

4 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, die zonale Zellproliferation in der Leber unbehandelter Mäuse zweier unterschiedlich tumoranfälliger Mäusestämme zu untersuchen, sowie den Einfluß dreier nicht-genotoxischer Substanzen (Phenobarbital, Chloroform und Wyeth 14,643) auf die Zellteilungsrate zu ermitteln und zu bewerten. Zuvor sollte die optimale Verweildauer einer osmotischen Minipumpe zur immunhistologischen Ermittlung des S-Phasen-Response in der Leber von Mäusen etabliert werden. Das vorliegende Material stammt aus Studien der Abteilung Toxikologie der BASF-AG.

Der S-Phasen-Response wurde für beide Stämme zu drei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Es wurde in 3 verschiedenen Zonen ausgewertet, um etwaige zonale Unterschiede sowohl in der unbehandelten Leber als auch als substanzbedingte Veränderungen detektieren zu können. Zusätzlich wurde, ebenfalls zonal, die Mitose- und Apoptoserate bestimmt. Die Mitoserate wurde untersucht, um die Messung des S-Phasen-Response zu validieren. Bei der Apoptose, dem für die Nettoproliferation wesentlichen Gegenspieler der Zellteilung, interessierte der Einfluß der verschiedenen Substanzen auf die Apoptoserate.

Die Einzeltierdaten befinden sich im Anhang in den Tabellen 22-105.

4.1 Pumpenzeiten

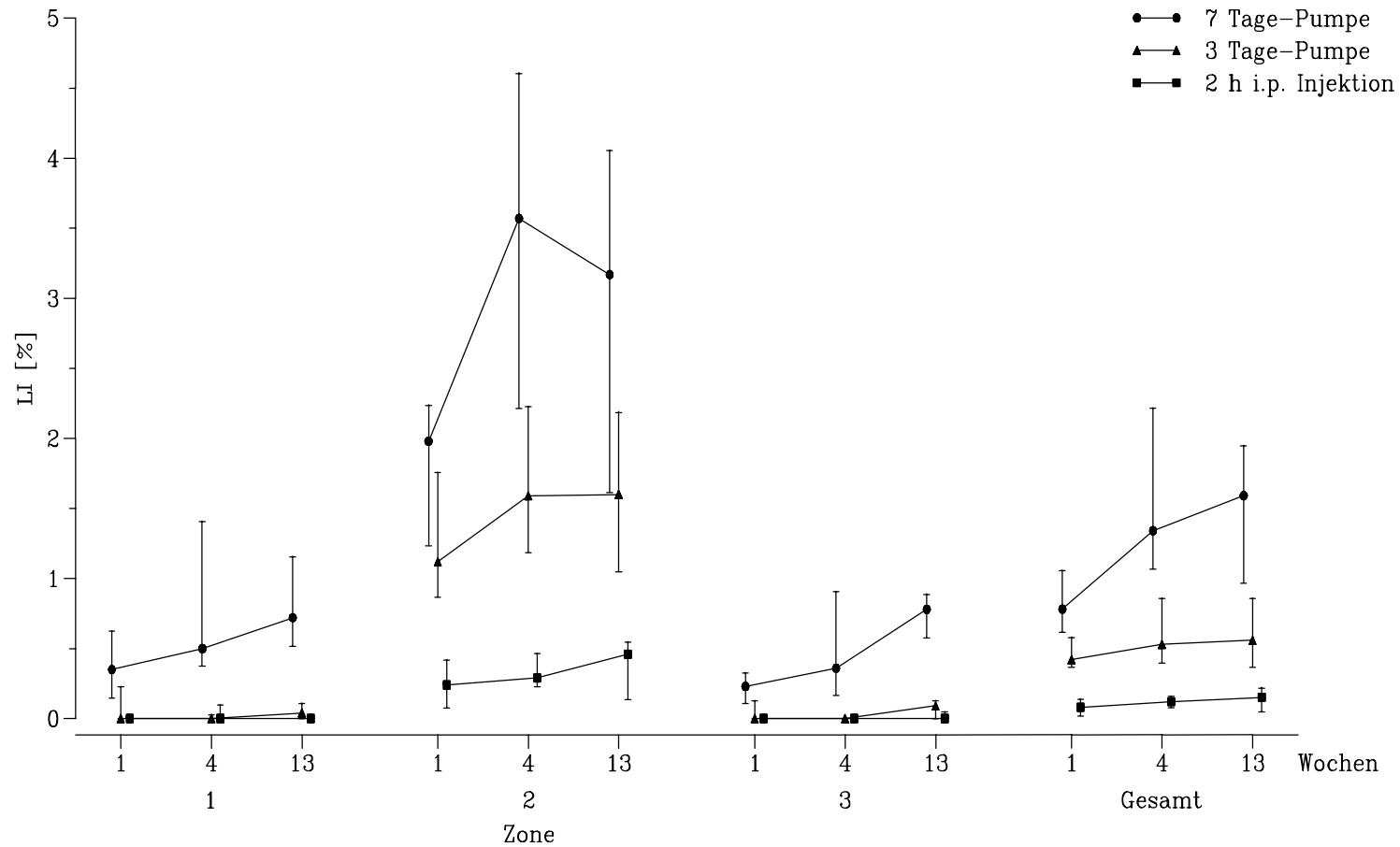
Um die am besten geeignete Methode für die Detektion sich teilender Zellen in der Leber zu evaluieren, wurden je Mäusestamm 90 männliche Tiere (zu Versuchsbeginn 10 Wochen alt) eingesetzt. Die Tiere erhielten über die gesamte Versuchsdauer das BASF AG-übliche Diätfuttermittel. Zur Ermittlung des S-Phasen-Response wurden je 10 Tieren 7 Tage (Kontrollgruppe 3) bzw. 3 Tage (Kontrollgruppe 2) vor der Tötung eine mit BrdU gefüllte osmotische Minipumpe subcutan implantiert, die letzte Gruppe erhielt eine intraperitoneale BrdU-Injektion 2 Stunden vor der Tötung (Kontrollgruppe 1).

4.1.1 B6C3F1 Maus

4.1.1.1 Makroskopische und histologische Befunde

Die Tiere zeigten weder makroskopisch noch histologisch Leberveränderungen.

4.1.1.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, h = Stunde, i. p. = intraperitoneal, Wochen = Versuchsdauer, 7 Tage-Pumpe = BrdU-Applikation via osmotischer Minipumpe über 7 Tage (Kontrolle 3), 3 Tage-Pumpe = BrdU-Applikation via osmotischer Minipumpe über 3 Tage (Kontrolle 2), 2 h i. p. Injektion = intraperitoneale Applikation von BrdU 2 h vor der Tötung (Kontrolle 1)

Abb. 1: Labelingindizes (%) (Mediane sowie 1. und 3. Quartil) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der B6C3F1 Maus nach unterschiedlich langer BrdU-Applikation

Woche	1	4	13
Zone 1	** °	** °°	** °°
Zone 2	**	**	**
Zone 3	**	** °°	** °°
Gesamt	**	**	** °

Signifikanzen zu Abb. 1:

** statistisch signifikante Unterschiede der Kontrollgruppe 1 gegenüber der Kontrollgruppe 3
 °° und ° statistisch signifikante Unterschiede der Kontrollgruppe 2 gegenüber der Kontrollgruppe 3
 mit ** und °° = $p \leq 0,01$; ° = $p \leq 0,05$ (Kruskall-Wallis-Test)

In Zone 2 fanden sich bei allen 3 Kontrollgruppen zu allen Zeitpunkten die höchsten LI, wobei die Kontrollgruppe 3 (7 Tage-Pumpe) die höchsten Werte aufwies. Die Werte der Kontrollgruppe 1 (2 h vor der Tötung i. p. Injektion) waren zu allen 3 Zeitpunkten und in allen 3 Zonen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe 3 erniedrigt.

Im zeitlichen Verlauf kam es in der Kontrollgruppe 3 in den Zonen 1, 3 und bei der nicht-zonalen Messung (Gesamt) zu einer kontinuierlichen Zunahme der LI-Werte. In der Zone 2 wurde das Maximum nach 4 Wochen erreicht (3,57 %). Die Kontrollgruppen 1 (2 h intra-peritoneale Injektion) und 2 (3 Tage-Pumpe) zeigten ebenfalls eine Zunahme des LI in der Zone 2, die übrigen Zonen konnten aufgrund der niedrigen Werte im zeitlichen Verlauf nicht beurteilt werden.

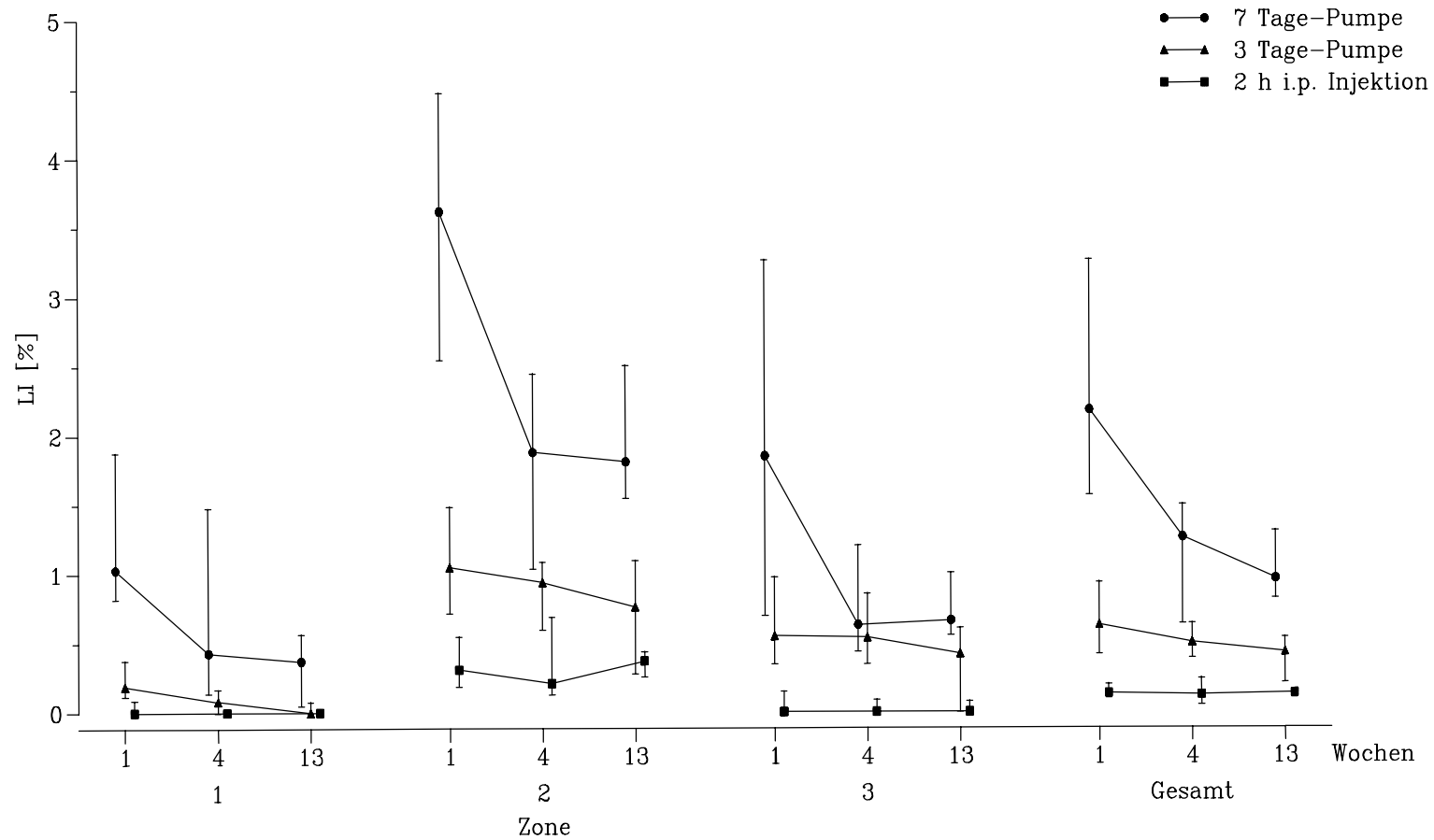
4.1.2 C57BL Maus

4.1.2.1 Makroskopische und histologische Befunde

Alle Lebern waren makroskopisch ohne besonderen Befund.

Ein Tier aus der Kontrollgruppe 3 (7 Tage-Pumpe) wies eine einzelne herdförmige Nekrose (5 Zellen) mit gemischtzelliger Infiltration auf. Die übrigen Lebern wiesen keine histologischen Veränderungen auf.

4.1.2.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, h = Stunde, i. p. = intraperitoneal, Wochen = Versuchsdauer, 7 Tage-Pumpe = BrdU-Applikation via osmotischer Minipumpe über 7 Tage (Kontrolle 3), 3 Tage-Pumpe = BrdU-Applikation via osmotischer Minipumpe über 3 Tage (Kontrolle 2), 2 h i. p. Injektion = intraperitoneale Applikation von BrdU 2 h vor der Tötung (Kontrolle 1)

Abb. 2: LI (%) (Mediane sowie 1. und 3. Quartil) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der C57BL Maus nach unterschiedlich langer BrdU-Applikation

Woche	1	4	13
Zone 1	** °°	** °	** °°
Zone 2	** °	**	** °°
Zone 3	**	**	**
Gesamt	** °	**	** °°

Signifikanzen zu Abb. 2:

** statistisch signifikante Unterschiede der Kontrollgruppe 1 gegenüber der Kontrollgruppe 3
 °° und ° statistisch signifikante Unterschiede der Kontrollgruppe 2 gegenüber der Kontrollgruppe 3
 mit ** und °° = $p \leq 0,01$; ° = $p \leq 0,05$ (Kruskall-Wallis-Test)

Bei allen 3 Kontrollgruppen wies die Zone 2 zu jedem Zeitpunkt die höchsten Werte auf. Die LI der Kontrollgruppe 1 (7 Tage-Pumpe) waren in jeder Zone und zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant erniedrigt gegenüber den LI der Kontrollgruppe 3 (2 h vor der Tötung i. p. Injektion). Die Kontrollgruppe 2 (3 Tage-Pumpe) zeigte statistisch signifikant erniedrigte Werte gegenüber der Kontrollgruppe 3 zu allen Zeitpunkten in Zone 1, in Zone 2 nach 1 und 13 Wochen und in Zone 3 zu keinem Zeitpunkt.

Alle Tiere wiesen nach 1 Woche in allen 3 Zonen und im Gesamt-LI die höchsten Werte auf. Zu den späteren Versuchszeitpunkten (4 und 13 Wochen) fiel ein kontinuierlicher Abfall der LI auf.

4.2 Phenobarbital

Je Mäusestamm erhielten 30 Tiere 500 ppm Phenobarbital für 1, 4 oder 13 Wochen (10 Tiere pro Gruppe) über das Futter. Allen Tieren wurde 7 Tage vor der Tötung eine mit BrdU gefüllte osmotische Minipumpe subcutan implantiert. Die Kontrollgruppe 3 aus der Studie der verschiedenen Pumpenzeiten (s. 4.1) diente jeweils als Kontrolle.

4.2.1 B6C3F1 Maus

Tab. 10: Körper- und Lebergewichte der B6C3F1 Maus nach Phenobarbitalbehandlung

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Pb	Kontrolle	Pb	Kontrolle	Pb
1 Wo (n = 10)	25,60±1,70	26,66±0,93	1,12±0,19	1,53±0,10**	4,35±0,53	5,73±0,26**
4 Wo (n = 10)	27,58±0,84	28,00±1,43	1,28±0,08	1,58±0,21**	4,64±0,21	5,64±0,58**
13 Wo (n = 9)	30,66±1,53	30,90±2,01	1,34±0,11	1,61±0,15**	4,35±0,19	5,21±0,33**

** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Pb = Phenobarbital

Sowohl die absoluten als auch die relativen Lebergewichte waren unter Phenobarbitalbehandlung zu allen Zeitpunkten um 19,8 % bis 36,6 % statistisch signifikant erhöht, wobei das Maximum nach 1 Woche zu finden war. Das Körpergewicht war zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle verändert.

4.2.1.1 Makroskopische und histologische Befunde

Makroskopie:

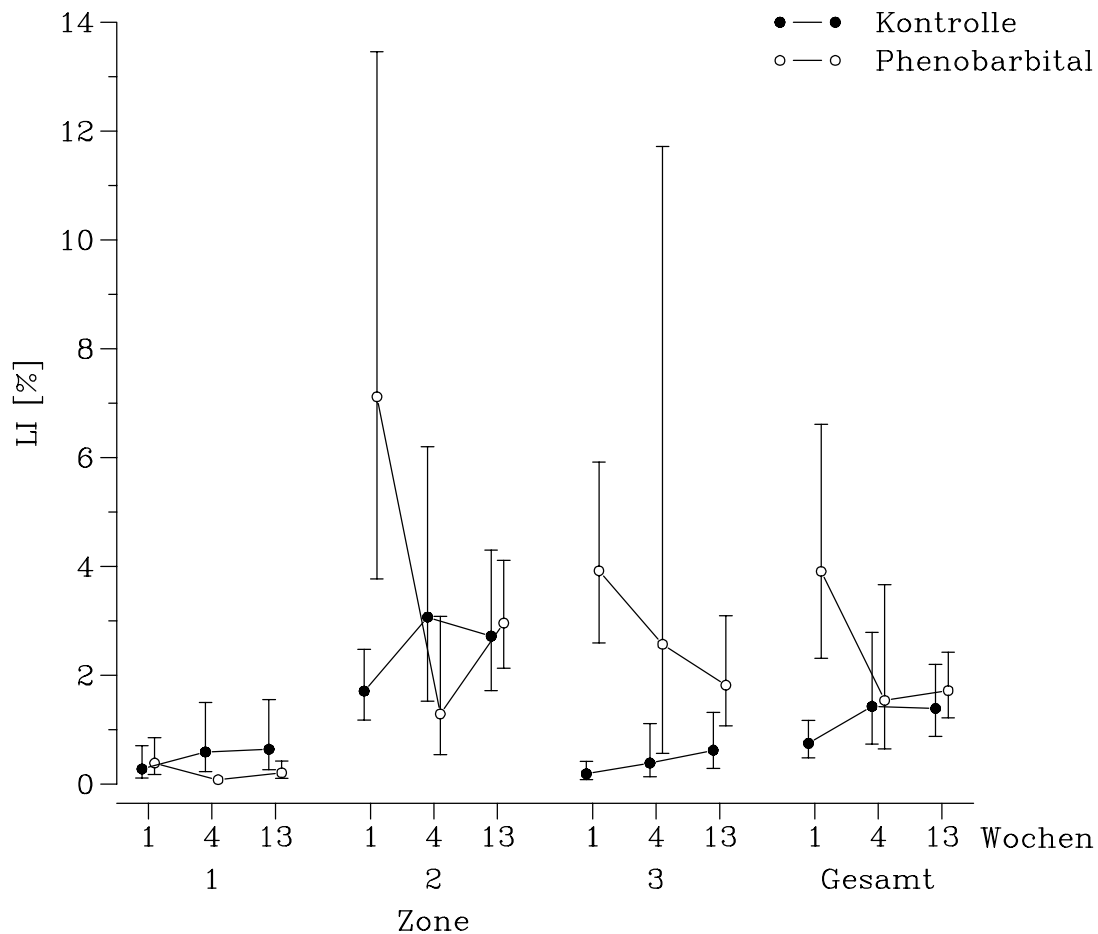
Nach 1 Woche waren die Lebern der mit Phenobarbital behandelten Tiere ohne besonderen Befund. Nach 4 und 13 Wochen waren je 4 Lebern geringgradig vergrößert. Ein Tier aus der 13 Wochen-Gruppe war verstorben und wurde von der Befundung ausgeschlossen.

