

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Untersuchung der zonalen Zellproliferation mittels BrdU in der Leber der
B6C3F1 und C57BL Maus nach Verabreichung von drei nicht-genotoxischen
Karzinogenen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
SILKE BURKHARDT

Gießen 2001

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

Untersuchung der zonalen Zellproliferation mittels BrdU in der Leber der
B6C3F1 und C57BL Maus nach Verabreichung von drei nicht-genotoxischen
Karzinogenen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
SILKE BURKHARDT
Tierärztin aus Karlsruhe (Baden-Württemberg)

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Eigenbrodt

Tage der mündlichen Prüfung: 13.06.2001 und 18.06.2001

Meinen Eltern und meiner Schwester

INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Zellproliferation und chemische Karzinogenese	2
2.1.1	Genotoxische Karzinogene	3
2.1.2	Nicht-genotoxische Karzinogene	3
2.1.3	Zellproliferation und nicht-genotoxische Karzinogene	5
2.1.4	Apoptose und nicht-genotoxische Karzinogene	6
2.2	Chemische Karzinogenese in der Leber	7
2.2.1	Die Leber	7
2.2.2	Tumorentstehung in der Leber	8
2.2.3	Mechanismen nicht-genotoxischer Hepatokarzinogene	9
2.3	Unterschiede in der Tumorraten zwischen der B6C3F1 und C57BL Maus	10
2.3.1	Methylierungsstatus der DNA	11
2.4	Messung der Zellproliferation	11
2.4.1	Der Zellzyklus	11
2.4.2	Methoden zur Messung der Zellproliferation	12
2.4.3	Endogene Marker	12
2.4.4	Exogene Marker	12
2.5	Zellproliferation in der Leber	15
2.5.1	Konzept der „streaming liver“	15
2.5.2	Zonale Unterschiede in der Zellproliferation	16
2.5.3	Auswertungsstrategien in der Leber	16
2.5.3.1	Gesamt-Labelingindex	16
2.5.3.2	Zonale Auswertung	17
2.5.4	Kontrollwerte der Zellproliferation in der Mäuseleber	17
2.5.4.1	B6C3F1 Maus	17
2.5.4.2	C57BL Maus	18
2.5.5	Bewertung von Labelingindizes	19
2.5.5.1	Zellzahl und Gruppengröße	19
2.5.5.2	Alter der Tiere	19

2.5.5.3	Angaben zur Labelingindex-Steigerung	19
2.6	Prüfsubstanzen	20
2.6.1	Phenobarbital	20
2.6.1.1	Phenobarbital und Zellproliferation	21
2.6.1.2	Phenobarbital und Apoptose	22
2.6.2	Chloroform	22
2.6.2.1	Chloroform und Zellproliferation	24
2.6.2.2	Chloroform und Apoptose	25
2.6.3	Wyeth 14,643	26
2.6.3.1	Wyeth 14,643 und Zellproliferation	28
2.6.3.2	Wyeth 14,643 und Apoptose	29
3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Tiere	30
3.1.2	Haltungsbedingungen	30
3.1.3	Randomisierung	30
3.2	Versuchsdurchführung	30
3.2.1	Dosisgruppen	30
3.3	Histopathologische Aufarbeitung	32
3.3.1	Sektion	32
3.3.2	Fixierung und Trimmen der Organe	32
3.3.3	Einbetten der Organe	32
3.3.4	Schneiden der Paraffinblöcke	32
3.3.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	32
3.3.6	Immunhistologische Färbung	33
3.3.6.1	Entparaffinierung und Rehydrierung	33
3.3.6.2	Antigen-Retrieval	33
3.3.6.3	Immunhistologisches Färbeprotokoll	33
3.4	Auswertung der immunhistologischen Schnitte	35
3.4.1	Hilfsmittel der Auswertung	35
3.4.2	Auswertstrategien	35
3.4.2.1	S-Phasen-Response	36
3.4.2.2	Mitoseindex	36
3.4.2.3	Apoptoseindex	37

