23								
11	11	m, reif	Mw	3.07	6.25	3.18	2.08	6.91	26.00	75.38*	7.69	8.39	6.89	3.27	18.47	Ma							LCA
			Std	3.36	3.44	4.38	4.11	3.66	20.89	71.49	4.84	8.45	6.02	0.81	24.88								

Tab. A.2-7. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach 24h Exposition an Fluoranthen. Die verschiedenen Versuche und Isolierungen (Fische) sind durchnumeriert. Innerhalb eines Versuchs wurden dieselben schadstoffhaltigen Medien verwendet.

V	F	G		C [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	8000 [nM]							U	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
8	5	m	Mw	19.36	21.40	20.82	21.26	21.31	25.08							RTG							LCA
			Std	2.85	1.20	0.90	2.97	2.08	0.84														
				C [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	2000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]								
11	11	m, reif	Mw	4.79	14.72	53.29	31.39	71.38	46.94	116.09	45.13	121.89	22.36	91.76	74.99	Ma							LCA
			Std	1.68	15.88	51.41	7.61	20.98	40.94	29.28	36.03	98.29	22.72	79.79	101.74								
11	10	m	Mw	37.50	45.34	50.50	47.15	46.49	51.91	86.12*	93.34*	94.43*	111.43*	104.42*	114.41*	Ma	2.85	69.62	45.78	107.12	237.32	-2.15	LCA
			Std	3.84	3.68	3.97	1.78	3.85	0.72	4.48	11.04	3.58	15.29	8.93	8.06								
				C [nM]	3.9 [nm]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]								
14	17	n.p.	Mw	10.59	8.67	10.27	10.80	9.68	14.37	15.54*	14.63	8.42	10.48	8.94	8.05	Ma							LCA
			Std	2.48	1.78	0.91	1.22	1.82	3.18	2.03	1.36	1.01	0.63	0.91	2.59								

Abkürzungen siehe Tab. A.2-5.

Tab. A.2-8. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach 24h Exposition an Phenanthren. Die verschiedenen Versuche und Isolierungen (Fische) sind durchnumeriert. Innerhalb eines Versuchs wurden dieselben schadstoffhaltigen Medien verwendet.

V	F	G		C [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	8000 [nM]						U	IF	IS	Min	Min	EC50	b	Meth.
8	5	m	Mw	16.64	15.73	15.82	15.84	15.56	19.31*						RTG							LCA
			Std	0.32	1.03	1.37	0.57	0.76	1.07													
				C [nM]	3.9 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	2000 [nM]	4000 [nM]								
11	10	m	Mw	40.49	45.33	45.93	50.17	43.62	47.54	46.16	62.97*	70.89*	73.95*	81.15*	88.04*	Ma	2.14	46.2	45.35	86.69	413.22	-1.44	LCA
			Std	1.36	4.44	1.93	6.01	0.60	2.51	3.68	4.04	1.66	10.01	5.18	12.64								
11	9	m, reif	Mw	20.68	23.78	19.49	22.30	24.30	26.77	35.85*	25.32	28.83	37.26	40.09	42.33	Ma							LCA
			Std	2.10	9.30	3.22	4.08	1.60	3.11	1.15	4.98	4.35	5.15	10.52	3.64								
				C [nM]	3.9 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]								
14	17	n.p.		21.69	17.56	17.38	15.84	16.87	22.03	17.99	20.31	12.19*	10.48*	12.36*	12.53*	Ma							LCA
				2.62	5.77	4.73	2.64	3.74	1.49	3.76	3.23	2.07	2.09	6.10	0.92								

V = Versuch, F = Fisch, G = Geschlecht (w = weiblich, m = männlich), C = Lösungsmittelkontrolle, U = Untergrund, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne, Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration in nM bei halber maximaler Induktion, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1, Meth. = verwendete Methode zur EROD-Messung, Mw = Mittelwert, Std = Standardabweichung, RTG = Zellinie rainbow trout liver, RTH = rainbow trout hepatoma, Ma = Matrigel, LCA = Live Cell Assay, Stop = Stop-Assay nach S.W. Kennedy

* = Signifikanter Unterschied der EROD-Aktivität zur Lösungsmittelkontrolle (One Way ANOVA, $p<0,001$)

Tab. A.2-9. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach 24h Exposition an Pyren. Die verschiedenen Versuche und Isolierungen (Fische) sind durchnumeriert. Innerhalb eines Versuchs wurden dieselben schadstoffhaltigen Medien verwendet.