Histopathologie:

In 9 Lebern fiel nach 1 Woche eine deutliche, in 1 Leber eine geringgradige Hypertrophie und vermehrte Eosinophilie der Hepatozyten in Zone 3 auf.

Nach 4 und 13 Wochen war jeweils noch bei 8 Tieren eine deutliche, bei den restlichen eine geringgradige oder keine Hypertrophie mehr zu sehen.

4.2.1.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 3: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der B6C3F1 Maus nach Verabreichung von Phenobarbital

Woche	1	4	13
Zone 1		**	**
Zone 2	**	*	
Zone 3	**	**	**
Gesamt	**		

Signifikanzen zu Abb. 3:

** und * statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ und * = $p \leq 0,05$ (Dunnett-Test)

Die LI in Zone 1 waren nach 1 Woche gegenüber den Kontrollen nicht statistisch signifikant verändert, nach 4 und 13 Wochen waren sie jedoch signifikant um das 7,4- und 3-fache erniedrigt. Die LI der Zonen 2 und 3 sowie der Gesamt-LI waren nach 1-wöchiger Behandlung alle statistisch signifikant erhöht, wobei das Maximum mit einer 20,6-fachen Steigerung in Zone 3 lag. Dort fanden sich auch nach 4 und 13 Wochen noch signifikant

höhere Werte als in der Kontrollgruppe (6,6- und 3-fach). In Zone 2 war der LI nach 4 Wochen signifikant um das 2,4-fache verringert. Der LI zum Zeitpunkt von 13 Wochen sowie der Gesamt-LI nach 4 und 13 Wochen waren gegenüber der Kontrolle nicht statistisch signifikant verändert.

4.2.1.3 Mitose und Apoptose

Tab. 11: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der B6C3F1 Maus nach Phenobarbitalgaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Pb	0,00	0,00	0,33**	0,00	0,00	0,00	0,13**	0,00
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Pb	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	Pb	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00

** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Pb = Phenobarbital

Das Maximum der Mitoserate lag zu allen Zeitpunkten sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den behandelten Tieren in Zone 2 (zwischen 0,09 % und 0,33 %). Signifikant erhöhte Mitoseraten fanden sich nur nach 1-wöchiger Applikation in Zone 2 (3,7-fach) und in der Gesamt-Mitoserate (4,3-fach). Die Mediane der Apoptoserate waren sowohl in der Kontrolle als auch bei den behandelten Tieren gleich 0.

4.2.2 C57BL Maus

Tab. 12: Körper- und Lebergewichte der C57BL Maus nach Phenobarbitalbehandlung

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Pb	Kontrolle	Pb	Kontrolle	Pb
1 Wo (n = 10)	25,32±1,05	24,57±2,32	1,21±0,15	1,35±0,21	4,76±0,47	5,47±0,56*
4 Wo (n = 10)	24,98±1,96	24,07±2,18	1,05±0,21	1,21±0,31	4,18±0,70	4,98±1,00
13 Wo (n = 10)	28,19±1,28	26,39±1,04**	1,16±0,09	1,29±0,08**	4,13±0,27	4,89±0,27**

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Pb = Phenobarbital

Die Körpergewichte der 13 Wochen-Behandlungs-Gruppe waren um 6,4 % statistisch signifikant verringert, das absolute Lebergewicht dagegen um 11,2 % statistisch signifikant erhöht. Das relative Lebergewicht war nach 1 und 13 Wochen um 14,9 % und 18,4 % statistisch signifikant erhöht.

4.2.2.1 Makroskopische und histologische Befunde

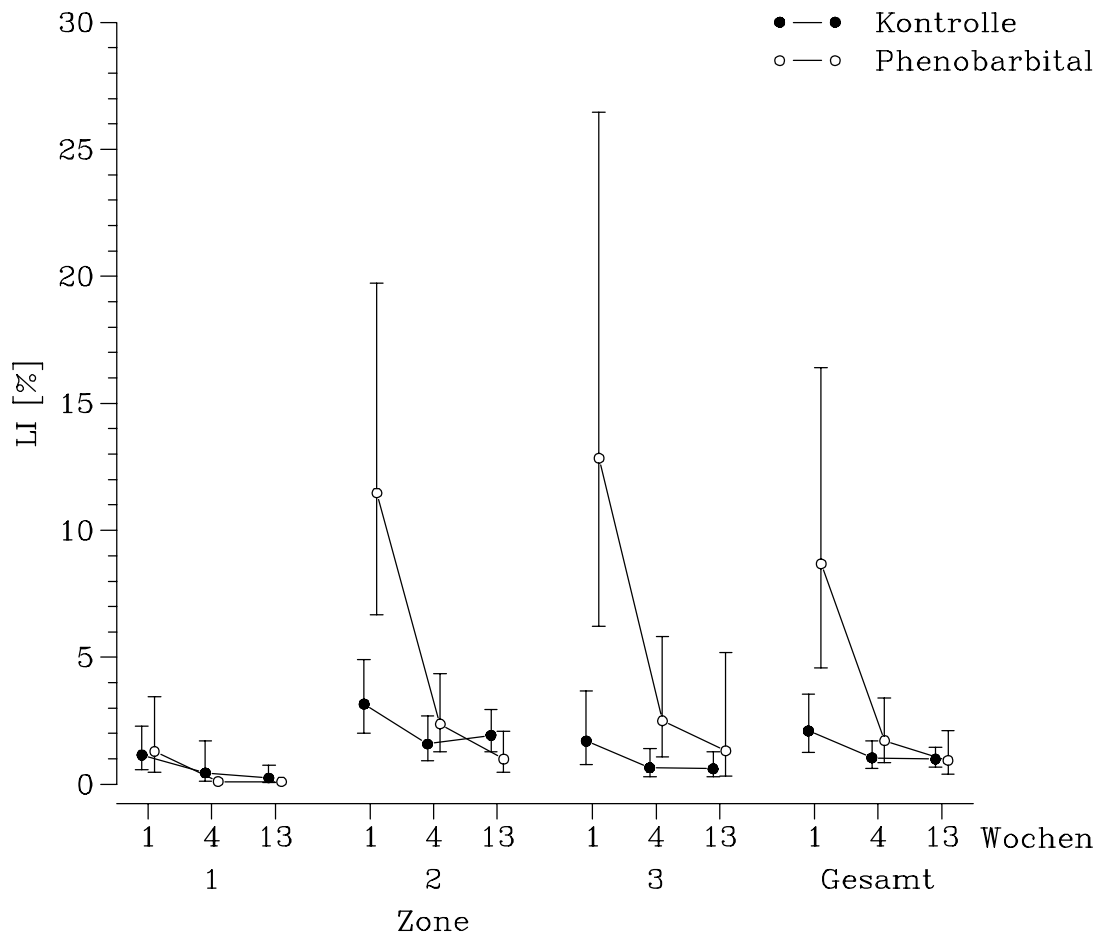
Makroskopie:

Nach 1 Woche wies ein mit Phenobarbital behandeltes Tier eine hochgradig vergrößerte Leber auf, die restlichen Tiere waren ohne besonderen Befund. Alle Tiere der 4 und der 13 Wochen-Gruppe waren ohne besonderen Befund.

Histopathologie:

3 Tiere wiesen eine deutliche, 7 Tiere eine geringgradige Hypertrophie der in Zone 3 gelegenen Hepatozyten nach 1 Woche auf. Nach 4 Wochen waren die Zellen der Zone 3 bei einem Tier geringgradig, bei den restlichen 9 Tieren deutlich hypertroph. Nach 13 Wochen zeigte die Hälfte der Tiere eine deutliche, die andere Hälfte eine geringgradige Hypertrophie der Hepatozyten in Zone 3.

4.2.2.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 4: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der C57BL Maus nach Verabreichung von Phenobarbital

Woche	1	4	13
Zone 1		**	*
Zone 2	**		*
Zone 3	**	*	
Gesamt	**		

Signifikanzen zu Abb. 4:

** und * statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ und * = $p \leq 0,05$ (Dunnett-Test)

In Zone 1 lagen die LI nach 1 Woche auf Kontrollniveau, zu den späteren Zeitpunkten waren sie signifikant 4,1- und 2,5-fach gegenüber der Kontrolle verringert. Die LI in den Zonen 2 und 3 und der Gesamt-LI waren nach 1 Woche statistisch signifikant erhöht mit einem maximalen Anstieg (7,6-fach) in Zone 3. In der Zone 2 war der LI nach 4 Wochen, der Gesamt-LI war nach 4 und 13 Wochen nicht signifikant gegenüber der Kontrolle verändert.

Nach 13 Wochen lagen die Werte in Zone 2 sogar 1,9-fach unter den Kontrolltieren. In Zone 3 war der LI nach 4 Wochen noch 3,8-fach gegenüber der Kontrolle erhöht, zum Zeitpunkt von 13 Wochen fanden sich keine signifikante Unterschiede.

4.2.2.3 Mitose und Apoptose

Tab. 13: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der C57BL Maus nach Phenobarbitalgaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,19	0,02
	Pb	0,00	0,00	0,70	0,00	0,19**	0,00	0,28	0,00
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
	Pb	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
	Pb	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Pb = Phenobarbital

Die höchsten MI der Kontrolltiere fanden sich in Zone 2 mit einem Peak nach 1 Woche (0,52 %) und dem niedrigsten Wert zum Zeitpunkt von 4 Wochen (0,05 %). In den Zonen 1 und 3 waren die Mediane der MI gleich 0.

Die behandelten Tiere wiesen ebenfalls die höchsten MI nach 1 und 4 Wochen in Zone 2 auf, wobei sie geringgradig, jedoch nicht signifikant, über den Kontrollwerten lagen (1,3- und 2,8-fach). In der Zone 3 war die Mitoserate nach 1 Woche signifikant erhöht. Nach 13 Wochen waren in allen Zonen der behandelten Tiere die Mediane gleich 0.

Die Apoptoserate war bei allen Tieren bis auf die Gesamt-Apoptoserate zum 1 Wochen-Zeitpunkt der Kontrolltiere (0,02 %) gleich 0.

4.3 Chloroform

Der C57BL Maus wurde zu Beginn der Studie 5 x wöchentlich 238 mg Chloroform/kg Körpergewicht per Schlundsonde verabreicht. Da mehrere Tiere ein reduziertes Allgemein-

befinden zeigten und 5 Tiere verstarben, wurde die Dosierung auf 120 mg/kg Körpergewicht ab dem 9. Studientag reduziert. Da die Studie mit der B6C3F1 Maus zeitlich versetzt zur C57BL Maus stattfand, erhielten die B6C3F1 Mäuse von Beginn an die reduzierte Dosis von 120 mg/kg. Den Tieren wurde jeweils 7 Tage vor der Tötung eine osmotische Minipumpe implantiert. Der Applikationszeitraum betrug auch hier 1, 4 und 13 Wochen.

Die Kontrollgruppe 3 aus der Studie der verschiedenen Pumpenzeiten (s. 4.1) diente jeweils als Kontrolle.

4.3.1 B6C3F1 Maus

Tab. 14: Körper- und Lebergewichte der B6C3F1 Maus nach Chloroformbehandlung

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Chlo	Kontrolle	Chlo	Kontrolle	Chlo
1 Wo (n = 10)	25,60±1,70	25,16±1,18	1,12±0,19	1,18±0,11	4,35±0,53	4,69±0,26
4 Wo (n = 10)	27,58±0,84	26,96±0,71	1,28±0,08	1,43±0,07**	4,64±0,21	5,29±0,21**
13 Wo (n = 10)	30,66±1,53	29,23±1,39*	1,34±0,11	1,55±0,15**	4,35±0,19	5,30±0,36**

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Chlo = Chloroform

Bei den Tieren der 4 und 13 Wochen-Gruppen waren sowohl die absoluten als auch die relativen Lebergewichte zwischen 11,7 % und 21,6 % statistisch signifikant erhöht. Bei Tieren, die 13 Wochen behandelt wurden, war das Körpergewicht um 4,7 % statistisch signifikant verringert.

4.3.1.1 Makroskopische und histologische Befunde

Makroskopie:

Nach 1 und 4 Wochen waren die Lebern ohne besonderen Befund. Sechs Lebern der 13 Wochen-Gruppe waren ebenfalls unverändert, die restlichen 4 Tiere wiesen geringgradig vergrößerte Lebern auf.

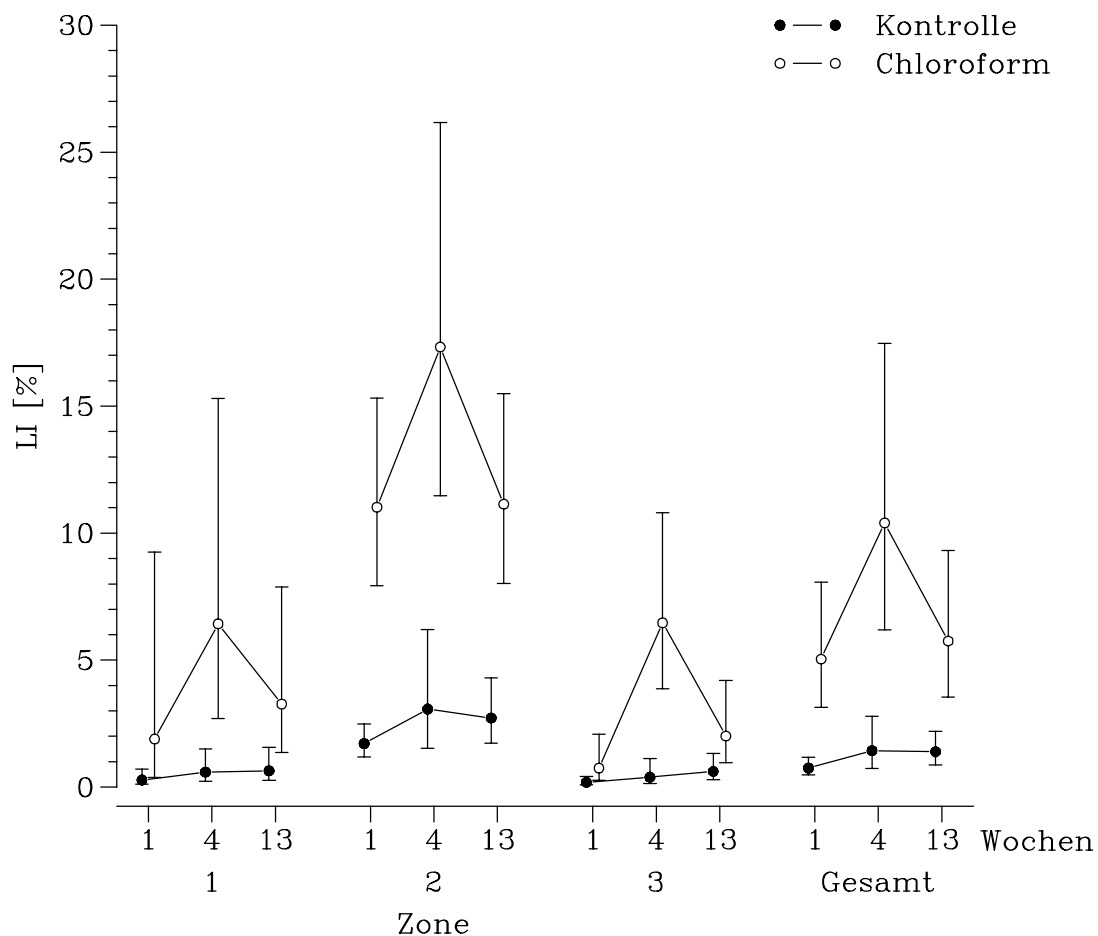
Histopathologie:

Nach 1 Woche wiesen 4 Lebern eine geringgradige gemischttröpfige Verfettung der Zone 2 auf. Nach 4 Wochen zeigte eine Leber eine geringgradige gemischttröpfige Verfettung in Zone 2, die übrigen Lebern waren ohne besonderen Befund. Bei 6 Tieren der 13 Wochen-Gruppe erschien das Zytoplasma der Hepatozyten in Zone 3 helleosinophil, und die

Zellgrenzen waren nur undeutlich zu erkennen. Es fanden sich einige Einzelzellnekrosen und 2 Tiere wiesen eine gering- bis mittelgradige Gallenpigmentspeicherung auf. Bei einem Tier fanden sich subcapsulär gelegene multiple Verkalkungsherde. 5 Lebern wiesen eine geringgradige gemischttröpfige Verfettung der Zonen 2 und 3 auf.

Die Lebern der übrigen Tiere waren ohne besonderen Befund.

4.3.1.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 5: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der B6C3F1 Maus nach Verabreichung von Chloroform

Woche	1	4	13
Zone 1	**	**	**
Zone 2	**	**	**
Zone 3	**	**	**
Gesamt	**	**	**

Signifikanzen zu Abb. .5

** statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit $** = p \leq 0,01$ (Dunnett-Test)

In allen Zonen war der LI zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht, wobei in allen Zonen dasselbe Muster auftrat: es fand sich das Maximum nach 4-wöchiger Behandlung, wobei die Zone 3 den relativ höchsten Anstieg aufwies (16,6-fach). Der absolut höchste Wert war in Zone 2 zu finden (17,33 %). Die LI zum Zeitpunkt von 1 und 13 Wochen befanden sich in allen Zonen und im Gesamt-LI auf nahezu einem Niveau und lagen zwischen 3,9- und 10,9-fach über den Kontrollwerten.