3.4.3	Statistische Auswertung	37
3.4.3.1	Vergleich der Pumpenzeiten sowie der Mitose- und Apoptoseindizes	38
3.4.3.2	Vergleich der zonalen und totalen Zellproliferation der behandelten Gruppen mit der Kontrollgruppe	38
3.4.3.3	Körper- und Lebergewichte	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	Pumpenzeiten	39
4.1.1	B6C3F1 Maus	39
4.1.1.1	Makroskopische und histologische Befunde	39
4.1.1.2	Labelingindizes	40
4.1.2	C57BL Maus	41
4.1.2.1	Makroskopische und histologische Befunde	41
4.1.2.2	Labelingindizes	42
4.2	Phenobarbital	44
4.2.1	B6C3F1 Maus	44
4.2.1.1	Makroskopische und histologische Befunde	44
4.2.1.2	Labelingindizes	45
4.2.1.3	Mitose und Apoptose	46
4.2.2	C57BL Maus	47
4.2.2.1	Makroskopische und histologische Befunde	47
4.2.2.2	Labelingindizes	48
4.2.2.3	Mitose und Apoptose	49
4.3	Chloroform	49
4.3.1	B6C3F1 Maus	50
4.3.1.1	Makroskopische und histologische Befunde	50
4.3.1.2	Labelingindizes	51
4.3.1.3	Mitose und Apoptose	52
4.3.2	C57BL Maus	53
4.3.2.1	Makroskopische und histologische Befunde	53
4.3.2.2	Labelingindizes	54
4.3.2.3	Mitose und Apoptose	55
4.4	Wyeth 14,643	55
4.4.1	B6C3F1 Maus	56

4.4.1.1	Makroskopische und histologische Befunde	56
4.4.1.2	Labelingindizes	57
4.4.1.3	Mitose und Apoptose	58
4.4.2	C57BL Maus	59
4.4.2.1	Makroskopische und histologische Befunde	59
4.4.2.2	Labelingindizes	60
4.4.2.3	Mitose und Apoptose	61
5	DISKUSSION	62
5.1	Wahl der Marker	62
5.2	Wahl der Mäusestämme	63
5.3	Pumpenverweildauer	64
5.4	Auswertungsstrategien	65
5.4.1	Labelingindex	65
5.4.2	Mitose- und Apoptoseindex	66
5.5	Vergleich der ermittelten Werte der Kontrollgruppe 3 (7 Tage-Pumpe) mit Literaturangaben	68
5.5.1	B6C3F1 Maus	68
5.5.1.1	Mitoseindex	69
5.5.1.2	Apoptoseindex	69
5.5.2	C57BL Maus	69
5.5.2.1	Mitoseindex	70
5.5.2.2	Apoptoseindex	70
5.5.3	Vergleich der Kontrollwerte beider Mäusestämme	70
5.6	Ermittelte Werte nach Substanzapplikation	72
5.6.1	Phenobarbital	72
5.6.1.1	Labelingindex	73
5.6.1.2	Mitoseindex	74
5.6.1.3	Apoptoseindex	75
5.6.2	Chloroform	75
5.6.2.1	Labelingindex	76
5.6.2.2	Mitoseindex	77
5.6.2.3	Apoptoseindex	78
5.6.3	Wyeth 14,643	78

5.6.3.1	Labelingindex	79
5.6.3.2	Mitoseindex	80
5.6.3.3	Apoptoseindex	81
5.7	Bedeutung der zonalen Zellproliferation	81
5.8	Beurteilung der Mitose- und Apoptoserate	83
5.9	Bedeutung der gesteigerten Zellproliferation und Unterschiede zwischen den Mäusestämmen	84
5.10	Beitrag zu einer Datenbank für Zellproliferationsdaten	86
6	ZUSAMMENFASSUNG	87
7	SUMMARY	89
8	ANHANG	91
8.1	Abbildungen	91
8.2	B6C3F1 Maus	93
8.2.1	Labelingindizes	93
8.2.2	Mitose- und Apoptoseindizes	97
8.3	C57BL Maus	103
8.3.1	Labelingindizes	103
8.3.2	Mitose- und Apoptoseindizes	108
8.4	Lösungen, Puffer, Bezugsquellen	114
8.4.1	Lösungen und Puffer	114
8.4.2	Bezugsquellen	115
9	LITERATURVERZEICHNIS	117

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetylcoenzym A
AgNoR	Argyrophlic Nuclear Organizer Regions
AI	Apoptoseindex
ALT	Alanin-Amino-Transferase
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
Chlo	Chloroform
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phthalat
DEN	Diethylnitrosamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
G-Phase	gap-Phase
GSTP	Glutathion-S-Transferase-P
HCS	hepatocarcinogen sensitivity
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.p.	intraperitoneal
IPCS	International Program on Chemical Safety
ISEL	in situ end-labeling
KGW	Körpergewicht
LD ₅₀	Letaldosis für 50 % der Population
LI	Labelingindex
LSAB	labeled streptavidin-biotin
LZM	lobule-dependent zonal measurement
M-Phase	Mitose-Phase
5MeC	5-Methylcytosin
MI	Mitoseindex
NCI	National Cancer Institute
NTP	National Toxicology Program
Pb	Phenobarbital
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PP	Peroxisomenproliferatoren

PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
Pumpe	osmotische Minipumpe, die subcutan implantiert wird
RNA	Ribonukleinsäure
s	Standardabweichung
SF	Streufaktor
S-Phase	Synthesephase
s.c.	subcutan
SDH	Sorbit-Dehydrogenase
Tab.	Tabelle
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TGF α	transforming growth factor α
TGF β 1	transforming growth factor β 1
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling
Wyeth 14,643	[4-Chloro-6(2,3-xylydino)-2-pyrimidinylthio]azetat
\bar{x}	Mittelwert
\bar{x}_g	geometrischer Mittelwert

1 EINLEITUNG

Die Leber ist das Hauptzielorgan der chemisch induzierten Karzinogenese. 57 % der vom National Cancer Institute/National Toxicology Program (NCI/NTP) an Mäusen untersuchten Substanzen führten in der Leber zur Entstehung von Tumoren (GOLD et al., 1991). Der vermehrten Zellproliferation kommt hierbei auf sämtlichen Stufen der chemisch induzierten Karzinogenese eine Schlüsselrolle zu. Dies gilt vor allem für nicht-genotoxische Karzinogene. Dort wird die vermehrte Zellteilungsrate als ein auslösender Faktor der Tumorentstehung diskutiert (AMES und GOLD, 1990). In diesem Zusammenhang finden Zellproliferationsdaten immer häufiger Eingang bei der toxikologischen Beurteilung von Testsubstanzen.

Für die Auswertung von Zellproliferationsstudien kommen verschiedene Methoden zur Anwendung. In den meisten Fällen repräsentieren zufällig ausgewählte Meßfelder in der Leber die Gesamtheit der Zellreplikation. Mit dieser Art der Auswertung wird jedoch der Heterogenität der Leber keine Rechnung getragen. Verschiedene Substanzen rufen zonale Unterschiede in der Zellteilungsrate hervor, oder steigern die Zellteilungsrate nur einer Zone (CHEN et al., 1995; KOLAJA et al., 1996c; BAHNEMANN und MELLERT, 1997; LEE et al., 1998). Eine zonal differenzierte Auswertung erscheint um so sinnvoller, da eine in nur einer Zone erhöhte Zellteilungsrate bei einer zufälligen Wahl der Meßfelder übersehen werden kann (FOX et al., 1993; BAHNEMANN, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluß bekannter nicht-genotoxischer Karzinogene (Phenobarbital, Chloroform und Wyeth 14,643) auf die Zellteilungsrate der Leber zweier unterschiedlich tumoranfälliger Mäusestämme untersucht werden. Zuvor wurde die optimale Verweildauer des Markers 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) für die immunhistochemische Detektion der Zellteilung in der Mäuseleber etabliert. Die Auswertung der Zellteilung erfolgte unter Berücksichtigung der Zonalität der Leber, um etwaige Zielzonen der drei Substanzen oder Unterschiede in der Spontanteilungsrate erkennen zu können.

Mit dieser Arbeit soll die Datenbank für Zellproliferationsdaten erweitert werden und so die Entwicklung eines Kurzzeittestes zur Darstellung von kanzerogenem Potential mit Hilfe von hepatozellulärer Proliferation ermöglicht werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Zellproliferation und chemische Karzinogenese

Die chemische Karzinogenese wird in 3 verschiedene Stadien eingeteilt: Initiation, Promotion und Progression (SCHULTE-HERMANN, 1985; BUTTERWORTH, 1991).