V	F	G		C [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	2000 [nM]	4000 [nM]	8000 [nM]	16000 [nM]	32000 [nM]	64000 [nM]	128000 [nM]	U	IF	IS	Min	Max	EC50	b	Meth.
10	7	w, reif	Mw	17.35	21.86	21.27	22.00	30.68*	34.20*	36.02*	36.04*	32.52*	22.74	17.64	13.19	RTG	2.05	18.22	21.41	35.57	882.93	-4.67	LCA
			Std	0.38	1.33	2.39	2.24	5.24	1.03	1.78	3.27	1.57	2.02	4.20	0.78								
10	8	m, reif	Mw	9.58	8.72	7.79	7.43	9.11	7.90	50.21*	48.38*	52.35*	50.94*	50.90*	38.32*	RTG	5.06	38.94	8.26	48.52	2759.79	-78.71	LCA
			Std	0.58	2.57	2.21	0.68	0.99	2.05	2.60	2.86	5.02	5.14	1.44	3.26								
11	11	m, reif	Mw	10.02	0.08	42.94	51.79	52.18	142.73*	74.95	83.88	148.98*	136.84*	59.40	47.75	Ma							LCA
			Std	7.63	0.88	7.00	22.50	39.90	64.73	51.68	80.20	35.20	2.43	38.05	13.50								
11	10	m	Mw	24.71	37.95	53.86*	63.63*	76.56*	71.78*	106.43*	92.10*	102.36*	95.14*	69.95*	66.69*	Ma	4.12	77.31	15.38	102.02	383.98	-0.84	LCA
			Std	1.62	3.27	9.39	10.40	8.03	5.39	6.37	5.30	8.58	9.65	14.53	1.69								
				C [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.50 [nm]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	4000 [nm]	8000 [nM]								
14	17	n.p.	Mw	17.28	13.84	12.67	11.50	13.56	17.56	18.56	17.12	14.76	10.23	11.29	14.49	Ma							LCA
			Std	1.13	3.77	4.25	3.77	3.14	1.71	0.75	1.35	2.05	3.61	5.31	0.82								
												16000 [nM]	32000 [nM]	64000 [nm]	128000 [nM]								
14	17	n.p.	Mw									23.39	24.21	27.01	13.10	Ma							
			Std									2.66	5.54	16.23	0.90								

V = Versuch, F = Fisch, G = Geschlecht (w = weiblich, m = männlich), C = Lösungsmittelkontrolle, U = Untergrund, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne,
Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration in nM bei halber maximaler Induktion, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1,
Meth. = verwendete Methode zur EROD-Messung, Mw = Mittelwert,
Std = Standardabweichung, RTG = Zellinie rainbow trout liver, RTH = rainbow trout hepatoma, Ma = Matrigel, LCA = Live Cell Assay, Stop = Stop-Assay nach S.W. Kennedy
* = Signifikanter Unterschied der EROD-Aktivität zur Lösungsmittelkontrolle (One Way ANOVA, $p<0,001$)

Tab. A.3.1. EROD-Aktivität in [pmol/mg/min] in Primärhepatocyten nach 24h Exposition an 3-Methylcholanthren. Dem Kulturmedium wurden unterschiedliche Konzentrationen an Serum (S) zugesetzt. Insgesamt liegen sieben Versuchswiederholungen (V) vor.