4.3.1.3 Mitose und Apoptose

Tab. 15: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der B6C3F1 Maus nach Chloroformgaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Chlo	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Chlo	0,00	0,00	0,55**	0,00	0,11**	0,00	0,24**	0,00
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	Chlo	0,00	0,00	0,23	0,12*	0,00	0,00	0,08	0,04*

* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Chlo = Chloroform

Nach 1 Woche war die Mitoserate in Zone 2 als einzige Zone geringgradig, aber nicht signifikant erhöht. Zum Zeitpunkt von 4 Wochen fand sich eine signifikante 5-fache Steigerung in Zone 2 und in Zone 3 betrug der MI 0,11 % im Vergleich zu 0 % bei den Kontrolltieren. Der Gesamtmitoseindex (Gesamt-MI) war signifikant um das 8-fache erhöht. Nach 13 Wochen war nur noch in Zone 2 der MI geringgradig, aber nicht statistisch signifikant erhöht.

Apoptosen traten vermehrt nur in Zone 2 nach 13 Wochen auf. Dadurch war auch der Gesamtapoptoseindex (Gesamt-AI) zu diesem Zeitpunkt statistisch signifikant erhöht.

4.3.2 C57BL Maus

Tab. 16: Körper- und Lebergewichte der C57BL Maus nach Chloroformbehandlung

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Chlo	Kontrolle	Chlo	Kontrolle	Chlo
1 Wo (n = 9)	25,32 \pm 1,05	22,89 \pm 1,29**	1,21 \pm 0,15	1,13 \pm 0,14	4,76 \pm 0,47	4,92 \pm 0,42
4 Wo (n = 7)	24,98 \pm 1,96	24,71 \pm 1,16	1,05 \pm 0,21	1,32 \pm 0,14**	4,18 \pm 0,70	5,35 \pm 0,48**
13 Wo (n = 5)	28,19 \pm 1,28	25,50 \pm 1,41**	1,16 \pm 0,09	1,22 \pm 0,14	4,13 \pm 0,27	4,76 \pm 0,38**

** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Chlo = Chloroform

Das Körpergewicht war nach 1 und 13 Wochen statistisch signifikant um 9,6 % und 9,5 % verringert. Das absolute Lebergewicht war nach 4 Wochen um 25,7 %, das relative Lebergewicht nach 4 und 13 Wochen um 28 % bzw. 15,3 % statistisch signifikant erhöht.

4.3.2.1 Makroskopische und histologische Befunde

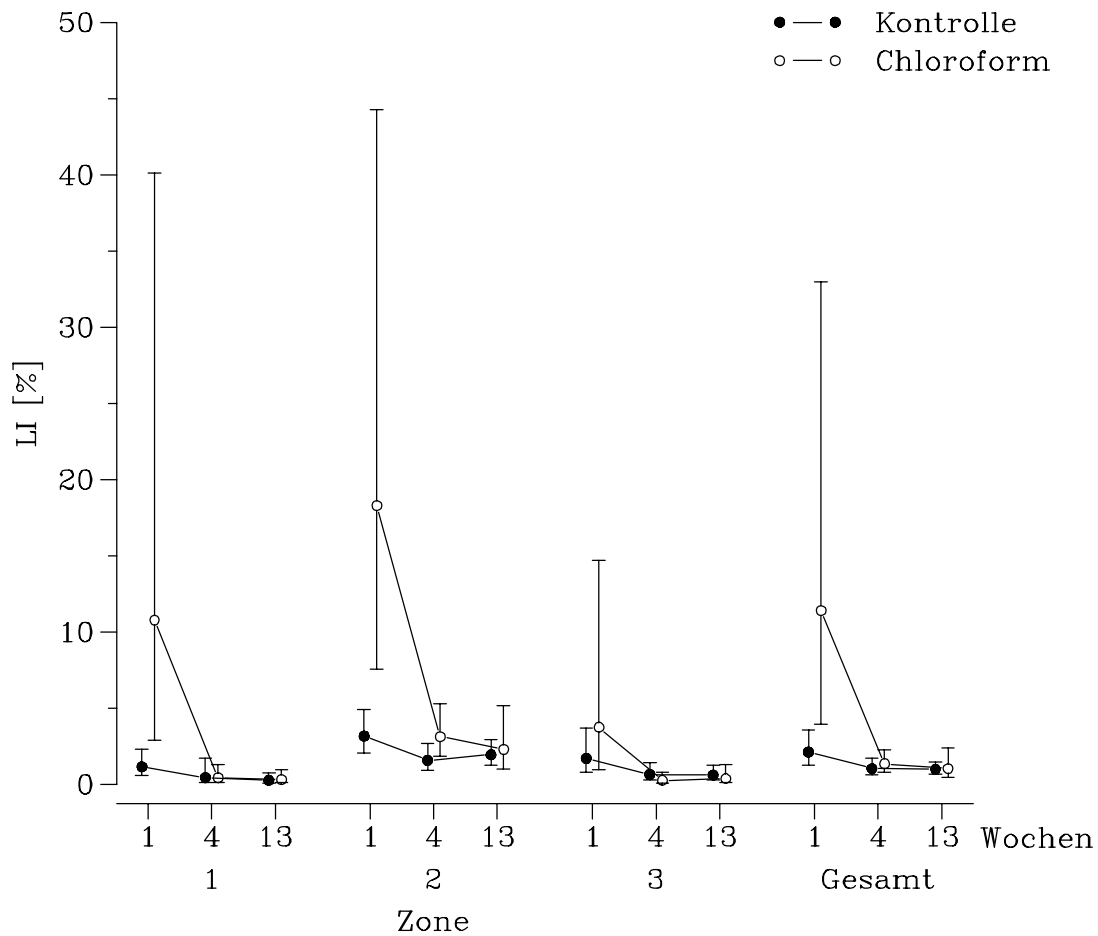
Makroskopie:

Nach 1 Woche war ein Tier verstorben. Acht Lebern waren unverändert. Auf einer Leber fand sich ein 12 mm großer, gelber Herd. Nach 4 Wochen waren 3 Tiere verstorben, die Lebern der überlebenden Tiere waren ohne besondere Befunde. Fünf Tiere der 13 Wochen-Behandlungs-Gruppe waren verstorben. Zwei Lebern der überlebenden Tiere wiesen eine verstärkte Läppchenzeichnung auf, an den restlichen 3 Lebern fanden sich keine Veränderungen. Die verstorbenen Tiere wurden von der Befundung ausgeschlossen.

Histopathologie:

Bei jeweils 4 Tieren war nach 1 Woche das Zytoplasma der Hepatozyten in Zone 3 diffus helleosinophil gefärbt und es fanden sich Einzelzellnekrosen. Ein Tier zeigte eine konfluierende subcapsulär gelegene Nekrose. Nach 4 Wochen wiesen 5 der überlebenden 7 Tiere eine geringgradige gemischtropfige Verfettung im Bereich der Zonen 2 und 3 auf. Bei 4 Tieren zeigte sich ein deutlicher Verlust der Eosinophilie des Zytoplasmas in Zone 3. In der 13 Wochen-Gruppe fand sich in einer Leber eine ausgedehnte, straßenförmig verlaufende Koagulationsnekrose. Drei der 5 überlebenden Tiere zeigten eine geringgradige bis deutliche gemischtropfige Verfettung in Zone 2.

4.3.2.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 6: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der C57BL Maus nach Verabreichung von Chloroform

Woche	1	4	13
Zone 1	**		
Zone 2	**		
Zone 3			
Gesamt	**		

Signifikanzen zu Abb. 6:

** statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ (Dunnett-Test)

Die LI waren nach einer Woche bis auf die Zone 3 alle statistisch signifikant erhöht. Der relativ höchste Anstieg fand sich in Zone 1 (9,4-fach), der absolut größte Wert lag mit 18,29 % in Zone 2. Nach 4 und 13 Wochen wichen die LI in allen Zonen nicht statistisch

signifikant von den Kontrolltieren ab. In Zone 2 waren sie jedoch nach 4 Wochen noch 2-fach erhöht.

4.3.2.3 Mitose und Apoptose

Tab. 17: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der C57BL Maus nach Chloroformgaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,19	0,02
	Chlo	0,00	0,00	0,61	0,53**	0,00	0,09	0,15	0,20**
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
	Chlo	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
	Chlo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03

** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Chlo= Chloroform

Die Mitoserate der behandelten Tiere war zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant gegenüber den Kontrolltieren verändert. In Zone 2 lag sie nach 4 Wochen 3,8-fach über den Kontrollwerten, nach 13 Wochen (0 %) jedoch unter den Werten der Kontrolltiere (0,16 %). Eine statistisch signifikant erhöhte Apoptoserate fand sich nach 1-wöchiger Behandlung in Zone 2 (0,53 %) und im Gesamt-LI (0,20 %, 10-fach erhöht).

4.4 Wyeth 14,643

Die Mäuse beider Stämme erhielten 100 p.p.m. Wyeth 14,643 über 1, 4 oder 13 Wochen im Futter. Die Pumpenimplantation fand jeweils 7 Tage vor der Tötung statt.

Die Kontrollgruppe 3 aus der Studie der verschiedenen Pumpenzeiten (s. 4.1) diene jeweils als Kontrolle.

4.4.1 B6C3F1 Maus

Tab. 18: Körper- und Lebergewichte der B6C3F1 Maus nach Behandlung mit Wyeth 14,643

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Wy	Kontrolle	Wy	Kontrolle	Wy
1 Wo (n = 9)	25,60±1,70	26,23±1,41	1,12±0,19	2,29±0,23**	4,35±0,53	8,70±0,52**
4 Wo (n = 10)	27,58±0,84	27,86±1,23	1,28±0,08	2,79±0,20**	4,64±0,21	10,02±0,32**
13 Wo (n = 10)	30,66±1,53	30,09±1,28	1,34±0,11	3,17±0,26**	4,35±0,19	10,51±0,50**

** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Wy = Wyeth 14,643

Sowohl die absoluten als auch die relativen Lebergewichte waren zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant auf mehr als das Doppelte erhöht (zwischen 100 % und 141,6 %). Es konnte eine kontinuierliche Steigerung im Verlauf der Behandlung beobachtet werden.

4.4.1.1 Makroskopische und histologische Befunde

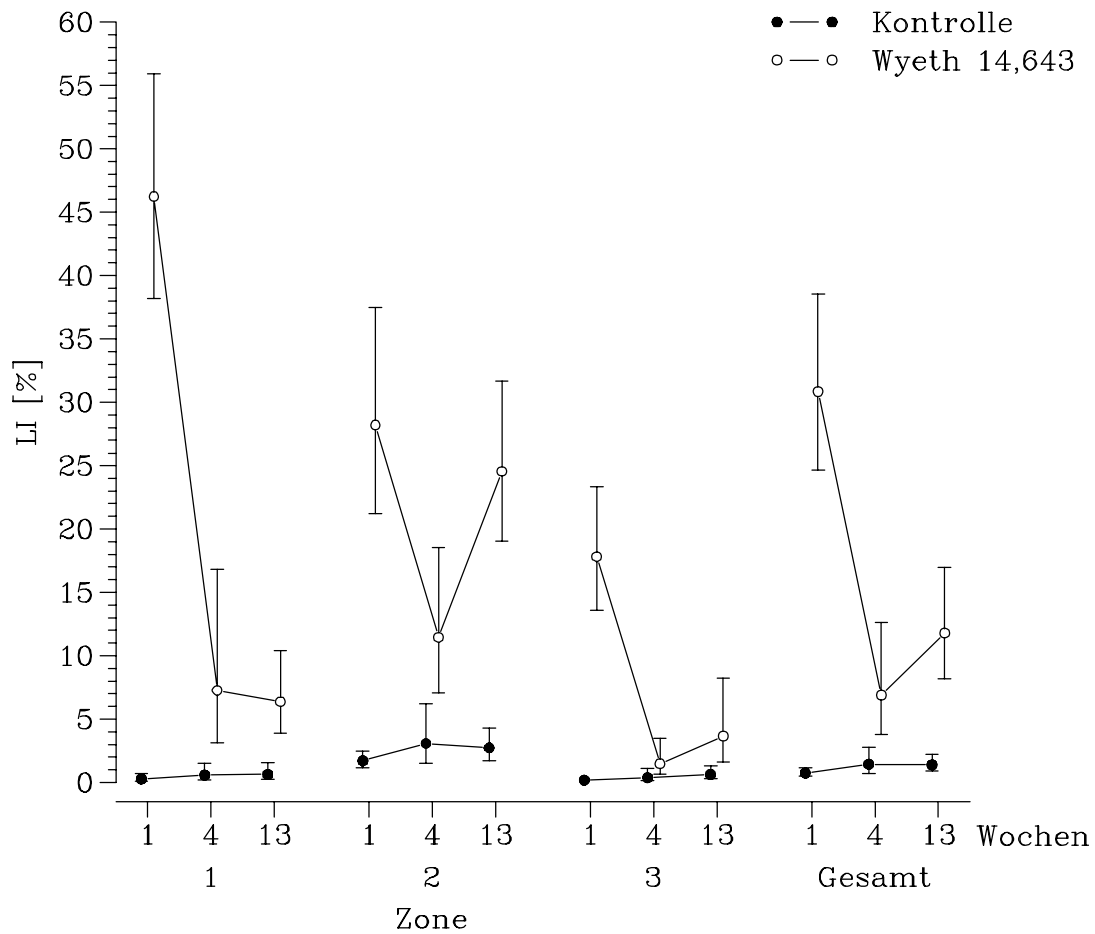
Makroskopie:

Ein Tier der 1 Wochen-Gruppe war verstorben. Nach 1 und 4 Wochen waren die Lebern mittel- bis hochgradig vergrößert. Bei 4 Tieren der 4 Wochen-Gruppe fanden sich multiple, zwischen 1 und 5 mm große gelbe Herde auf der Leber. Nach 13 Wochen wiesen alle Tiere hochgradig vergrößerte Lebern auf.

Histopathologie:

Bei allen Tieren fand sich nach 1, 4 und 13 Wochen eine panlobuläre Hypertrophie der Hepatozyten. Das Zytoplasma war stark eosinophil gefärbt und von körniger Beschaffenheit. In einer Leber der 1 Wochen-Gruppe fand sich ein Nekroseherd von 5 Zellen mit Infiltration von Granulozyten und Makrophagen. In 3 Lebern fand sich eine geringgrade Gallengangsproliferation. Nach 4 Wochen wiesen 6 Lebern mehrere Einzelzellnekrosen, 3 Lebern bis zu 7 herdförmige Nekrosen mit bis zu 30 beteiligten Zellen und eine Leber eine ausgedehnte Koagulationsnekrose auf, was vermutlich makroskopisch als gelbe Herde angesprochen wurde. In 5 Lebern fand sich eine geringgradige diffuse gemischttröpfige Verfettung. Nach 13 Wochen wiesen 2 Tiere 1-5 herdförmige Nekrosen mit bis zu 40 beteiligten Zellen auf. Alle Lebern wiesen eine gering- bis mittelgradige gemischttröpfige Verfettung in Zone 1 auf.

4.4.1.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 7: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der B6C3F1 Maus nach Verabreichung von Wyeth 14,643

Woche	1	4	13
Zone 1	**	**	**
Zone 2	**	**	**
Zone 3	**	*	**
Gesamt	**	**	**

Signifikanzen zu Abb. 7:

** und * statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ und * = $p \leq 0,05$ (Dunnett-Test)

Zone 1 war zu allen 3 Zeitpunkten die Zone mit der stärksten proliferativen Aktivität. Es fand sich im zeitlichen Verlauf ein Abfall der LI mit dem Maximum nach 1 Woche (165,1-fach). Die Zonen 2 und 3 und der Gesamt-LI wiesen ebenfalls die höchsten Werte nach 1 Behandlungswoche auf (16,5- bis 93,8-fach gegenüber den Kontrollwerten erhöht). Nach einem Rückgang der LI zum 4-Wochen-Termin (3,7- bis 12,3-fach erhöhte Werte) kam es nach 13 Wochen zu einem erneuten Anstieg (5,9- bis 10-fach).

4.4.1.3 Mitose und Apoptose

Tab. 19: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der B6C3F1 Maus nach Wyeth 14,643-Gaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Wy	0,23**	0,00	0,30**	0,10**	0,00	0,19**	0,26**	0,06*
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Wy	0,09	0,00	0,10	0,15	0,00	0,40**	0,06	0,18**
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	Wy	0,00	0,00	0,24	0,29**	0,00	0,64**	0,08	0,29**

* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Wy = Wyeth 14,643

Nach 1 Woche waren die Mitoseraten in den Zonen 1 und 2 statistisch signifikant erhöht. Hierbei war die Zone 1 (0,23 %) am stärksten betroffen war. In Zone 1 war die Mitoserate noch nach 4 Wochen (0,09 %), in Zone 2 nach 13 Wochen (0,24 %) deutlich, jedoch nicht mehr statistisch signifikant gegenüber den Kontrollwerten erhöht.

Die Apoptoserate war in allen Zonen bis auf die Zone 1 zu allen Zeitpunkten deutlich erhöht. Es fand sich im zeitlichen Verlauf eine kontinuierliche Steigerung (Zone 2: 0,10 %, 0,15 % und 0,29 %; Zone 3: 0,19%, 0,40 % und 0,64 %; Gesamt-AI: 0,06 %, 0,18 % und 0,29 %), die bis auf den 4 Wochen-Termin in Zone 2 von statistischer Signifikanz war.

4.4.2 C57BL Maus

Tab. 20: Körper- und Lebergewichte der C57BL Maus nach Behandlung mit Wyeth 14,643

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Wy	Kontrolle	Wy	Kontrolle	Wy
1 Wo (n = 10)	25,32±1,05	25,26±0,89	1,21±0,15	2,41±0,25**	4,76±0,47	9,53±0,85**
4 Wo (n = 10)	24,98±1,96	24,91±1,72	1,05±0,21	2,54±0,43**	4,18±0,70	10,31±1,24**
13 Wo (n = 10)	28,19±1,28	26,38±1,25**	1,16±0,09	2,75±0,23**	4,13±0,27	10,41±0,63**

** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Wy = Wyeth 14,643

Die absoluten und relativen Lebergewichte der C57BL Maus waren zu allen 3 Behandlungszeitpunkten statistisch signifikant zwischen 99,2 % und 152,1 % erhöht.