Die Initiation stellt eine persistierende und vererbare Veränderung einer Zelle dar und kann durch eine einmalige Gabe eines Karzinogens ausgelöst werden (SCHULTE-HERMANN, 1985). Sie läuft in zwei Stufen ab: zuerst kommt es zu einer nicht letalen Mutation der DNA, die anschließend durch mindestens eine vollständig vollzogene DNA-Synthese fixiert wird (KLAUNIG und KOLAJA, 1998). Findet eine Mutation von Wachstumsgenen statt oder wird deren Expression verändert, kann es zur Produktion aktiver Onkogene oder zum Verlust oder der Hemmung von Tumorsuppressorgenen kommen (BUTTERWORTH, 1991). Die Veränderungen an der DNA können entweder exogen, z. B. durch DNA-reaktive Substanzen, oder endogen ausgelöst werden. AMES und GOLD (1990) berichten über DNA-Schädigung infolge endogener Oxidantien. Bei der Ratte kommt es dadurch täglich zu ca. 10^5 DNA-Schädigungen, beim Mensch sind es ca. 10^4 . Der Schaden muß jedoch in einer Zelle auftreten, welche die Potenz besitzt, sich weiterhin zu teilen und zur Tumorzelle zu entwickeln. Diesen Zellen im Gewebe stehen häufig ausdifferenzierte Zellen gegenüber, die nach absehbarer Zeit zu Grunde gehen. Dort entstandene Schäden am Genom haben im allgemeinen keinen Einfluß auf die Tumorentstehung (COHEN und ELLWEIN, 1990).

Die Tumorpromotion wird als selektives, klonales Wachstum initiierten Zellen beschrieben. Sie stellt einen langsamen Prozeß dar, der sich an die Initiation anschließt und Wochen bis Jahre dauern kann (SCHULTE-HERMANN, 1985; PITOT, 1990). Substanzen, die als Tumorpromotoren wirken, sind meist nicht DNA-reaktiv; sie müssen aber über einen längeren Zeitraum und kontinuierlich wirken, um einen promovierenden Effekt zu entfalten (PERAINO et al., 1975). Fällt die Wirkung des Promotors weg, kann es zu einer Regression der präneoplastischen Veränderungen kommen (GRASL-KRAUPP et al., 1994; KOLAJA et al., 1996b).

Die Progression ist weniger gut definiert als die Stadien der Initiation und Promotion. Charakteristisch sind jedoch weitere DNA-Mutationen, eine gesteigerte Zellteilungsrate, histopathologische Veränderungen und Beeinflussbarkeit durch Hormone und Wachstumsfaktoren (PITOT, 1989).

2.1.1. Genotoxische Karzinogene

Unter dem Begriff genotoxische Karzinogene werden Substanzen oder deren reaktive Metaboliten zusammengefaßt, die direkt an die DNA binden, dadurch DNA-Addukte formen, und so zur Schädigung der DNA und schließlich zur Tumorentstehung führen können (COHEN und ELLWEIN, 1991). Zu diesen Veränderungen zählen Punktmutationen, Insertionen und Deletionen. Weiterhin können solche genotoxischen Substanzen die Chromosomenstruktur oder die Chromosomenanzahl beeinflussen (BUTTERWORTH, 1990). Genotoxisch wirkende Substanzen können zusätzlich einen zytotoxischen oder mitogenen Effekt besitzen und werden dann als komplettes Karzinogen bezeichnet (BUTTERWORTH et al., 1992). Diese kompletten Karzinogene führen durch die gesteigerte Zellteilungsrate früher zu Tumoren als ausschließlich genotoxisch wirkende Substanzen (COHEN und ELLWEIN, 1991). Es wird angenommen, daß es bei geringsten Dosen genotoxischer Substanzen zu Interaktionen mit der DNA kommt und somit jeder Kontakt ein generelles karzinogenes Risiko birgt (COHEN und ELLWEIN, 1991). Verfahren, ein vorhandenes mutagenes Potential nachzuweisen, sind meist Bakterien-Mutagenitätstests, wie zum Beispiel der Ames-Test (AMES et al., 1973).

2.1.2. Nicht-genotoxische Karzinogene

Substanzen und deren Metaboliten, die nicht DNA-reaktiv sind, aber dennoch karzinogen wirken, werden als nicht-genotoxische Karzinogene bezeichnet (COHEN und ELLWEIN, 1991; BUTTERWORTH et al., 1995). Ihre Wirkungsweise beruht vor allem auf einer gesteigerten Zellteilungsrate (COHEN und ELLWEIN, 1990). Diese kann entweder, bedingt durch zytotoxisch wirkende Substanzen, regenerativ sein oder aufgrund einer direkten mitogenen Wirkung entstanden sein. Direkt mitogen wirkende Substanzen werden auch häufig als Promotoren bezeichnet (PITOT et al., 1981; SCHULTE-HERMANN, 1985).