V	S [%]		C [nM]	3.9 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	5000 [nm]	10000 [nm]
1	0	Mw	8.00	14.30	18.42	20.56	13.85	17.15	12.64	23.19	16.33	18.40	16.92	15.49
		Std	1.60	4.78	2.01	5.19	2.17	2.61	6.08	3.32	3.37	3.49	2.50	3.13
1	5	Mw	15.33	14.30	27.53	17.04	16.20	23.44	42.15	31.12	15.53	20.17	27.02	10.77
		Std	16.95	7.62	6.07	11.53	3.63	13.75	23.56	9.11	4.00	5.91	5.58	0.56
1	10	Mw	9.94	9.11	26.54	27.46	16.04	24.00	28.55	22.74	11.98	26.56	19.25	5.01
		Std	9.90	1.80	22.08	9.08	14.78	5.06	2.98	18.65	6.40	20.59	1.24	1.76
1	20	Mw	17.56	8.73	17.55	22.45	30.97	18.56	30.07	39.48	13.58	27.15	15.92	2.26
		Std	0.57	7.39	3.76	10.13	21.10	0.79	7.70	15.02	4.86	17.70	1.90	1.12

V	S [%]		C [nM]	3.9 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	5000 [nm]	10000 [nm]
2	0	Mw	12.20	12.04	28.55	19.39	9.71	25.11	54.97	65.19	152.67	65.39	138.24	51.12
		Std	6.44	3.51	18.85	5.62	7.29	8.38	63.94	47.25	139.25	4.66	105.63	11.30
2	5	Mw	12.34	18.31	23.86	28.16	23.02	48.56	48.26	90.80	64.67	103.02	50.13	41.80
		Std	3.49	9.74	4.58	13.27	4.78	21.68	8.89	36.21	1.57	107.30	21.10	8.80
2	10	Mw	20.87	21.88	32.51	36.12	32.60	53.21	67.26	93.35	127.21	241.16	9.64	14.93
		Std	9.30	15.71	4.40	22.79	6.83	12.28	22.33	11.50	73.60	155.30	2.24	6.43
2	20	Mw	6.82	20.57	15.06	27.46	18.81	61.67	72.04	49.44	107.61	20.61	72.96	12.29
		Std	1.15	18.26	3.03	13.18	4.04	29.48	85.52	10.64	25.06	38.98	19.82	17.68

V	S [%]		C [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]
3	0	Mw	41.97	66.35	67.98	60.73	58.47	37.30	29.51
		Std	6.45	5.29	15.50	27.38	10.23	11.59	12.40
3	5	Mw	81.65	106.61	125.25	85.67	130.42	162.80	138.21
		Std	6.05	7.32	17.90	80.55	27.73	20.84	19.97
3	10	Mw	86.27	99.29	116.37	132.99	113.79	117.85	120.77
		Std	11.58	9.81	14.33	12.50	9.29	10.37	12.55
3	20	Mw	85.95	93.62	87.77	104.06	104.42	92.64	80.44
		Std	2.88	12.08	10.24	8.25	14.07	20.72	8.46

Tab. A.3.1. Fortsetzung, V = Versuch, S = Serumgehalt

V	S [%]		C [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]
4	0	Mw	12.65	18.34	22.61	22.91	23.64	23.91	22.22	32.18
		Std	1.42	3.56	2.83	3.78	4.60	11.30	4.68	5.33
4	5	Mw	20.97	35.90	39.37	32.66	36.37	36.67	26.25	27.86
		Std	1.76	2.52	6.88	11.41	5.95	6.13	3.13	3.22
4	10	Mw	15.97	26.36	28.87	28.62	29.15	32.11	20.12	26.21
		Std	3.83	3.15	3.41	7.91	3.92	8.39	5.39	6.26

V	S [%]		C [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]
5	0	Mw	12.02	21.97	21.91	24.01	29.38	21.58	13.07	9.49
		Std	6.07	1.23	9.71	8.45	1.46	8.49	6.88	3.37
5	5	Mw	35.26	39.93	40.99	33.92	59.52	61.85	37.95	29.43
		Std	5.18	11.76	8.87	3.69	1.26	8.15	3.02	11.21
5	10	Mw	36.15	32.19	36.77	43.83	48.91	65.14	43.67	43.44
		Std	4.50	4.45	20.68	12.17	16.16	11.02	12.82	7.59
5	20	Mw	34.69	30.93	52.23	46.78	59.61	53.79	29.42	23.24
		Std	1.13	5.56	1.07	9.69	6.19	7.31	9.73	6.48