Nach 13 Wochen war das Körpergewicht um 6,4 % statistisch signifikant verringert.

4.4.2.1 Makroskopische und histologische Befunde

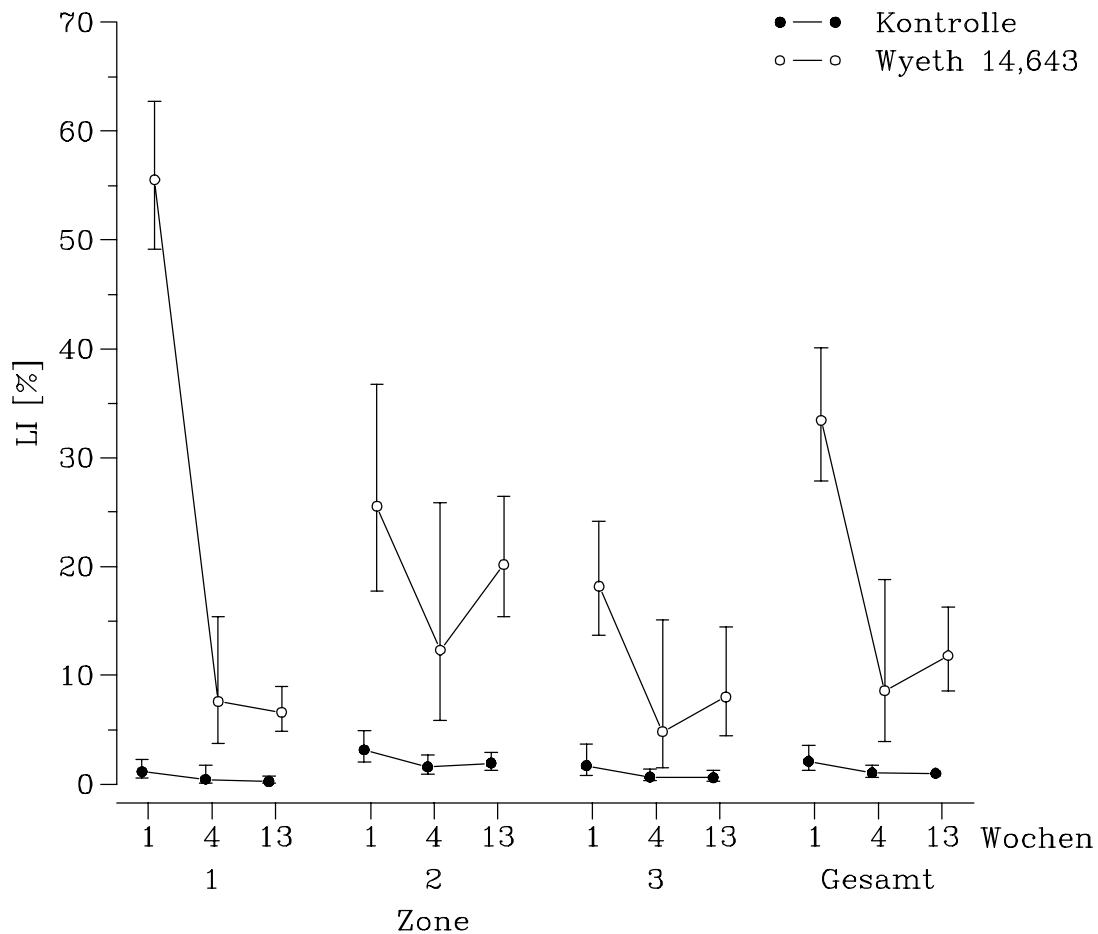
Makroskopie:

Bei allen Tieren waren die Lebern zu allen 3 Zeitpunkten hochgradig vergrößert. Ein Tier der 4-Wochen-Gruppe wies einen gelben, 2 mm großen Herd in der Leber auf.

Histopathologie:

Bei allen Tieren fand sich nach 1 Woche eine panlobuläre Hypertrophie der Hepatozyten. Das Zytoplasma war stark eosinophil gefärbt und von körniger Beschaffenheit. Nach 4 und 13 Wochen war die Hypertrophie vor allem auf die Zone 1 beschränkt. In 7 Lebern fanden sich zwischen 1 und 19 herdförmige Nekrosen, wovon bis zu 100 Zellen betroffen waren. Ein Tier wies weiterhin mehrere konfluierende Nekrosen auf, die ca. 1/3 des Leberlappens einnahmen, was sich makroskopisch vermutlich als gelber Herd in der Leber darstellte. In der 4 Wochen-Gruppe wiesen 7 Lebern zwischen 1 und 7 herdförmige Nekrosen mit bis zu 50 Zellen auf. In 8 Lebern fand sich eine gering- bis mittelgradige gemischttröpfige Verfettung in Zone 1. In je 2 Lebern fand sich eine geringgradige Gallengangsproliferation. Nach 13 Wochen wiesen 2 Lebern 1-2 herdförmige Nekrosen mit bis zu 20 Zellen auf. Die Zone 1 zeigte bei allen Tieren eine geringgradige bis deutliche gemischttröpfige Verfettung. Bei 2 Tieren fand sich weiterhin eine geringgradige Gallengangsproliferation.

4.4.2.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 8: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der C57BL Maus nach Verabreichung von Wyeth 14,643

Woche	1	4	13
Zone 1	**	**	**
Zone 2	**	**	**
Zone 3	**	**	**
Gesamt	**	**	**

Signifikanzen zu Abb. 8:

** statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ (Dunnett-Test)

Alle LI der behandelten Tiere waren statistisch signifikant gegenüber den Kontrollwerten erhöht. In der Zone 1 fanden sich zu allen 3 Zeitpunkten die relativ größten LI-Anstiege mit dem Maximum (48,3-fache Erhöhung) nach 1 Woche. Die LI der Zonen 2 und 3 sowie der Gesamt-LI waren zu allen Zeitpunkten zwischen 7,4- und 15,9-fach gegenüber den Werten

der Kontrolltiere erhöht. Maximale Werte fanden sich in den Zonen 2 und 3 der 13-Wochen-Gruppe, beim Gesamt-LI fand sich das Maximum zum 1 Wochen-Zeitpunkt. Die geringsten Anstiege des LI wurden in allen Zonen nach 4-wöchiger Behandlung gefunden.

4.4.2.3 Mitose und Apoptose

Tab. 21: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der C57BL Maus nach Wyeth 14,643-Gaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)	MI (%)	AI (%)
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,19	0,02
	Wy	0,17**	0,00	1,75**	0,00	0,00	0,00	0,56**	0,05
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
	Wy	0,09	0,00	0,53	0,28**	0,00	1,02**	0,19	0,42**
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
	Wy	0,09**	0,00	0,71**	0,24**	0,09**	1,20**	0,32**	0,50**

** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Wy = Wyeth 14,643

Zum Zeitpunkt von 1 Woche waren die MI in den Zonen 1 und 2 sowie der Gesamt-LI statistisch signifikant gegenüber den Kontrollwerten erhöht (0,17 %, 1,75 % und 0,56 %). Der absolut höchste Wert wurde in Zone 2 erreicht. In diesen 3 Zonen waren die LI auch nach 4 Wochen noch gegenüber den Kontrollwerten erhöht, was jedoch nicht von statistischer Signifikanz war. Nach 13 Wochen lagen alle MI zwischen 0,09 % und 0,71 % und waren statistisch signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht, der absolut höchste Wert lag auch hier wieder in Zone 2.

Der AI war in der Zone 1 zu keinem Behandlungszeitpunkt gegenüber den Kontrolltieren verändert und lag bei 0. In Zone 2 war der AI nur nach 4 und 13 Wochen deutlich und statistisch signifikant erhöht (0,28 % und 0,24 %). Der AI der Zone 3 sowie der Gesamt-AI waren ebenfalls statistisch signifikant während der letzten beiden Zeitpunkte gegenüber den Kontrolltieren erhöht (0,42 % und 1,20 %), wobei das Maximum jeweils zum Zeitpunkt von 13 Wochen erreicht wurde.

5 DISKUSSION

Zellproliferationsdaten haben in den letzten Jahren bei der Beurteilung von kanzerogenem Potential stark an Bedeutung gewonnen (AMES und GOLD, 1990; COHEN und ELLWEIN, 1990; SCHULTE-HERMANN et al., 1991; BUTTERWORTH et al., 1992). In dieser Arbeit wurde im Rahmen von Zellproliferationsstudien (S-Phasen-Response-Studien) der Abteilung Toxikologie der BASF AG die osmotische Minipumpe und deren optimale Verweildauer in der Maus etabliert. Anschließend wurden bei 2 Mäusestämmen, die eine unterschiedliche Spontantumorrates sowie eine unterschiedliche Tumorfrequenz nach chemischer Tumori-induktion besitzen, die Spontanzellteilungsrate sowie die durch 3 bekannte nicht-genotoxische Karzinogene hervorgerufene Zellteilungsrate in der Leber bestimmt. Besonderes Augenmerk legten wir hierbei auf die zonale Verteilung der sich teilenden Zellen, da in der Literatur von zonal differenzierten, durch unterschiedliche Substanzen hervorgerufene hepatozelluläre Proliferationsmuster berichtet wird (FOX et al., 1993; CHEN et al., 1995; CONSTAN et al., 1995; BAHNEMANN, 2000).

Zur Zeit ist es aufgrund der uneinheitlichen und geringen Datenbasis nicht möglich, Zellproliferationsstudien als Kurzzeittest zur Bestimmung eines kanzerogenen Potentials zu verwenden. Diese Arbeit soll der Erweiterung dieser Datenbasis dienen und somit eine Grundlage für die Entwicklung eines Kurzzeittestes zur Detektierung kanzerogenen Potentials schaffen.

5.1 Wahl des Marker

Da es sich in diesem Falle um prospektive Zellproliferationsstudien handelte, wurde BrdU als Marker gewählt. BrdU, ein Thymidinanalogon, zeichnet sich durch seine geringe Toxizität und gute immunhistochemische Detektierbarkeit aus. Mit Hilfe osmotischer Minipumpen oder einer Verabreichung über Infusionen können kumulative Messungen durchgeführt werden, was speziell für Gewebe mit geringer mitotischer Aktivität von Vorteil ist. Bei der Verwendung von BrdU muß im Gegensatz zu [³H]Thymidin nicht mit radioaktivem Material gearbeitet werden und lange Entwicklungszeiten von Wochen bis Monate entfallen. Als Nachteil von sowohl BrdU als auch [³H]Thymidin ist jedoch aufzuführen, daß Studien nicht retrospektiv ausgewertet werden können.

Ein anderer Marker zur Erfassung der Zellteilungsrate ist das endogen produzierte Protein PCNA. Ein endogener Marker wie PCNA erfaßt nur Zellen aus einem Teilungszyklus und es kann deshalb nur eine geringe Anzahl positiver Zellen detektiert werden (SWENBERG und MARONPOT, 1991). Vor allem in postmitotischem Gewebe mit einer niedrigen Zellteilungsrate, wie z. B. der Leber, werden so nur wenige Zellen detektiert, was zu einer erschwerten statistischen Auswertung führt (MORRIS, 1993). Als Vorteil der PCNA-Methode gilt, die unterschiedlichen Zellzyklusphasen unterscheiden zu können (GOLDSWORTHY et al., 1991; FOSTER, 1997). So können eventuelle Effekte einer Substanz auf Zellen in bestimmten Abschnitten des Zellzyklus detektiert werden (GOLDSWORTHY et al., 1993). Diese Unterscheidung fällt jedoch im Einzelfall schwer (GOTTSCHLING, 1999; STEPHAN, 1999). Ein eindeutiger Vorteil der PCNA-Methode gegenüber dem Markieren mit Hilfe von DNA-Vorläufern ist die Möglichkeit einer retrospektiven Verwendung, was auch an Gewebe, das bis zu 28 Jahre gelagert war, noch möglich ist (GOTTSCHLING, 1999; STEPHAN, 1999).

Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Zellproliferationsstudien wird die Verwendung einheitlicher Versuchs- und Färbeprotokolle gefordert (GOLDSWORTHY et al., 1991).

5.2 Wahl der Mäusestämme

Die B6C3F1 Maus ist der am häufigsten für chemischen Karzinogenitätsstudien genutzte Stamm (GOLD et al., 1991). Im Rahmen eines Workshop wurde die Frage diskutiert, welcher Mäusestamm für weitere Studien der am besten geeignete sei (RAO et al., 1988a): die Wahl fiel auf die B6C3F1 Maus, da für diesen Stamm schon eine sehr große Datenmenge vorlag, die für einen anderen Stamm erst hätte ermittelt werden müssen. Außerdem wiesen andere, bis dahin verwendete Mäusestämme, entweder eine kürzere Lebenspanne oder eine höhere Prävalenz für Lymphome und Gefäßtumore auf. Argumente gegen einen Inzuchtstamm wie die C57BL Maus waren deren geringe genotypische Variabilität, die als nicht repräsentativ für die gesamte Spezies Maus galt.

Für unsere Studie entschieden wir uns für die B6C3F1 Maus, da sie noch immer einer der meist verwendeten Mäusestämme in Kanzerogenitätsstudien ist. Es liegen viele Daten zur Häufigkeit von spontan auftretenden oder chemisch induzierten Lebertumoren vor. Die C57BL Maus wählten wir aufgrund ihrer geringeren Anfälligkeit für Lebertumore (FRITH et

al., 1983). Unsere Untersuchungen sollten auch zeigen, ob die Zellproliferation ein möglicher Faktor in der unterschiedlichen Prävalenz von Lebertumoren beider Stämme darstellt.

5.3 Pumpenverweildauer

Für Zellproliferationsstudien werden in der Literatur unterschiedliche Pumpenverweildauern angegeben (s. Tab. 6). GÖTTEL (1997) testete in verschiedenen Geweben der Ratte die optimale Pumpenverweildauer. Für die Leber erwies sich die 7 Tage-Pumpe als geeignetes Verfahren, um stabile Daten zu erhalten. Mit Hilfe einer BrdU-Pulse-Injektion 2 h vor Tötung der Tiere fanden ELDRIDGE und GOLDSWORTHY (1996) in männlichen, 10 bis 20 Wochen alten B6C3F1 Mäusen LI zwischen 0,08 % und 0,20 %. Hierbei wurde keine zonale Differenzierung vorgenommen. Diese Daten decken sich mit dem von uns ermittelten Gesamt-LI (B6C3F1 Maus: 0,08-0,15 % und C57BL Maus: 0,12-0,13 %). Es fällt jedoch auf, daß sich alle Werte auf sehr niedrigen Niveau bewegen.

Bei der Verwendung einer 3 Tage BrdU-Pumpe lagen die Werte zwischen 0,11 % (ELDRIDGE et al., 1992; männliche B6C3F1 Mäuse, 8 Wochen) und 0,69 % (ELDRIDGE et al., 1990; männliche B6C3F1 Mäuse, 10 Wochen). LARSON et al. (1996) ermittelten LI zwischen 1,0 % und 0,5 % mit einer 3,5 Tage BrdU-Pumpe in männlichen B6C3F1 Mäusen (12 und 21 Wochen). Die eigenen Untersuchungen des Gesamt-LI mit Hilfe einer 3 Tage BrdU-Pumpe ergaben bei der B6C3F1 Maus Werte zwischen 0,42 % und 0,56 %. Bei der C57BL Maus fanden sich LI zwischen 0,43 % und 0,63 %. Die von uns ermittelten Werte lagen alle im Rahmen der in der Literatur beschriebenen LI. Insgesamt bewegen sich die Werte jedoch auf einem sehr niedrigen Niveau (≤ 1 %). Stehen zur Bewertung von substanzinduzierten Zellproliferationssteigerungen nur relativ niedrige Kontrollwerte zur Verfügung, führen geringgradige Proliferationsschwankungen, die nur durch 1 oder 2 positive Zellen ausgelöst werden können, zu einem vielfachen Anstieg oder Abfall des LI, was eher zu einer falschen Bewertung als bei höheren Kontrollwerten führen kann (GOLDSWORTHY et al., 1991; GOODMAN et al., 1991). Um stabilere, für Ausreißer weniger anfällige Kontrollwerte zu erhalten, entschieden wir uns für die Verwendung einer 7 Tage BrdU-Pumpe (s. 5.5).

5.4 Auswertungsstrategien

5.4.1 Labelingindex

Verschiedene Substanzen verursachen Zellproliferationssteigerungen in der Leber vor allem in bestimmten Populationen von Hepatozyten. Es ist bekannt, daß Phenobarbital sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen zu einer Erhöhung des LI der zentrolobulär gelegenen Hepatozyten führt (WARD und OHSHIMA, 1985; SMITH et al., 1991; JONES und CLARKE, 1993; KOLAJA et al., 1996c). Bei der Verabreichung von Trichlorethylen an B6C3F1 Mäuse fanden DEES und TRAVIS (1993) einen gesteigerten LI und eine gesteigerte Mitoserate in der „intermediären“ Zone der Leber. Nach der Gabe von Wyeth 14,643 an Ratten kam es, im Gegensatz zu Mäusen, welche ein panlobuläres Proliferationsmuster aufwiesen, zu einer Proliferationssteigerung in der periportal Zone (MARSMAN et al., 1988; ELDRIDGE et al., 1990; SMITH et al., 1991; STEPHAN, 2001). Um auch in unserer Studie etwaige zonale Effekte verschiedener Substanzen auf den LI beurteilen zu können, kam für die Auswertung der S-Phasen-Response die lobule-dependent zonal measurement Methode (LZM-Methode) nach BAHNEMANN und MELLERT (1997) zur Anwendung. Die Strecke zwischen Portalgefäßen und abführender Vene wurde hierbei in 3 gleichgroße Zonen eingeteilt, wobei jede Zone ca. 100 Zellen umfaßte. Diese differenzierte Auszählung in 3 verschiedenen Zonen hat den Vorteil, daß geringe Änderungen im LI einer Zone erfaßt werden können und dieser Effekt nicht bei der Verrechnung über das gesamte Organ verloren geht. Durch die Messung von je 5 Feldern in 2 Leberlappen und die dadurch bedingte Erfassung von ca. 3000 Hepatozyten pro Tier erlangten wir einen repräsentativen Ausschnitt der gesamten Leber. SOAMES et al. (1994) fanden bei der Auswertung von 5 Feldern in der Mäuseleber mit Hilfe einer 5 Tage BrdU-Pumpe im Gegensatz zur Ratte nur relativ kleine LI ($< 1\%$). Es sollte deshalb eine deutlich größere Anzahl an Feldern ausgewertet werden, was wir mit 10 Feldern pro Tier erfüllten.

In unserer Studie wurden zum ersten Mal zonale Zellproliferationsdaten mit Hilfe der LZM-Methode in der Mäuseleber ausgewertet. Die am häufigsten verwendete Auswertstrategie ist die zufällige Auswahl von Messfeldern (5-10), wobei insgesamt 1000-2000 Zellen gezählt werden und der Mittelwert dieser Felder als repräsentativ für die gesamte Leber angesehen wird (ELDRIDGE et al., 1990; MARSMAN et al., 1992; WADA et al., 1992; WILSON et al., 1992; LARSON et al., 1994a; STANDEVEN und GOLDSWORTHY, 1994). Hierbei besteht die Gefahr, daß nur zonal auftretende Änderungen des LI nicht erfaßt werden (FOX et al., 1993). BAHNEMANN (2000) konnte im direkten Vergleich der beiden Methoden zeigen,

daß die zufällige Auswahl von Feldern sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Ergebnissen führen kann, wenn ein zonal unterschiedliches Proliferationsmuster vorliegt und in diesem Fall mehr als die Hälfte der gewählten Meßfelder in dieser oder einer anderen Zone gemessen werden. Mit Hilfe der LZM Methode wird gewährleistet, daß alle 3 Zonen gleichmäßig berücksichtigt werden und hier pro Zone die sonst oft für die gesamte Leber üblichen 1000 Zellen gezählt werden. Da der Abstand zwischen Portalfeld (Zone 1) und abführender Vene (Zone 3) in jedem zu messenden Feld ca. 350 µm beträgt, erhält man für alle gemessenen Felder vergleichbare Daten.

In der Literatur wurde bisher nur eine Zellproliferationsstudie mit Mäusen beschrieben, in der zonal ausgewertet wurde (KOLAJA et al., 1996c). Das unterschiedliche Studiendesign (Gruppengröße, Alter der Tiere, ausgewertete Gesamtzellzahl) erschwert jedoch den Vergleich mit unseren Daten. KOLAJA et al. (1996c) nahmen die zonale Einteilung in der Leber männlicher B6C3F1 Mäuse vor, indem sie jeweils 5 Hepatozyten im Radius um ein Portalfeld zur periportal Zone und jeweils 5 Hepatozyten im Radius um eine abführende Vene zur zentrolobulären Zone erklärten. Die dazwischen liegenden Hepatozyten wurden als „mid-zonal“ bezeichnet. Mit Hilfe einer 7 Tage [³H]Thymidin-Pumpe stellten sie keine deutliche Unterschiede zwischen dem „Totalen-LI“ und dem der einzelnen Zonen fest (zu allen Zeitpunkten ~2,5 %).

5.4.2 Mitose- und Apoptoseindex

Mit Hilfe der Inkorporation von BrdU in die DNA werden Zellen detektiert, die sich in der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzykluses befinden, oder, bei längerdauernder BrdU-Gabe, während der Verabreichungsdauer befanden. Da die Synthese-Phase im Zellzyklus zeitlich gesehen vor der eigentlichen Zellteilung, der Mitose, liegt, kann mit der S-Phasen-Response keine Aussage darüber getroffen werden, ob die markierten Zellen auch die Mitosephase durchlaufen. Aus diesem Grund werteten wir an Hand von morphologischen Kriterien (Mitosefiguren) den Mitoseindex ebenfalls mit der LZM-Methode aus. Als Nachteil dieser Methode ist anzuführen, daß in Organen mit geringer mitotischer Aktivität wie der Leber nur sehr niedrige Werte ermittelt werden und so kleine Änderungen leicht übersehen werden können (FOSTER, 1997). Die niedrigen Mitoseindizes sind zum anderen bedingt durch die kurze Zeitspanne, in der sich die Zelle in der Mitose-Phase befindet (~1 Stunde) (CHEVILLE, 1983).

Die Apoptose gilt neben der Zellproliferation als weiterer wichtiger Faktor im Rahmen der Hepatokarzinogenese (SCHULTE-HERMANN et al., 1990; LUEBECK et al., 1991; SCHULTE-HERMANN et al., 1991). In gesundem Gewebe ist sie für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase verantwortlich (FERGUSON und ANDERSON, 1981). Präkanzeröse und kanzeröse Zellen können eine verminderte Sensibilität gegenüber Apoptosesignalen und damit eine geringere Apoptoserate als das unveränderte, umliegende Gewebe aufweisen, was schließlich zu einem größeren Risiko der Tumorentstehung führt (SCHULTE-HERMANN et al., 1990). Aus diesem Grund sollte in unserer Studie neben dem Einfluß verschiedener Substanzen auf die S-Phasen-Response auch deren Auswirkung auf die Apoptose überprüft werden.

BLAZEY (2001) verglich an Rattenlebern die verschiedenen Möglichkeiten des Nachweises von Apoptosen. Die Auswertung am H&E gefärbten Schnitt erwies sich als sehr sensitiv und es kam nur zu geringen Schwankungen innerhalb der AI. Als weiterer Vorteil dieser Methode galten die geringen Materialkosten und die gute Differenzierbarkeit der Apoptose von Nekrosen oder Strukturen, die mit Apoptosen verwechselt werden können (z. B. zytoplasmatische Einschlüsse). Mit Hilfe der TUNEL-Methode wurden im Vergleich zur HE-Methode zwar höhere Apoptoseindizes ermittelt, es kam jedoch häufiger zu falsch positiven Ergebnissen, die dann am HE-Schnitt an Hand morphologischer Kriterien überprüft werden mußten. Mit der Fluoreszenz-Methode (Eosin-Fluoreszenz) wurden wie bei der TUNEL-Methode andere Ereignisse (z. B. nekrotische Zellen) mitdetektiert, die nicht apoptotischen Vorgängen zugeordnet werden konnten. Weiterhin kam es nach längeren Fixationszeiten (> 7 Tage) zu einer erheblichen Reduktion der feststellbaren Apoptosen.

Wegen des geringeren zeitlichen Aufwands, der geringeren Kosten und vor allem aufgrund der höheren Sensitivität entschieden wir uns für die HE-Methode. Um korrespondierende Ergebnisse zur S-Phasen-Response zu erlangen, wurde hier ebenfalls mittels der LZM-Methode (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) ausgewertet. BLAZEY (2001) forderte eine Auszählung von 15000 Zellen pro Leber, um stabile Daten zu erhalten. Sie bevorzugte eine meanderförmige Auswertung innerhalb des Leberlappens, da somit, im Gegensatz zur LZM-Methode, die Anzahl der auswertbaren Felder nicht beschränkt wurde. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, werteten wir die Zellproliferation, den Mitoseindex und auch den Apoptoseindex mit Hilfe der selben Methode (LZM-Methode) aus und nahmen so die eventuell aufgrund der geringeren ausgewerteten Zellzahl etwas instabileren Daten zu Gunsten der besseren Übertragbarkeit in Kauf.

5.5 Vergleich der ermittelten Werte der Kontrollgruppe 3 (7 Tage-Pumpe) mit Literaturangaben

Die in der Literatur gefundenen Kontrollwerte unterliegen zum Teil großen Schwankungen. Dies ist auf das uneinheitliche Alter der Tiere oder die unterschiedlichen Techniken der einzelnen Labors zurückzuführen. Weiterhin liegen nur wenige Daten zu S-Phasen-Response Studien mit Mäusen und nur ganz vereinzelt mit C57BL Mäusen vor. Es konnten deshalb nur wenige Daten zum Vergleich herangezogen werden.

5.5.1 B6C3F1 Maus

Werte aus Zellproliferationsstudien in der Leber männlicher B6C3F1 Mäuse, die mit einer 7 Tage [³H]Thymidin- oder BrdU-Pumpe ermittelt wurden, reichen von 2,50 % (COUNTS et al., 1996; KOLAJA et al., 1996c) bis 3,63 % (CUNNINGHAM et al., 1994). ELDRIDGE et al. (1990) ermittelten mit Hilfe einer 6 Tage BrdU-Pumpe sogar Werte von 3,90 % (männliche B6C3F1 Mäuse, 11 Wochen). COUNTS et al. (1996) und CUNNINGHAM et al. (1994) machten in ihrer Studie keine Angabe zum Alter der Tiere. Dadurch wird der Vergleich der Daten zusätzlich erschwert, da das Alter einen nicht unerheblichen Einfluß auf den LI hat (GOLDSWORTHY et al., 1991).

Die Kontrollwerte (geometrischer Mittelwert) der eigenen Untersuchung (Gesamt-LI) lagen bei 11 Wochen alten Tieren bei 0,75 %, im Alter von 14 Wochen bei 1,43 % und bei 24 Wochen alten Tieren bei 1,39 %. Die von uns ermittelten Werte liegen somit zu allen 3 Zeitpunkten unter den in der Literatur beschriebenen Werten. Hierfür kommen ursächlich verschiedene Faktoren in Betracht. Durch die LZM-Methode (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) werden alle 3 Zonen der Leber in gleichem Maße ausgewertet. Werden hingegen zufällig Felder zur Auswertung aufgesucht, besteht die Gefahr, daß vermehrt in Feldern mit hoher Zellteilungsrate gemessen wird und man so zu hohe Ergebnisse ermittelt. Der LI der Zone 2 aus unseren Auswertungen lag zwischen 1,71 % und 3,07 %, somit also im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte für die gesamte Leber. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß in anderen Studien mit zufälliger Meßfeldauswahl vermehrt Felder mit höheren LI aufgesucht wurden. Weiterhin wurden oft nur 1000 Zellen/Leber ausgewertet (ELDRIDGE et al., 1990; KOLAJA et al., 1996c). Dies stellt nur ein Drittel der von uns ausgewerteten Gesamtzellzahl dar. Hierdurch erhält man einen weniger repräsentativen Ausschnitt des Proliferationsverhaltens der gesamten Leber.

5.5.1.1 Mitoseindex

In der Literatur liegen nur sehr wenige Werte zur Berechnung des MI in der Mäuseleber vor. Ein Vergleich fällt weiterhin sehr schwer, da unterschiedliche Mäusestämme, teilweise Tumor-tragende Mäuse und unterschiedliche Methoden (Colchizin-Applikation) verwendet wurden (THEOLOGIDES und ZAKI, 1969; SURUR et al., 1985). Insgesamt bewegen sich die gefundenen MI auf sehr niedrigem Niveau, so daß zum Teil der MI nicht bestimmt wurde, sondern nur die Region mit auffällig vielen Mitosefiguren beschrieben wurde (DEES und TRAVIS, 1993). SURUR et al. (1985) ermittelte in C3HS Mäusen Werte zwischen 0 und 5,4 Mitosefiguren/1000 Hepatozyten.

Die eigenen Messungen ergaben ebenfalls nur sehr geringe Werte, wobei der Median oft bei 0 lag. Dies trifft vor allem auf die Zonen 1 und 3 zu, wo die MI der Einzeltiere zwischen 0 % und 0,1 % lagen (s. Tab. 40-42). Wie auch schon bei der Bestimmung der S-Phasen-Response wies die Zone 2 zu allen 3 Zeitpunkten den höchsten MI auf (0,09-0,14 %).

5.5.1.2 Apoptoseindex

Die in der Literatur für Mäuse beschriebenen AI liegen auf einem sehr niedrigen Niveau (0,01-0,1 %) (MUSKHELISHVILI et al., 1995; GOLDSWORTHY et al., 1996, JAMES et al., 1998). Es wurden 2000-50000 Hepatozyten pro Leber ausgewertet. BLAZEY (2001) fand bei der Auswertung der Apoptoserate bei Ratten am H&E-Schnitt Werte von 0,013-0,033 %. Die Mediane des AI der eigenen Untersuchungen liegen zum größten Teil bei 0 %. Die Werte der Einzeltiere (s. Tab. 43-45) variieren zwischen 0 % und 0,12 %. Ein möglicher Grund für diese niedrigen AI könnte die Auswertung von nur 3000 Zellen sein. Dies entspricht nur 6-20 % der von anderen Autoren ausgewerteten Anzahl von Hepatozyten. GOLDSWORTHY et al. (1996) fand AI von 0,1 % bei einer ausgewerteten Gesamtzellzahl von 2000 Hepatozyten. Die Untersuchungen wurden jedoch an weiblichen Tieren durchgeführt, was eine Übertragbarkeit der Ergebnisse erschwert.

5.5.2 C57BL Maus

In S-Phasen-Response-Studien, die an C57BL Mäusen mit Hilfe einer 7 Tage-Pumpe durchgeführt wurden, variieren die LI zwischen 0,33 % und 4,5 % (COUNTS et al., 1996; ORTON et al., 1996). Der relativ hohe Wert (4,5 %) bei COUNTS et al. (1996) könnte durch das geringe Alter der Tiere bedingt sein. Es ist bekannt, daß Mäuse während der ersten 8 Lebenswochen größere Schwankungen im LI aufweisen, bedingt durch das starke Größenwachstum der Organe (GOLDSWORTHY et al., 1991). Ob die von COUNTS et al.

(1996) gefundenen relativ hohen LI altersbedingt sind, bleibt in diesem Fall rein spekulativ, da keine Altersangabe zu den Tieren gemacht wurde. ORTON et al. (1996) fanden in 6 Wochen alten Tieren einen LI von 1,8 %, dann das Maximum im Alter von 10 Wochen (3,8 %) und danach einen Rückgang des LI im Alter von 18 Wochen auf 0,33 %.

Die LI der eigenen Untersuchungen lagen mit 2,10 % (11 Wochen), 1,04 % (14 Wochen) und 0,99 % (23 Wochen) zum Teil unter den in der Literatur beschriebenen Werten, mit Zunahme des Alters jedoch auch darüber. Als Begründung hierfür kommen wieder ähnliche Faktoren in Betracht wie schon unter 5.5.1 aufgeführt.

5.5.2.1 Mitoseindex

Es wurden ähnliche MI wie für die B6C3F1 Maus ermittelt (s. 5.5.1.1). Auch hier fanden sich die meisten Mitosefiguren in Zone 2.

5.5.2.2 Apoptoseindex

Die AI entsprachen weitgehend denen der B6C3F1 Maus. Die Einzeltierwerte variierten zwischen 0 % und 0,12 % (s. Tab. 85-87).

5.5.3 Vergleich der Kontrollwerte beider Mäusestämme

Beim Vergleich des Gesamt-LI beider Stämme wies die C57BL Maus zu Beginn 2,8-fach höhere Werte auf als die B6C3F1 Maus. Im zeitlichen Verlauf kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der LI der C57BL Maus. Im Gegensatz dazu zeigte die B6C3F1 Maus erhöhte LI nach 4 Wochen, die auch nach 13 Wochen noch bestanden und somit 1,4-fach über denen der C57BL Maus lagen. Die gegenüber der C57BL Maus im Alter (14 Wochen und 23 Wochen) zunehmende Zellproliferationsrate der B6C3F1 Maus könnte ein wichtiger Faktor für die höhere Tumorprävalenz bei diesem Mäusestamm darstellen (30 % gegenüber 4,7 %, s. 2.3). Eine konstant hohe Zellteilungsrate erhöht das Risiko des Entstehens endogener Mutationen (s. 2.1).

KOLAJA et al. (1996c) fielen bei der zonalen Auswertung keine Unterschiede im LI zwischen den verschiedenen Zonen auf. In unserer Studie wurden im Gegensatz dazu bei beiden Stämmen zu allen 3 Meßzeitpunkten und bei unterschiedlich langer BrdU-Verabreichung in Zone 2 die höchsten LI gefunden (mit 7 Tage-Pumpe: B6C3F1: 4,3- bis 9,0-fach gegenüber den Zonen 1 und 3; C57BL: 1,9- bis 7,7-fach gegenüber den Zonen 1 und 3). Diese Beobachtung ist in sofern bemerkenswert, da für die Leber die Theorie der “streaming liver“ (s. 2.5.1) diskutiert wird (ZAJICEK et al., 1985). Die Autoren verabreichten 20 Ratten

eine einmalige intraperitoneale [^3H]Thymidin-Injektion. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion (1 h, 1, 3 und 5 Wochen) wurden die Tiere getötet und der Abstand der markierten Zellen zu den portalen Gefäßen bestimmt. Nach 1 h fanden sich die meisten gelabelten Zellen im periportalen Bereich, zu späteren Zeitpunkten vergrößerte sich der Abstand der gelabelten Zellen zum Portalfeld zunehmend. Basierend auf diesen Beobachtungen entwickelten die Autoren das Modell der “streaming liver“, wonach die Hepatozyten am Rand der Portalgefäße entstehen und dann im Zellverband zur Zentralvene wandern, wo sie mittels Apoptose eliminiert werden.

Unsere Beobachtungen stützen dieses Konzept nicht. Wir konnten in Zone 2 die stärkste proliferative Aktivität messen. Da dies auch für Tiere zutraf, die eine intraperitoneale Injektion 2 h vor der Tötung erhielten, kann ausgeschlossen werden, daß während der kumulativen Messungen (7 Tage BrdU-Pumpe) die Hepatozyten von Zone 1 nach Zone 2 wanderten. Weiterhin findet sich auch bei beiden untersuchten Mäusestämmen die höchste Mitoserate in Zone 2, was somit unsere Ergebnisse der S-Phasen-Response bestätigte. Als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Proliferationsmuster kommen auch Speziesunterschiede in der Stammzellpopulation in Frage, da ZAJICEK et al. (1985) ihre Untersuchungen an Ratten durchführten. Es muß in Betracht gezogen werden, daß in der Mäuseleber keine der Ratte vergleichbare Stammzellpopulation existiert, was verschiedene Autoren aufgrund von Studien mit genetischer Markierung der sich teilenden Hepatozyten ebenfalls vermuten (BRALET et al., 1994; KENNEDY et al., 1995; PONDER, 1996).