V	S [%]		C [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]
6	0	Mw	14.21	29.15	31.39	39.12	48.19	49.39	44.71
		Std	0.85	4.59	3.22	3.45	3.76	7.02	3.56
6	5	Mw	9.94	33.85	41.84	54.90	65.84	71.58	72.18
		Std	4.30	3.95	7.95	7.83	10.51	16.09	11.96
6	10	Mw	8.62	17.78	35.74	51.11	65.35	72.99	79.31
		Std	2.52	2.84	3.54	10.47	6.37	6.11	5.75

Tab. A.3.1. Fortsetzung

V	S [%]		C [nM]	1.95 [nM]	3.90 [nM]	7.81 [nM]	15.62 [nM]	31.25 [nM]	62.5 [nM]	125 [nM]	250 [nM]	500 [nM]	1000 [nM]	2000 [nM]	4000 [nM]	IF	IS	Min	Max	EC50	b
7	0	Mw	29.78	29.40	26.30	27.58	32.48	33.36	46.54	57.61	68.79	84.83	77.66	60.50	55.27	2.64	51.81	27.72	83.23	107.48	-1.54
		Std	3.46	1.58	3.23	3.56	1.51	3.89	4.43	6.56	10.41	9.18	2.82	1.74	4.43						
7	5	Mw	38.31	46.73	41.10	43.24	49.71	52.61	66.18	90.34	107.08	104.46	99.29	78.38	53.07	2.43	61.27	45.20	104.22	76.15	-2.59
		Std	2.89	1.58	1.62	4.15	2.41	0.58	2.23	10.69	2.36	10.59	9.60	12.32	4.66						
7	10	Mw	31.44	32.02	30.25	30.84	38.89	52.03	60.27	94.59	111.38	127.67	125.64	109.87	81.90	2.96	80.84	32.36	121.99	82.26	-1.86
		Std	0.71	1.10	3.31	2.80	3.05	2.28	6.60	0.69	6.31	7.36	15.15	7.62	10.29						
7	20	Mw	38.24	38.92	37.66	39.91	44.34	51.72	71.70	66.21	71.77	72.25	86.95	65.02	39.73	2.10	38.41	38.92	73.19	34.20	-2.77
		Std	3.83	3.31	3.10	5.26	5.26	4.38	9.24	5.32	10.32	11.71	5.54	1.98	7.69						

V = Versuch, S = Serumgehalt, C = Lösungsmittelkontrolle, IF = Induktionsfaktor, IS = Induktionsspanne, Min = Minimum, Max = Maximum, EC50 = Konzentration bei halbem maximalem Effekt, b = Steigungsparameter der Funktion 4.1, Mw = Mittelwert, Std = Standardabweichung

Tab. A3.2. Ergebnisse (Signifikanzniveau p) aus der mehrfaktoriellen Varianzanalyse zum Einfluß von Serum auf die Induktion. Es wurde getestet, ob das Serum überhaupt einen Einfluß auf die Induktion hat (0 gegen 5%) und ob der Serumgehalt (zwischen 5, 10 und 20%) einen Einfluß auf die Induktion hat.

Versuch	p Einfluß Serum	p Einfluß Serumgehalt
1	0.136	
2	0.086	
3	<0.001	<0.001
4	<0.001	<0.001
5	<0.001	0.66
6	<0.001	0.282
7	<0.001	<0.001

Partielle Ableitungen von x nach den Funktionsparametern min, max, EC50, b und f. Ausgangsfunktion ist die Funktion 5.3 (auch Umkehrfunktion der Funktion 4.1) aus Kapitel 5.1.4.

$$x(\min, \max, EC50, b, f) = EC50\left(\frac{\max - \min}{f - \min} - 1\right)^{\frac{1}{b}} \qquad 5.3$$