Da wir mit unserer Auswertstrategie nur sehr niedrige AI ermitteln konnten, fällt ein Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Daten schwer. Diese Studie diente hauptsächlich der Ermittlung zonaler Zellproliferationsdaten, weshalb die LZM-Methode zur Anwendung kam. Für die Ermittlung von AI stellt sie jedoch keine geeignete Methode dar, da die von uns ermittelten AI sehr häufig bei 0 % lagen. Studien, die vorrangig die Erfassung der Apoptose zum Ziel haben, sollten ein abgewandeltes Auswertverfahren gewählt werden (deutlich größere ausgewertete Zellzahl, keine Festlegung auf eine bestimmte Anzahl an Meßfeldern), wie etwa von MUSKHELISHVILI et al. (1995), JAMES et al. (1998) oder BLAZEY (2001) beschrieben.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die von uns erhobenen Daten die Forderung von GOLDSWORTHY et al. (1991) zur Messung von Zellproliferation in verschiedenen Geweben weitgehend erfüllen. Es wurden mit Hilfe der LZM-Methode solide Daten erhoben, die aufgrund der zonalen Auswertung eine gezielte Betrachtung der unterschiedlichen

Zellpopulationen in der Leber ermöglichen und Unterschiede in der zonalen Zellteilungsrate aufzeigen. Im Gesamt-LI lagen die Werte mit einer Ausnahme $> 1\%$. Dies läßt eine sichere statistische Aussage zu Zellproliferationssteigerungen zu. Bei der zonalen Auswertung liegen die LI vor allem der Zonen 1 und 3 auf einem etwas niedrigeren Niveau. Dadurch wird deutlich, daß eine zonale Auswertung unerläßlich ist, um eine gleichmäßige Verteilung der Meßfelder zu gewährleisten. So kann ausgeschlossen werden, daß Messungen überwiegend in einer bestimmten Zone stattfinden, was zu einer Verschleierung des wirklichen Geschehens in der Leber führen kann. Der Gesamt-LI erhält damit eine stärkere Aussagekraft gegenüber einem aus zufällig gewählten Meßfeldern ermittelten LI, da unter Verwendung der LZM-Methode jeweils ähnliche Felder ausgewertet wurden und dadurch ein repräsentativer Durchschnitt der Zellteilungsrate der gesamten Leber erlangt wurde.

5.6 Ermittelte Werte nach Substanzapplikation

5.6.1 Phenobarbital

Phenobarbital ruft sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten Lebertumoren hervor (ROSSI et al., 1977; BUTLER, 1978; BECKER, 1982; DIWAN et al., 1986; EVANS et al., 1992). Die von uns verwendeten Mäusestämme zeigen jedoch eine unterschiedliche Anfälligkeit für Lebertumoren nach Phenobarbitalgaben. So kommt es bei der C57BL Maus im Gegensatz zur B6C3F1 Maus nicht zur Tumorentstehung (BECKER, 1982; DIWAN et al., 1986; EVANS et al., 1992). Als allgemeine Wirkung von Phenobarbital auf die Mäuseleber wird eine Vergrößerung des Organs von bis zu 38 % beschrieben (LIN et al., 1989; CUNNINGHAM et al., 1991; EVANS et al., 1992; KOLAJA et al., 1996c). Histologisch fällt eine Hypertrophie und deutliche Eosinophilie vor allem der perivenös liegenden Hepatozyten auf (LIN et al., 1989; JIRTLE et al., 1991; EVANS et al., 1992). Diese Veränderungen werden einer mikrosomalen Enzyminduktion (CUNNINGHAM et al., 1991), einer Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (LAKE et al., 1986; LIN et al., 1989) sowie einer vermehrten Induktion von Wachstumsfaktoren in diesem Bereich (ORTON et al., 1996) zugeschrieben. Beide von uns untersuchten Stämme wiesen ein erhöhtes relatives Lebergewicht zwischen 14,9 % und 36,6 % auf, wobei bei der B6C3F1 Maus die stärkeren Anstiege zu beobachten waren. Ebenso fanden sich bei beiden Stämme die in der Literatur beschriebenen histologischen Veränderungen.

5.6.1.1 Labelingindex

In der Literatur wird für beide von uns untersuchten Mäusestämme eine gesteigerte hepatozytäre Proliferation nach Phenobarbital-Applikation beschrieben, welche ihr Maximum nach 7-14 Tagen erreicht (SCHAFER und KLAUNIG, 1991; COUNTS et al., 1996; KOLAJA et al., 1996c; ORTON et al., 1996). Die maximale Proliferationsrate lag 2- bis 15-fach über den Kontrollwerten. Nach 4 Wochen (COUNTS et al., 1996; ORTON et al., 1996) fanden sich keine signifikanten Unterschiede im LI behandelter und unbehandelter Tieren. KOLAJA et al. (1996c) bestimmten den LI nach Phenobarbital-Gabe zonal und fanden die höchsten LI in der perivenösen Zone mit einem Maximum nach 1 Woche (> 6,5-fach). In dieser Zone war der LI auch nach 28 Tagen noch statistisch signifikant erhöht. WARD et al. (1988) konnten dagegen bei B6C3F1 Mäusen, die mit Phenobarbital (500 p.p.m.) behandelt wurden, keine erhöhte Zellproliferation feststellen, worauf sie die Zellteilungsrate als ungeeignetes Kriterium zur Beurteilung der Tumorgenese bewerteten.

Unsere Untersuchungen zeigten eine deutliche LI-Steigerung nach 1 Woche in allen Zonen und bei beiden Stämmen, wobei das Maximum mit 20,6-fach (B6C3F1 Maus) und 7,6-fach (C57BL Maus) erhöhten Werten in Zone 3 zu finden war. Nach 4 und 13 Wochen lagen die Gesamt-LI, zum größten Teil übereinstimmend mit der Literatur, wieder auf Kontrollniveau. Die von KOLAJA et al. (1996c) nach 4 Wochen beschriebenen noch erhöhten Werte in Zone 3 konnten für beide Stämme bestätigt werden (B6C3F1: 2,57 %; C57BL: 2,5 %). Nach 13 Wochen wurden keine erhöhten LI mehr in der Literatur beschrieben. Auch KOLAJA et al. (1996c) konnten keine zonal erhöhten LI nach 13 Wochen mehr feststellen. Unsere B6C3F1 Mäuse hingegen wiesen zu diesem Zeitpunkt ausschließlich in Zone 3 noch statistisch signifikante, 3-fach höhere Werte als die Kontrolltiere auf. Der LI der C57BL Maus war noch 2-fach über die Kontrollwerte erhöht, was jedoch nicht von statistischer Signifikanz war. Durch die zonale Auswertung konnten proliferationssteigernde Effekte auf bestimmte Hepatozytenpopulationen detektiert werden, die bei der Bestimmung des Gesamt-LI nicht aufgefallen waren. Dieser Effekt wurde wesentlich durch die deutlich verringerten LI in den Zonen 1 und 2 mit bedingt. Als mögliche Erklärung für die Abweichung zu den von KOLAJA et al. (1996c) ermittelten Werten kommen die oben beschriebenen Unterschiede in der zonalen Einteilung und die geringere ausgewertete Zellzahl in Betracht (s. 5.4.1). Jedoch fanden auch diese Autoren ebenso wie wir mit Hilfe der zonalen Auswertung nach 4 Wochen noch erhöhte LI, die von anderen Autoren bei zufälliger Meßfeldwahl nicht beschrieben wurden. Eine Ursache für das von WARD et al. (1988) beschriebene Ausbleiben einer Erhöhung des LI nach Phenobarbital-Gaben könnte in der Auswertstrategie gelegen haben.

Den Tieren wurden eine Stunde vor der Tötung intraperitoneal BrdU appliziert. Weiterhin wurden nur 1000 Zellen/Tier ausgewertet. Wie unsere Ergebnisse zeigen, werden mit Hilfe der einmaligen Pulse-Injektion nur sehr niedrige LI in der Leber erzielt. Werden dann bei einem geringen LI nur relativ wenige Zellen ausgewertet, erhöht sich die Gefahr, substanzbedingte Effekte zu übersehen.

Beim Vergleich der beiden Mäusestämme fällt auf, daß die C57BL Maus nach 1 Woche deutlich höhere LI aufweist. Nach 13 Wochen liegen sie jedoch alle unter den LI der B6C3F1 Maus. Der relative Anstieg gegenüber den Kontrollwerten war jedoch bei der B6C3F1 Maus zu allen Zeitpunkten am stärksten (bis zu 20,6-fach). Hier fanden sich auch nach 13 Wochen, im Gegensatz zur C57BL Maus, signifikant höhere LI in Zone 3. Beiden Stämmen war gemeinsam, daß die LI in Zone 1 nach einer Woche nicht deutlich von denen der Kontrolltiere abwichen und nach 4 und 13 Wochen sogar signifikant erniedrigt waren. Grund für diese selektive Proliferationssteigerung in Zone 3 könnte die von ORTON et al. (1996) bei C57BL Mäusen beschriebene Induktion von Wachstumsfaktoren (z. B. TGF α) in zentrolobulären Hepatozyten bei gleichzeitig verminderter Expression hemmender Faktoren (z. B. TGF β 1) sein. Phenobarbital wirkt außerdem induzierend auf das vor allem in Zone 3 vorkommende Cytochrom P450 (LAKE et al., 1986; LIN et al., 1989). In Zone 1 scheint es dagegen zu einer deutlichen Hemmung der Zellteilung zu kommen, deren Ursache jedoch noch nicht geklärt ist. Dies deutet jedoch ebenfalls auf das Vorhandensein einer Hepatozytenpopulation hin, die für die durch Phenobarbital induzierte mitogene Wirkung empfänglicher zu sein scheint.

5.6.1.2 Mitoseindex

Bei der Mitoserate fanden sich bei der B6C3F1 Maus nach 1 Woche nur in Zone 2 signifikant erhöhte Werte. In Zone 3 waren die Einzeltierwerte (0-0,39 %; Tab. 46-48) gegenüber denen der Kontrollgruppe (0-0,1 %; Tab. 40-42) erhöht, was sich jedoch in den Medianen aufgrund des niedrigen Niveaus nicht widerspiegelte. Die C57BL Maus wies in Zone 3 signifikant erhöhte Werte gegenüber der Kontrollgruppe auf (Tab. 13). Die absolut höchsten MI fanden sich bei der B6C3F1 Maus zu allen Zeitpunkten, bei der C57BL Maus nach 1 und 4 Wochen in Zone 2. In den übrigen Zonen konnten bei beiden Stämmen keine erhöhten MI festgestellt werden. Die MI korrelierten somit nach 1 Woche gut mit den LI, wobei hohe MI in den Zonen gefunden wurden, die ebenfalls hohe LI aufwiesen (B6C3F1: Zone 2; C57BL: Zonen 2 und 3). Bei Veränderungen im LI auf niedrigem Niveau erwies sich die Bestimmung der Mitoserate eindeutig als nicht sensitiv genug, um Aussagen über substanzbedingte

Veränderungen treffen zu können. Dadurch ist auch die fehlende Erhöhung der Mediane der Mitoserate in Zone 3, der Zielzone von Phenobarbital, zu erklären.

5.6.1.3 Apoptoseindex

Für Phenobarbital wird die Hemmung der Apoptose als ein möglicher Faktor in der Tumorentstehung beschrieben (BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1989; KOLAJA et al., 1996b). Der Einfluß von Phenobarbital auf die Apoptoserate war in unserer Untersuchung schwer zu beurteilen, da schon die Kontrollwerte der AI auf sehr niedrigem Niveau bis zu 0 % lagen. Bei der C57BL Maus fanden sich in den Einzeltierwerten der Kontrollgruppe nach 1 Woche AI zwischen 0 % und 0,31 % in Zone 3 (Tab. 85-87). Die mit Phenobarbital behandelten Tiere wiesen zum selben Zeitpunkt in Zone 3 keine apoptotische Aktivität auf (Tab. 91-93). Zu anderen Beobachtungszeitpunkten und bei der B6C3F1 Maus war aufgrund der niedrigen Kontrollwerte keine Aussage zu einer veränderten Apoptoserate möglich.

5.6.2 Chloroform

In der Leber der B6C3F1 Maus kommt es nach Chloroformverabreichung zur vermehrten Tumorentstehung (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1976). Die Tumorentstehung ist jedoch abhängig von der Applikationsart (LARSON et al., 1993; LARSON et al., 1994a; PEREIRA, 1994; GEMMA et al., 1996; PEREIRA und GROTHAUS, 1997). Durch den Chloroform-induzierten Zelluntergang in der Leber kommt es zur regenerativen Zellproliferation (REITZ et al., 1982; REITZ et al., 1990; BUTTERWORTH et al., 1995), was später zum Auftreten von Tumoren führen soll. Unterbleiben die zytotoxischen Effekte, findet keine vermehrte regenerative Zellproliferation statt, was als Begründung für das Ausbleiben von Tumoren gewertet wird (BUTTERWORTH et al., 1995).

Bei der Verabreichung von Chloroform an Mäuse via Schlundsonde kam es bei B6C3F1 Mäusen zu einem Rückgang des Körpergewichtes von bis zu 20 % (LARSON et al., 1994d). Weiterhin werden ein Verlust der Eosinophilie, Bildung von Vakuolen und Nekrosen vor allem im zentrolobulären Bereich beschrieben (LARSON et al., 1993; 1994a; 1994c; 1994d; 1996; PEREIRA, 1994). Bei unseren Untersuchungen wiesen beide Stämme ein reduziertes Körpergewicht (B6C3F1: bis zu 4,7 %; C57BL: bis zu 9,6 %) sowie ein erhöhtes relatives Lebergewicht auf (B6C3F1: bis zu 21,6 %; C57BL: bis zu 28 %). Auch die beschriebenen histopathologischen Veränderungen konnten wir für beide Stämme in unterschiedlichem

Ausmaß bestätigen. Unterschiede zwischen beiden Stämmen fanden sich in der Überlebensrate (B6C3F1: 100 %; C57BL: 70 %). Die C57BL Maus gilt als relativ resistent gegenüber Chloroform-bedingten Schädigungen (HILL et al., 1975; PERICIN und THOMANN, 1979; ROE et al., 1979) was im Gegensatz zu der von uns gefundenen geringeren Überlebensrate steht. Da der BASF AG-Routinesektionsplan keine pathologische Untersuchung der verstorbenen Tiere vorsah, können andere Todesursachen, wie z. B. Fehlsondierungen, nicht ausgeschlossen werden. Die von PERICIN und THORMANN (1979) ermittelte LD₅₀ für männliche C57BL Mäuse betrug 460 mg/kg Körpergewicht. Die von uns verwendete Dosis von 120 mg/kg Körpergewicht lag deutlich unter der von PERICIN und THORMANN (1979) ermittelten LD₅₀, was auf eine andere Todesursache als die Toxizität von Chloroform hinweisen könnte.

5.6.2.1 Labelingindex

In der Mäuseleber konnten nach Chloroformgaben deutlich gesteigerte Zellteilungsraten ermittelt werden: LARSON et al. (1994a) verabreichte 9 Wochen alten B6C3F1 Mäusen 138 mg/kg Chloroform via Schlundsonde für 4 Tage bzw. 3 Wochen. Der LI wurde mit einer 3,5 Tage BrdU-Pumpe in 1000 Hepatozyten/Tier bestimmt. Es wurde eine gleichmäßige Verteilung der gelabelten Zellen in der Leber beschrieben. Die LI waren 20,5- und 16,25-fach gegenüber den Kontrollwerten erhöht. GEMMA et al. (1996) bestimmten in männlichen B6C3F1 Mäusen die Zellproliferationsrate als gelabelte Kerne/mm² Leberfläche, nachdem die Tiere eine einmalige orale Applikation von 150 mg/kg Körpergewicht Chloroform erhalten hatten. Sie fanden dabei die höchste Zellteilungsrate mit 60 gelabelten Kerne/mm² nach 48 h, was nach ihren Angaben einem LI von 2,6 % entspricht.

Die eigenen Untersuchungen ergaben bei der B6C3F1 Maus nach 1 und 4 Wochen einen Gesamt-LI von 5,04 % und 10,40 %. Sie liegen damit nach 1 Woche unter, nach 4 Wochen jedoch über den Werten (12,3 % und 6,5 %) von LARSON et al. (1996). Ursachen hierfür dürften in der von LARSON et al. (1996) verwendeten höheren Dosierung, dem bei Versuchsbeginn geringerem Alter der Tiere und der unterschiedlichen Auswertstrategie liegen. Die von GEMMA et al. (1996) ermittelten sehr niedrigen Werte resultieren vermutlich aus der nur einmaligen Chloroform-Applikation. Kommt es zur Kumulation sehr hoher Chloroformkonzentrationen, was bei mehrmaliger Applikation der Fall ist, werden die Abwehrmechanismen der Leber erschöpft (PEREIRA, 1994). In nicht zu hohen Dosen und bei einmaliger Applikation kann die Leber den Abbau ohne deutlich sichtbaren Schaden bewältigen. Zur zonalen Auswertung der Mäuseleber nach Chloroformbehandlung lagen noch

keine Studien vor. Bei der Ratte wurde der höchste LI-Anstieg nach 1 Woche in Zone 1 beobachtet, nach 13 Wochen war er in Zone 3 zu finden (RABES et al., 1976; STEPHAN, 2001). In unserer Studie wiesen beide Mäusestämme ebenfalls den stärksten LI-Anstieg nach 1 Woche in Zone 1 auf (B6C3F1: 6,8-fach; C57BL: 9,4-fach). In der B6C3F1 Maus konnte nach 4 Wochen eine Verschiebung des höchsten Anstiegs zur Zone 3 beobachtet werden (16,6-fach), nach 13 Wochen war jedoch mit einer 5,1-fachen Steigerung wieder in Zone 1 der höchste LI-Anstieg zu finden, wobei auch die Zonen 2 und 3 noch gesteigerte LI aufwiesen (4,1- und 3,2-fach). Übereinstimmend mit der Literatur wurde ein Rückgang der LI beobachtet, wobei das Maximum, wie auch in der Kontrollgruppe, nach 4 Wochen zu finden war.

Die C57BL Maus wies hingegen nur zum 1 Wochen-Zeitpunkt stark erhöhte LI in allen Zonen mit Maximum in Zone 1 auf. Zu den restlichen 2 Behandlungszeitpunkten wichen die LI nicht statistisch signifikant von den Kontrollwerten ab. Als mögliche Ursache für diese stammesspezifischen Unterschiede kommt die geringere Sensibilität der C57BL Maus gegenüber Chloroform in Betracht (HILL et al., 1975; PERICIN und THOMANN, 1979; ROE et al., 1979). Da ein toxisch bedingter Tod bei den 9 verstorbenen Tieren nicht völlig ausgeschlossen werden kann, muß ebenfalls eine unterschiedliche tierspezifische Sensibilität für Chloroform innerhalb des C57BL Stammes in Betracht gezogen werden.

5.6.2.2 Mitoseindex

In Zone 2 korrelierte die Mitoserate bei der B6C3F1 Maus weitgehend mit den LI (Zone 2 zu allen Zeitpunkten: 0,13-0,55 %, Zone 3 nach 4 Wochen: 0,11 %). In Zone 1 fanden sich keine gesteigerten MI. Die Einzeltierwerte waren zu den verschiedenen Zeitpunkten geringgradig gegenüber den Kontrollwerten erhöht (Tab. 52-54). Bei der C57BL Maus fanden sich nur in Zone 2 nach 1 und 4 Wochen erhöhte MI, die zum 1 Wochen-Zeitpunkt mit dem erhöhten LI korrelierten.

Die MI beider Mäusestämme korrelierten nach Chloroformgabe ebenfalls gut mit den LI der Zonen, die hohe absolute Werte aufwiesen. In Zonen mit geringeren LI (Zone 1 und 3) fand sich eine nur schlechte Übereinstimmung mit der Mitoserate. Dies entsprach unseren Beobachtungen bei der Behandlung mit Phenobarbital, wo ebenfalls gute Korrelationen des MI mit dem LI in Zonen hoher Zellteilungsaktivität festgestellt werden konnten.

5.6.2.3 Apoptoseindex

In der Literatur fanden sich keine Angaben zu veränderten Apoptoseraten bei Mäusen nach Chloroformbehandlung. Bei unserer Untersuchung zeigte die B6C3F1 Maus nur nach 13 Wochen in Zone 2 und dadurch resultierend auch im Gesamt-AI signifikant gesteigerte Werte. Bei Betrachtung der Einzeltierwerte (Tab. 55-57) fiel gegenüber den Kontrolltieren eine vermehrte apoptotische Aktivität vor allem in Zone 2 auf, wobei es zu einer kontinuierlichen Zunahme über 13 Wochen kam (0,10-0,49 %). Die C57BL Maus wies in Zone 2 nach 1 Woche signifikant erhöhte AI auf. Zu den übrigen Zeitpunkten konnte aber auch bei den Einzeltierwerten (Tab. 97-99) keine deutliche Abweichung gegenüber den Kontrolltieren mehr festgestellt werden. Beide Stämme zeigten korrespondierend zur erhöhten Zellteilungsrate eine gesteigerte Apoptoserate. Der Apoptose kommt als Gegenspieler zur Zellteilung die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase zu (FERGUSON und ANDERSON, 1981; BURSCH et al., 1994; CONSTAN et al., 1996). Da Chloroform in seiner Wirkungsweise keine Hemmung der Apoptoserate zugeschrieben wird, könnte die leicht verstärkte Apoptoseinduktion eine regulatorische Maßnahme sein, einer überschießenden regenerativen Zellproliferation entgegenzuwirken. So fanden auch CONSTAN et al. (1996) bei Ratten, denen Verunreinigungen aus dem Grundwasser verabreicht wurde, korrespondierend zur gesteigerten Zellproliferation eine erhöhte Apoptoserate. Damit übereinstimmend wurden bei der C57BL Maus nach 4 und 13 Wochen weder erhöhte LI noch AI gefunden.

5.6.3 Wyeth 14,643

Die Gruppe der Peroxisomenproliferatoren ruft sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten Lebertumoren hervor (LAWANI et al., 1982; REDDY und LAWANI, 1983; RAO et al., 1988b; ISENBERG, et al., 1997). Nach Wyeth 14,643-Applikation kam es bei Ratten und der CS^b Maus in der Leber zur Tumorentstehung (REDDY et al., 1979). Wir verwendeten Wyeth 14,643 als Positivsubstanz, da eine deutliche Erhöhung der Zellproliferationsrate in Mäuselebern beschrieben wurde (LANIER et al., 1989; ELDRIDGE et al., 1990; CUNNINGHAM et al., 1995; ISENBERG et al., 1997). In der Leber behandelter Tiere kommt es zu einem deutlich erhöhten Organgewicht, einer durch Peroxisomenproliferation hervorgerufenen Hepatozytenhyperplasie und -hypertrophie und einer vermehrten eosinophilen Granulierung der Hepatozyten (REDDY et al., 1977; MOODY und REDDY, 1978; LANIER et al., 1989; ELDRIDGE et al., 1990; LUNDGREN et al., 1990; ISENBERG et al., 1997).

In unserer Studie wiesen beide Mäusestämme ein hochgradig erhöhtes Lebergewicht auf (bis zu 152 %). Übereinstimmend mit der Literatur fand sich weiterhin eine Hypertrophie der Hepatozyten und die eosinophile Granulierung des Zytoplasma. Außerdem wiesen 7 von 29 Lebern der B6C3F1 Maus mehrere herdförmige bis konfluierende Nekrosen auf. Bei der C57BL Maus fanden sich die Nekrosen in insgesamt 16 von 30 Lebern. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der Nekrosen wäre eine zytotoxische Wirkung von Wyeth 14,643. Dies könnte im Zusammenhang mit dem für diese Substanzklasse diskutierten oxidativen Streß stehen (s. 2.2.3). NICOTERA et al. (1992) zeigten an isolierten Pankreaszellen, daß oxidativer Streß aufgrund der Störungen der Signaltransduktion der Zelle in geringem Ausmaß zu einer gesteigerten Zellproliferation führte. Stärkere Konzentrationen oxidativ wirkender Substanzen aktivierten jedoch verschiedene intrazelluläre Mechanismen (z. B. Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration), was zu einer gesteigerten Apoptoserate führen kann. Letztlich kam es in Folge der stark gestörten Signalübermittlung und der katabolen Reaktionslage zur Entstehung von Nekrosen.

5.6.3.1 Labelingindex

ELDRIDGE et al. (1990) fanden bei über 5 Tage mit Wyeth 14,643 behandelten B6C3F1 Mäusen LI von 28 %. In unserer Studie wiesen die Mäuse nach 1-wöchiger Behandlung ähnliche LI auf (B6C3F1: 30,85 %; C57BL: 33,34 %). Die von ELDRIDGE et al. (1990) gefundenen, etwas geringeren Werte lassen sich auf die Verwendung einer 6 Tage-Pumpe und eine kürzere Substanzapplikation (5 Tage) zurückführen. CUNNINGHAM et al. (1995) ermittelten LI von über 60 %. Die differierenden LI sind eventuell durch das unterschiedliche Alter der Tiere und die unterschiedliche Auswertstrategie zu erklären. Wenn vor allem in der Zone mit der stärksten Zellteilung (Zone 1) ausgewertet wird, was bei einer zufälligen Wahl der Meßfelder nicht ausgeschlossen werden kann, werden deutlich höhere LI ermittelt (B6C3F1: 46,23 %; C57BL: 55,53 %). SMITH et al. (1991) fanden in CD-1 Mäusen, die Wyeth 14,643 erhielten, über 5 Wochen eine anhaltend gesteigerte Zellproliferationsrate. Wir konnten dies bei beiden Stämmen sogar über einen Zeitraum von 13 Wochen demonstrieren. Bei der Ratte wurde nach Wyeth 14,643-Gaben ein vermehrt periportales Labelingmuster beschrieben (MARSMAN et al., 1988; ELDRIDGE et al., 1990; SMITH et al., 1991; STEPHAN, 2001), wohingegen für Mäuse eine panlobuläre Verteilung der gelabelten Hepatozyten beschrieben wurde (ELDRIDGE et al., 1990; SMITH et al., 1991). ISENBERG et al. (1997) ermittelten bei initiierten B6C3F1 Mäusen in der periportal Zone einen 5,2-fach erhöhten LI im Gegensatz zu einem 3,6-fach erhöhten LI in der zentrolobulären Zone.

Im Rahmen der zonalen Auswertung fanden wir bei beiden Mäusestämmen und zu allen 3 Zeitpunkten die stärkste Erhöhung der Zellteilungsrate in Zone 1, wobei nach 1 Woche die deutlichsten Anstiege zu finden waren (B6C3F1 Maus: 165,1-fach; C57BL Maus: 48,3-fach). Die durch Wyeth 14,643 hervorgerufenen, in der gesamten Leber erhöhten LI können ein panlobuläres Muster vortäuschen. So kann das Übersehen der Zone 1 als Hauptproliferationszone erklärt werden. Die absolut höchsten LI in Zone 2 erschweren das Erkennen der höchsten Proliferationssteigerungsrate in Zone 1 noch zusätzlich.

Beim Vergleich beider Mäusestämmen fiel in allen Zonen ein initialer Peak nach 1 Woche auf. Nach 4 Wochen kam es bei beiden Stämmen zu einem Abfall der LI in allen Zonen und nach 13 Wochen zu einem erneuten deutlichen Anstieg, letzteres mit Ausnahme der Zone 1 der B6C3F1 Maus. Die C57BL Maus zeigte bis auf den Behandlungszeitpunkt von 1 Woche stärkere Anstiege des LI als die B6C3F1 Maus. Dies korrelierte mit den bei der C57BL Maus vermehrt aufgetretenen herdförmigen Nekrosen (C57BL: 16 von insgesamt 30 Lebern betroffen, B6C3F1: 6 von insgesamt 29 Lebern betroffen). Somit kann ein regenerativer Mechanismus als Ursache der Zellproliferationssteigerung nicht ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen zur Wirkung von Peroxisomenproliferatoren, im Besonderen von Wyeth 14,643, auf die Lebern dieser beiden Mäusestämmen wären notwendig, um diesen Effekt besser beurteilen zu können.

Eine mögliche Erklärung für das von uns gefundene Absinken des LI nach 4-wöchiger Behandlung könnte in einer Erschöpfung der räumlichen Kapazitäten der Leber aufgrund der extremen Zellproliferation liegen. Die nach 4 Wochen gesteigerte Apoptoserate und die auftretenden Nekrosen führen zu einer Abnahme der Zellzahl, was möglicherweise eine erneute Erhöhung des LI zulässt.

5.6.3.2 Mitoseindex

Bei beiden Mäusestämmen kam es nach 1 Woche zu einem deutlichen Anstieg der MI mit Ausnahme der Zone 3. Der stärkste Anstieg fand sich korrespondierend zum höchsten LI in Zone 1 der B6C3F1 Maus (0,23 %). In Zone 2 konnte der Abfall der LI nach 4 Wochen und der Wiederanstieg nach 13 Wochen nachvollzogen werden (B6C3F1 Maus: 0,30 %, 0,10 % und 0,24 %; C57BL Maus: 0,75 %, 0,53 % und 0,71 %). In den Zonen 1 und 3 fand sich eine nur schlechte Übereinstimmung mit den LI. Es zeigte sich auch hier, wie in den vorangegangenen mit Substanzen behandelten Gruppen, eine relativ gute Korrelation des MI mit den LI in Zone 2, der Zone mit der höchsten Zellteilungsrate. In den übrigen Zonen konnte nur eine mäßige Übereinstimmung festgestellt werden.

5.6.3.3 Apoptoseindex

Für die Gruppe der Peroxisomenproliferatoren wird die Hemmung der Apoptoserate als ein Mechanismus der kanzerogenen Wirkung beschrieben (BAYLY et al., 1994; ROBERTS et al., 1995; JAMES und ROBERTS, 1996). Diese Daten wurden jedoch zum größten Teil durch in vitro Versuche, nicht aber in der Mäuseleber und nicht mit der von uns verwendeten Substanz Wyeth 14,643 ermittelt. Sowohl in Ratten- als auch in Mäuselebern wurde nach der Behandlung mit Wyeth 14,643 eine Erhöhung der Apoptoserate festgestellt (Ratte bis zu 4-fach; Maus bis zu 1,6-fach) (ISENBERG et al., 1997; MARSMANN et al., 1992; STEPHAN, 2001). Die Tiere unserer Studie wiesen mit Ausnahme der Zone 1, wo der AI zu allen 3 Zeitpunkten bei 0 % lag, erhöhte AI auf. Hierbei fiel bei der B6C3F1 Maus eine kontinuierliche Steigerung in den Zonen 2 und 3 über 13 Wochen auf (Zone 2: 0,1 %, 0,15 % und 0,29 %; Zone 3: 0,19 %, 0,40 %, und 0,64 %). Die C57BL Maus wies erst nach 4 Wochen in den Zonen 2 und 3 erhöhte AI auf (Zone 2: 0,28 % und 0,24 %; Zone 3: 1,02 % und 1,20 %). Die höchsten Werte waren bei beiden Stämmen in der Zone 3 zu finden. Bei der C57BL Maus fand sich mit 1,2 % der absolut höchste AI.

ISENBERG et al. (1997) bestimmten den AI bei zuvor initiierten Mäusen, was die im Vergleich zu den von uns ermittelten höhere Werte erklären könnte. McCONKEY et al. (1988) wiesen in isolierten Hepatozyten Chromatinkondensation sowie DNA-Fragmentation nach, nachdem sie die Zellen oxidativem Streß ausgesetzt hatten. Sie machten den oxidativen Streß der Zelle für die Aktivierung von Prozessen verantwortlich, die der Apoptose sehr ähnlich sind. NICOTERA et al. (1992) beschrieben in Zellkulturen ebenfalls apoptotische Vorgänge, wenn die Zellen in geringen Ausmaß oxidativem Streß ausgesetzt wurden. Dieser Wirkmechanismus ist für Wyeth 14,643 jedoch noch nicht nachgewiesen. Trotz der sehr hohen LI in Zone 1 nach 1 Woche fanden sich hier keine vermehrten Apoptosen. Eventuell fand eine selektive Hemmung der Apoptose in Zone 1 statt, was jedoch aufgrund der zu geringen Kontrollwerte nicht belegt werden konnte.

5.7 Bedeutung der zonalen Zellproliferation

Am Beispiel von Phenobarbital konnten wir für beide Mäusestämme zeigen, daß die getrennte Auswertung der unterschiedlichen Hepatozytenpopulationen für die Beurteilung der substanzbedingten Veränderung in der Zellproliferationsrate unerlässlich ist. Übereinstimmend mit der Literatur fand sich bei Bestimmung des Gesamt-LI ein initialer Anstieg, zu späteren

Zeitpunkten nur ein geringgradiger Anstieg (1,2-fach) und bei der C57BL Maus sogar ein geringer Abfall (0,9-fach) gegenüber den Kontrolltieren. Mit Hilfe der LZM-Methode konnten jedoch in der Zielzone von Phenobarbital (Zone 3) nach 4 Wochen (B6C3F1: 6,6-fach; C57BL: 3,8-fach) und auch nach 13 Wochen (B6C3F1: 3-fach; C57BL: 2-fach) noch erhöhte LI nachgewiesen werden. Der Umgang mit transienten Zellproliferationssteigerungen gilt im Hinblick auf die Beurteilung eines kanzerogenen Potentials als schwierig (JIRTLE et al., 1991). Für die Ratte wurden Zellproliferationserhöhungen über einen Zeitraum von 1 Woche nach Phenobarbitalgaben beschrieben (PERAINO et al., 1975), wohingegen für die Tumorpromotion eine kontinuierliche Verabreichung von Phenobarbital über mindestens 3 Monate nötig sein soll (PREAT et al., 1987). Hiermit wurde nun erstmals für Phenobarbital ein anhaltend erhöhter LI in der Leber von bis zu 13 Wochen nachgewiesen.

Für zytotoxisch wirkende Substanzen wie Chloroform wird für die Ratte ein initialer Peak der Zellproliferation in Zone 1 beschrieben, der dann im zeitlichen Verlauf zur Zone 3 wandert (RABES et al., 1976; LEE et al., 1998). Unter Chloroformbehandlung war nach 1 Woche bei beiden Stämmen Zone 1 die Hauptproliferationszone (B6C3F1: 6,8-fach; C57BL: 9,4-fach). Bei der B6C3F1 Maus fanden sich in Zone 2 jedoch annähernd gleich große Anstiege im LI (6,4-fach). Wir konnten bei diesen Mäusen nach 4 Wochen eine Verschiebung der Hauptproliferationszone zur Zone 3 beobachten. Nach 13 Wochen lag sie jedoch wieder in Zone 1. Die absolut höchsten Werte fanden sich jedoch zu allen 3 Zeitpunkten deutlich in Zone 2 (11,0-17,3 %). Für die B6C3F1 Maus kann somit nur zum Teil das für die Ratte beschriebene, durch zytotoxische Substanzen hervorgerufene Proliferationsmuster bestätigt werden. Eine Erklärung für die hohen LI in Zone 2 könnte mit den gefundenen histopathologischen Veränderungen, die vorrangig in dieser Zone auftraten, im Zusammenhang stehen. Dies würde bedeuten, daß sich in dem Gebiet, in dem Zellen untergehen, noch intakte Zellen teilen und so die Verluste auszugleichen versuchen.

Der Grund für das „Wandern“ der Proliferationszonen muß zur Zeit noch offen bleiben. Es kann nach längerandauernder Verabreichung zytotoxischer Substanzen eine Ausweitung der Regenerationstätigkeit der Hepatozyten auf andere Zonen als der Hauptangriffszone der Leber in Betracht gezogen werden. Die absolut höchsten LI finden sich jedoch vor allem im Bereich der zytotoxischen Wirkung.

Nach der Behandlung mit Wyeth 14,643 fanden sich bei beiden Mäusestämmen die deutlichsten Anstiege der Zellteilungsrate in Zone 1. Dieser Effekt fiel bei einfacher

Betrachtung der Schnitte aufgrund der insgesamt hohen LI nicht weiter auf. In der Literatur wird für die Maus nach der Gabe von Wyeth 14,643 ein panlobuläres Labelingmuster beschrieben (ELDRIDGE et al., 1990; SMITH et al., 1991). In diesen Studien wurde jedoch keine differenzierte zonale Auswertung vorgenommen. Somit kann das Vorhandensein einer Zielzone einer bestimmten Substanz übersehen werden, insbesondere wenn in allen Zonen relativ hohe LI vorliegen, was bei der Behandlung mit Wyeth 14,643 der Fall war.

5.8 Beurteilung der Mitose- und Apoptoserate

Bei Betrachtung des MI fand sich eine gute Korrelation mit dem LI bei beiden Mäusestämmen in Zone 2. Dies traf sowohl für unbehandelte Lebern als auch nach Substanzapplikation zu. In den übrigen Zonen konnte nur eine mäßige bis nicht vorhandene Übereinstimmung beobachtet werden. Wir führen dies auf die generell hohe Zellteilungsrate in Zone 2 zurück. Bei unbehandelten Tieren fanden sich zu 100 % die höchsten LI in Zone 2, bei Tieren mit Substanzapplikation traf dies noch in 67 % der Fälle zu. Da die Mitosephase innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne (~1 Stunde) durchlaufen wird, ist vor allem in postmitotischem Gewebe wie der Leber die Wahrscheinlichkeit, dieses Ereignis zu entdecken, relativ gering. Mit gesteigerter Teilungsrate erhöht sich die Chance, ein solches Ereignis zu detektieren, was sich in unserer Untersuchung in der relativ hohen Mitoserate in Zone 2 widerspiegelt. Für die Mäuseleber stellt die Mitoserate somit keine geeignete Methode dar, substanzbedingte Unterschiede zu bestimmen und zu bewerten. Für die Zone 2 konnten wir jedoch den Nachweis erbringen, daß MI und LI gut korrelieren. Dies spricht dafür, daß schließlich die in der S-Phase markierten Zellen auch die Mitosephase durchlaufen.