Ableitungen nach min, max, EC50, b und f:

nach min: $$\frac{\partial x}{\partial \min} = \frac{EC50}{b}\left(\frac{\max - \min}{f - \min} - 1\right)^{\frac{1-b}{b}}\left(\frac{\max - \min}{f - \min} - 1\right)\cdot\left(\frac{1}{f - \min}\right) \qquad A.4.1$$

nach max: $$\frac{\partial x}{\partial \max} = \frac{EC50}{b}\left(\frac{\max - \min}{f - \min} - 1\right)^{\frac{1-b}{b}}\cdot\frac{1}{f - \min} \qquad A.4.2$$

nach EC50: $$\frac{\partial x}{\partial EC50} = \left(\frac{\max - \min}{f - \min} - 1\right)^{\frac{1}{b}} \qquad A.4.3$$

nach b: $$\frac{\partial x}{\partial b} = -\frac{EC50}{b^2}\left(\frac{\max - \min}{f - \min} - 1\right)^{\frac{1}{b}}\ln\left(\frac{\max - \min}{f - \min} - 1\right) \qquad A.4.4$$

nach f: $$\frac{\partial x}{\partial f} = -\frac{EC50}{b}\left(\frac{\max - \min}{f - \min} - 1\right)^{\frac{1-b}{b}}\left(\frac{\max - \min}{f - \min}\right)\cdot\frac{1}{f - \min} \qquad A.4.5$$

Danksagung

Folgenden Personen, die alle zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. H.-J. Ferenz (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Zoologie) für die Übernahme der Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Schüürmann (Sektionsleiter der Chemischen Ökotoxikologie, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH) für die Ermöglichung der Durchführung der Arbeit am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH.

Herrn PD Dr. H. Segner (Abteilungsleiter der Aquatischen Ökotoxikologie, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH) für die Betreuung der Arbeit, für die immer gewährte Diskussionsbereitschaft, für die Unterstützung jeglicher Art und für die Gewährung der nötigen Freiräume.

Herrn PD Dr. Th. Braunbeck (Institut für Zoologie 1, Karl-Ruprechts-Universität Heidelberg) für die Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Zoologie und für die gute Zusammenarbeit im Projekt.

Herrn Dr. R. Altenburger für die Einführung in die Theorie der Kombinationswirkung.

Stefan Scholz (TU Dresden, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften) für die Einführung in die Methode der Primärzellkultur.

Herrn Dr. N.C. Bols (Universität von Waterloo, Institut für Biologie) für die Möglichkeit, mit der Zellinie RTL-W1 zu arbeiten.

Kristin Schirmer (Universität von Waterloo, Institut für Biologie) für die gute Zusammenarbeit und für die Möglichkeit, bisher unveröffentlichte Daten zu zitieren.

Herrn Dr. S.-W. Kennedy (Wildlife Research Institute, Hull) für die Arbeitsmöglichkeit am Wildlife Research Institut und hilfreiche Diskussionen.

Herrn Dr. K.-W. Schramm für die Möglichkeit, die Extrakte an der GSF-München herzustellen.

Anja Markmann für die Einführung in die Methode der Extraktgewinnung.

Herrn Uwe Dietze für die Hilfe bei der Beantwortung statistischer Fragen.

Frau Dr. I. Behn (Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften) für die Betreuung des monoklonalen Antikörpers.

Frau I. Christmann und I. Ränker für die Einführung in die Zellkulturtechniken und die Hilfe im Labor.

Meiner gesamten Arbeitsgruppe für das angenehme Klima während der Doktorarbeit und das gemeinsame Arbeiten im Labor „mit Baumaßnahmen".

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Finanzierung des Projektes Biotransformation (Fördernummer 07OTX25) innerhalb des Projektes Valimar.

Allen Projektteilnehmern von Valimar für die angenehmen Probennahmen und anregenden Diskussionen.

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Chemische Ökotoxikologie
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig
Telefon 0341/235-2309
Telefax 0341/235-2401