Eine Beurteilung der Apoptoserate fiel aufgrund der sehr geringen Kontrollwerte schwer. Es konnte somit auch keine substanzbedingte Hemmung der Apoptoserate nachgewiesen werden, was z. B. für Phenobarbital beschrieben wurde (BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1989). Für die Apoptoserate werden auch in der Literatur nur sehr geringe Werte angegeben, weshalb eine Beurteilung generell als schwierig einzustufen ist. Da die mit Hilfe der LZM-Methode ermittelten Werte jedoch unter den in der Literatur angegebenen AI liegen, sollte für zukünftige Arbeiten eine Methode angewandt werden, bei der eine größere Anzahl an Feldern und Zellen ausgewertet werden. Allerdings konnte die für die Klasse der Peroxisomenproliferatoren beschriebene Hemmung der Apoptose nicht bestätigt werden. Für Wyeth 14,643, ein Mitglied dieser Klasse, konnten wir die absolut höchsten AI der gesamten Studie ermitteln.

5.9 Bedeutung der gesteigerten Zellproliferation und Unterschiede zwischen den Mäusestämmen

Es bestehen noch immer Schwierigkeiten bei der Beurteilung von Zellproliferationsdaten im Zusammenhang mit der Tumorenstehung. Für einige Substanzen konnte eine gute Korrelation zwischen gesteigerter Zellproliferation und der Tumorentstehung gefunden werden (MARSMAN et al., 1988; BUTTERWORTH et al., 1995). Ein großes Problem für die Beurteilung stellen nach wie vor Substanzen dar, welche nur einen transienten Anstieg der Zellproliferation hervorrufen.

Die Entstehung von Tumoren konnte bei der B6C3F1 Maus nach Verabreichung von Chloroform beobachtet werden (National Cancer Institute, 1976). Die von uns gemessene Zellproliferation korreliert bei Chloroform gut mit der in der Literatur beschriebenen Tumorentstehung. Bei der B6C3F1 Maus war der Gesamt-LI mindestens 4-fach, die zonalen LI mindestens 3-fach über die Dauer von 13 Wochen erhöht. Für die C57BL Maus hingegen wurde bisher kein Auftreten von Tumoren nach Chloroformapplikation beschrieben. Hier fand sich ein deutlicher Anstieg in der Zellproliferation nach 1 Woche (bis zu 9-fach). Nach 4 und 13 Wochen waren nur noch in Zone 2 sehr gering erhöhte LI vorhanden (2-fach und 1,2-fach), die übrigen Zonen lagen zum Teil sogar unterhalb der Kontrollwerte. Hier stellt sich das Problem der Beurteilung vorübergehend erhöhter LI. In der von ROE et al. (1979) durchgeführten Studie wurde mit einer weit niedrigeren Dosierung als in der Studie des National Cancer Institute gearbeitet. Es müßte deshalb abgeklärt werden, ob nicht ähnliche Dosierungen, wie sie in der Studie mit der B6C3F1 Maus verwendet wurden, auch bei der C57BL Maus zu Tumoren führen würden. Bei der Zellproliferationsrate zeigte die C57BL Maus mit ihrem Anstieg für nur 1 Woche jedoch eine deutliche Resistenz gegenüber Chloroform verglichen mit der B6C3F1 Maus, die eine gesteigerte Zellteilungsrate von über 13 Wochen aufwies. Dies könnte somit ein wichtiger Faktor in der unterschiedlichen Tumoranfälligkeit darstellen. Auch werden trotz der zytotoxischen Wirkung und vorhandener Nekrosen bei der C57BL Maus keine deutlich erhöhten LI nach 4 und 13 Wochen beobachtet. Es besteht somit die Möglichkeit, daß die C57BL Maus die Fähigkeit besitzt, ihre Zellteilungsrate im Vergleich zur B6C3F1 Maus besser zu kontrollieren.

Die beschriebene, durch Phenobarbital hervorgerufene transiente Steigerung der Zellproliferation (COUNTS et al., 1996; KOLAJA et al., 1996c; ORTON et al., 1996; SCHAFER und KLAUNIG, 1991) verursachte Probleme bei der Korrelation mit der für die B6C3F1 Maus gefundenen Tumorentstehung. Unsere Daten weisen nun erstmals eine gute Korrelation der Zellproliferation über 13 Wochen auf. Hierbei ist jedoch eine zonale Auswertung unerlässlich,

da nur in Zone 3 der B6C3F1 Maus andauernd mindestens 3-fach erhöhte LI detektiert werden konnten. Bei alleiniger Betrachtung des Gesamt-LI zum Zeitpunkt von 13 Wochen konnte keine deutliche Abweichung zwischen behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden. Dies bekräftigt nochmals die Wichtigkeit der zonalen Auswertung.

Bei der C57BL Maus kommt es nach Phenobarbitalgaben jedoch nicht zur Tumorentstehung. Dennoch weist sie in Zone 3 nach 13 Wochen noch 2-fach erhöhte LI auf. Es besteht somit die Möglichkeit, daß in diesem Fall noch weitere Faktoren einen Einfluß auf die Tumorentstehung haben. So kann die C57BL Maus im Gegensatz zur B6C3F1 Maus trotz der durch Phenobarbital gesteigerten Zellproliferation den Methylierungsstatus der DNA aufrechterhalten (RAY et al., 1994; COUNTS et al., 1996). Dem verringerter Methylierungsstatus der DNA wird ebenfalls ein tumorigenes Potential zugeschrieben (RAZIN und KAFRI, 1994). Außerdem wurde in Hepatozyten der B6C3F1 Maus nach Phenobarbital Exposition eine Hemmung der interzellulären Kontakte festgestellt, die bei der C57BL Maus unbeeinflusst blieben. (KLAUNIG und RUCH, 1987; RUCH et al., 1987). Dies stellt einen weiteren Mechanismus der Tumorentstehung dar, der substanzbedingt beeinflusst wird (TROSKO und GOODMAN, 1994). So scheinen zusätzlich zur erhöhten Zellteilungsrate andere stammspezifische Unterschiede einen Einfluß auf die Tumorentstehung oder deren Hemmung zu haben.

Wyeth 14,643 rief bei beiden Stämmen die stärkste Zellproliferationssteigerung hervor, die über den gesamten Beobachtungszeitraum und in allen Zonen mindestens 3,7-fach gegenüber den Kontrolltieren erhöht war. Eine Korrelation mit der Tumorentstehung war aufgrund fehlender Untersuchungen zum Auftreten von Tumoren nach unserem Behandlungsprotokoll bei beiden Stämmen nicht möglich. Für Ratten wurde eine gute Übereinstimmung zwischen einer Wyeth 14,643-induzierten Zellproliferationssteigerung und einer erhöhten Tumorrates beschrieben (MARSMAN et al., 1988). Bei CS^b Mäusen kam es nach der Applikation von Wyeth 14,643 zu einer erhöhten Tumorrates (REDDY et al., 1979). Dies läßt in Anbetracht der über 13 Wochen so deutlich erhöhten Zellteilungsrate den Verdacht zu, daß es auch bei den von uns untersuchten Stämmen zur Tumorentstehung gekommen wäre. Um dies letztlich zu klären, ist ein Nachweis des kanzerogenen Potentials von Wyeth 14,643 in den Lebern dieser beiden Mäusestämme notwendig.

5.10 Beitrag zu einer Datenbank für Zellproliferationsdaten

Diese Arbeit soll einen Beitrag zu der von GOLDSWORTHY et al. (1991) geforderten Datenbank für chemisch induzierte Zellproliferation leisten. Nur anhand einer ausreichend großen Datenmenge über Zellproliferationsstudien kann ein besseres Verständnis der kausalen Zusammenhänge von Dauer, Höhe und Ursache einer vermehrten Zellteilung und einer späteren Tumorentstehung erzielt werden. Als Voraussetzung für die Einrichtung einer solchen Datenbank fordern GOLDSWORTHY et al. (1991) standardisierte Bedingungen, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Studien zu erreichen. Unsere Studie entspricht in weiten Teilen diesen Anforderungen: um die tierspezifischen Schwankungen möglichst gering zu halten, wurden 10 Tiere pro Gruppe eingesetzt. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 10 Wochen alt, so daß nicht mit vermehrten Ausreißern beim LI aufgrund des unterschiedlichen Größenwachstums junger Tiere zu rechnen war. Die Messungen fanden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten und über einen Zeitraum von 13 Wochen statt, um den Verlauf und die Dauer der Proliferationssteigerung beurteilen zu können. Mit den ausgewerteten 3000 Hepatozyten/Leber liegen wir deutlich über der üblichen Anzahl von 1000 bis 2000 ausgewerteten Zellen. Durch Anwendung der LZM-Methode erhielten wir für den Gesamt-LI vergleichbare Ergebnisse, wie sie in der Literatur beschrieben wurden. Als deutlicher Vorteil hat sich dabei die zusätzliche Möglichkeit der getrennten Betrachtung der 3 Zonen erwiesen, wodurch substanzbedingte zonale Effekte erfaßt werden konnten. Dadurch konnte z. B. für Phenobarbital erstmals eine bis zu 3-fach gesteigerte Zellteilungsrate in Zone 3 über einen Behandlungszeitraum von 13 Wochen und damit eine gute Korrelation zur Tumorentstehung nachgewiesen werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß Änderungen in der Zellproliferationsrate entdeckt werden können, die bei einer zufälligen Wahl der Meßfelder bisher nicht beschrieben wurden.

6 Zusammenfassung

1. In der Literaturübersicht wird ein Überblick über die Bedeutung der Zellproliferation für die chemische Karzinogenese vermittelt. Es finden sich Angaben zu den verschiedenen Proliferationsmarkern und Auswertungsstrategien, die in Zellproliferationsstudien der Mäuseleber Anwendung finden. Es wird dabei im Besonderen auf die Bedeutung der Zonalität der Leber im Zusammenhang mit der Erhebung von Zellproliferationsdaten eingegangen.
2. Zur Untersuchung stand Lebergewebe zweier Mäusestämme aus S-Phasen-Response Studien der Abteilung Toxikologie der BASF AG zur Verfügung. Bei den Mäusen handelte es sich um männliche Tiere, die zu Beginn der Studien 10 Wochen alt waren. Die B6C3F1 Maus gilt als anfällig für die Entwicklung von Lebertumoren, während sich die C57BL Maus als tumorresistent erwiesen hat.
3. Um die notwendige Verweildauer für optimale Labelingergebnisse zu eruieren, wurde der Zellproliferationsmarker BrdU mittels einer für 7 oder 3 Tage subkutan implantierten osmotischen Minipumpe oder einer einmaligen intraperitonealen Injektion appliziert. Bei beiden Mäusestämmen erwies sich nur die 7-Tage Pumpe als geeignet, ausreichend hohe Labelingindizes (LI) zu erzielen. Der LI berechnete sich als Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl.
4. Es wurde die Wirkung von 3 bekannten nicht-genotoxischen Leberkarzinogenen auf die Zellteilungsrate untersucht. Es handelte sich dabei um Phenobarbital, Chloroform und Wyeth 14,643. Die Substanzen wurden den Tieren über die Zeiträume von 1, 4 und 13 Wochen verabreicht. Der LI wurde mit Hilfe einer 7-Tage Pumpe ermittelt.
5. Für verschiedene Substanzen wurde eine promovierende Wirkung vor allem auf bestimmte Hepatozytenpopulationen beschrieben (CHEN et al., 1995; CONSTAN et al., 1995; BAHNEMANN, 2000). Um einen eventuell vorhandenen zonalen Effekt der verwendeten Substanzen zu detektieren, wurde als Meßverfahren die lobule-dependent zonal measurement (LZM) Methode (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) gewählt. Innerhalb des Leberläppchens wurde in 3 gleichgroßen Zonen gemessen, wobei Zone 1 an das Portalfeld, Zone 3 an die abführende Vene grenzte und Zone 2 dazwischen lag.

6. Bei unbehandelten Tieren beider Mäusestämme stellte die Zone 2 zu allen 3 Meßzeitpunkten die Hauptproliferationszone dar. Dies steht im Gegensatz zu der von ZAJICEK et al. (1985) an Ratten entwickelten Hypothese der „streaming liver“, wonach in Zone 1 die höchste proliferative Aktivität vorliegt.
Die B6C3F1 Maus wies nach 4 und 13 Wochen gegenüber der C57BL Maus höhere LI auf, was mit der deutlich höheren Spontantumorraterate der B6C3F1 Maus korreliert.
7. Phenobarbital rief bei beiden Stämmen eine anhaltend gesteigerte Zellteilung über 13 Wochen hervor. Nach 4 und 13 Wochen waren die erhöhten LI auf Hepatozyten der Zone 3 begrenzt und wären ohne die zonal-differenzierte Auswertung nicht entdeckt worden. Bisher wurde für Phenobarbital eine erhöhte Zellteilungsrate nur für einen Zeitraum von 1 bis 4 Wochen beschrieben.
8. Chloroform verursachte bei B6C3F1 Mäusen eine anhaltend gesteigerte Zellproliferation in allen Zonen über 13 Wochen. Die C57BL Maus wies nur nach 1 Woche erhöhte LI auf, zu den übrigen Zeitpunkten lagen die LI wieder auf Kontrollniveau.
9. Wyeth 14,643 rief bei beiden Mäusestämmen zu allen 3 Zeitpunkten und in allen Zonen eine ausgeprägte Zellteilung hervor. Hauptproliferationszone war die Zone 1.
10. Mit Hilfe der LZM-Methode wurden ebenfalls die Mitose- und Apoptoserate ermittelt. Die Mitoserate, als Kontrolle der S-Phasen-Response, korrelierte gut mit dem LI in Zonen mit hoher Zellteilungsrate. Deutlich gesteigerte Apoptoseraten fanden sich nach der Behandlung mit Wyeth 14,643 in den Zonen 2 und 3.
11. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Auswertung der Zellteilungsrate in der Leber unter Beachtung der Zonalität notwendig ist, da einige Substanzen vor allem auf bestimmte Zonen wirken. Bei einer alleinigen Betrachtung des Gesamt-LI können Substanz-induzierte Effekte übersehen werden. Es konnten stammesspezifische Unterschiede in der Zellteilungsrate aufgezeigt werden, die mit der unterschiedlichen Tumorprävalenz übereinstimmten. Weiterhin wurde ein Beitrag zu einer Datenbank geleistet, die als Grundlage für die Erstellung eines Kurzzeittestes zur Beurteilung des kanzerogenen Potentials nicht-genotoxischer Karzinogene dienen soll.

7 Summary

1. The bibliographical review gives an overview on the importance of cell proliferation. The various markers and evaluation strategies for cell proliferation in mouse liver are discussed, in particular the importance to consider the zonality in the liver when evaluating cell proliferation data.
2. For our investigation, we used liver tissue of male B6C3F1 mice and male C57BL mice from two different “S-phase-response studies” performed at the Department of Toxicology of the BASF Incorporation, Ludwigshafen, Germany. The B6C3F1 mouse is considered to be susceptible to liver tumor formation whereas the C57BL mouse is considered to be resistant to the formation of liver tumors. The animals were 10 weeks old at the beginning of the study.
3. Osmotic mini pumps containing the cell proliferation marker BrdU were implanted subcutaneously in mice for 3 to 7 days. A third group was injected intraperitoneally with a single dose of BrdU 2 hours prior to death. Only the 7 day mini pump produced a sufficient labeling index (LI) in both strains. The LI was calculated by estimating the part of labeled hepatocyte nuclei of the total counted cell number.
4. The effects of three non-genotoxic hepatocarcinogens on cell proliferation in the liver were evaluated. Animals were treated with phenobarbital, chloroform and Wyeth 14,643 for 1, 4, and 13 weeks. The LI was determined using a 7 day mini pump.
5. Some compounds seem to have a proliferative effect only on certain populations of hepatocytes (CHEN et al., 1995; CONSTAN et al., 1995; BAHNEMANN, 2000). Cell proliferation was measured by the lobule-dependent zonal measurement method (LZM, BAHNEMANN and MELLERT, 1997) to detect increases in cell proliferation of hepatocytes in specific zones. The liver lobule was divided into three equal parts with the zone 1 representing the periportal zone, the zone 3 lying close to the central vein and the zone 2 between the two other zones.

6. In control animals of both strains, zone 2 was found to be the zone with the highest proliferative activity. This finding stays in contrast to the hypothesis of the streaming liver developed by ZAJICEK et al. (1985) for rat livers reporting that zone 1 reveals the highest proliferative activity.
The B6C3F1 mouse showed higher LI after 4 and 13 weeks compared to the C57BL mouse. This might correlate with the higher tumor prevalence in this strain.
7. Phenobarbital produced in both strains a sustained increase in cell proliferation for up to 13 weeks. After 4 and 13 weeks elevated LI were found only in zone 3. When using a random evaluation scheme, these differences of the LI would not have been detected. This may be the reason that the literature is reporting up to now that application of phenobarbital is producing an increase in cell proliferation only for a time period of 1-4 weeks.
8. B6C3F1 mice treated with chloroform showed a sustained increase in cell proliferation in all zones for up to 13 weeks. In C57BL mice treated with chloroform an elevated LI could only be detected after 1 week.
9. Wyeth 14,643 produced in both mouse strains at all 3 timepoints and in all 3 zones a marked increase in cell proliferation with a predominance in zone 1.
10. Mitotic and apoptotic rates were evaluated by using the LZM method. Zones with high proliferative activity also showed increases in the mitotic index. A marked increase in the apoptotic rate could be seen after treatment with Wyeth 14,643.
11. The necessity of zonal dependent evaluation of cell proliferation in the liver could be demonstrated as a consequence of the induction of cell proliferation in a specific zone observed with some compounds. When measuring the LI randomly throughout the whole liver there is always the risk to miss these compound specific effects. It was possible to show strain specific differences in cell proliferation that correlated with the different strain specific tumor prevalence.
Furthermore, this work is giving important cell proliferation data useful for a database for short-time carcinogenicity testing which could evaluate the carcinogenic potential of various non-genotoxic carcinogens.