Tab. 1: Klassifizierung nicht-genotoxischer Karzinogene aufgrund ihrer Wirkungsweise

zytotoxisch wirkende Substanzen	mitogen wirkende Substanzen
<ul style="list-style-type: none"> - nicht DNA-reaktiv - in karzinogenen Dosen teilweise zytotoxisch - induzieren regeneratives Wachstum - eventuell entzündliche Begleiteffekte - zirkulierende Wachstumsfaktoren können bevorteiltes Wachstum präneoplastischer Zellen bewirken 	<ul style="list-style-type: none"> - nicht DNA-reaktiv - in karzinogenen Dosen nicht zytotoxisch - mitogene Wachstumsstimulation - Wirkung eventuell über spezifischen Rezeptor - können bevorteiltes Wachstum präneoplastischer Zellen direkt stimulieren

nach: BUTTERWORTH et al. (1995)

Beispiele für zytotoxisch wirkende Substanzen sind Tetrachlorkohlenstoff, Furan und Chloroform, für mitogen wirkende Substanzen die Klasse der Peroxisomenproliferatoren (wie z. B. Wyeth 14,643), 1,4-Dichlorbenzen und Phenobarbital (DOOLITTLE et al., 1987; MARSMAN et al., 1988; CORLEY et al., 1990; JIRTLE et al., 1991; WILSON, et al., 1992; LAKE et al., 1997). Bei Gabe von zytotoxischen Substanzen kommt es zum Zellschaden bis hin zum Zelltod und nachfolgend zu einer regenerativen Proliferation. Parallel kann bei auf die Leber zytotoxisch wirkenden Substanzen ein Anstieg der Leberenzyme im Serum beobachtet werden. 48 h nach Verabreichung der Substanz wird das Maximum der Zellteilung erreicht (BUTTERWORTH et al., 1992; LARSON et al., 1993; GEMMA et al., 1996). Für diese Substanzklasse wird das Vorhandensein eines Schwellenwertes diskutiert, da die karzinogene Wirkung stark mit der zytotoxischen Wirkung korreliert (COHEN und ELLWEIN, 1990; BUTTERWORTH et al., 1995).

Mitogen wirkende Substanzen steigern die Zellproliferation, ohne sichtbaren Zelltod hervorzurufen (GOLDSWORTHY et al. 1993). Die Substanzgabe führt zu einer Gewichtszunahme des betroffenen Organs, die über die Dauer der Verabreichung erhalten bleibt (BUTTERWORTH et al., 1992; KOLAJA et al., 1996b; ORTON et al., 1996). Es kommt nach Gabe einer mitogen wirkenden Substanz zu einem anfänglichen Peak (häufig nach einer Woche beobachtet, wenn über mehrere Wochen gemessen wird) und anschließend zu einem Rückgang der LI bis auf Kontrollniveau (ELDRIDGE et al., 1992; KOLAJA et al., 1996c; PLANT et al., 1998; BAHNEMANN, 2000). Mitogene scheinen eine spezielle Wirkung auf präneoplastische Herde zu haben und dort das Verhältnis zwischen Zellteilung und Zelltod zu verändern (CATTLEY und POPP, 1989). Da bei Rezeptor-vermittelter

Wirkung die Schwelle sehr niedrig und somit unter Umständen nicht feststellbar sein kann, ist die Festsetzung eines Schwellenwertes problematisch (ISSEMANN und GREEN, 1990).

2.1.3 Zellproliferation und nicht-genotoxische Karzinogene

Die Zellproliferation spielt eine Schlüsselrolle in allen Stadien der Karzinogenese (AMES und GOLD, 1990; COHEN und ELLWEIN, 1990; SCHULTE-HERMANN et al., 1991; BUTTERWORTH et al., 1992). Treten zum Beispiel in der Leber, einem Organ mit sehr geringer Zellteilungsrate, durch genotoxische Substanzen bedingte DNA-Schäden auf, müssen diese nicht zwangsläufig zur Tumorentstehung führen. Erst durch eine gesteigerte Zellteilungsrate, hervorgerufen zum Beispiel durch nicht-genotoxische Karzinogene, kommt es zur Fixierung der Schäden in Form von Mutationen (CAYAMA et al., 1978; COLUMBANO et al., 1981).

Während der Zellteilung ist die einsträngige DNA besonders empfindlich gegenüber exogenen oder endogenen (s. 2.1) Einflüssen. YANG et al. (1982) zeigten, daß die mutagene Wirkung von Benzpyrenepoxid auf Fibroblasten während der S-Phase viel stärker war als in anderen Zellzyklusstadien. Bei vermehrter Zellteilung liegt die DNA häufiger in einsträngiger Form vor (AMES et al., 1993). Jede Zelle besitzt Möglichkeiten, entstandene DNA-Schäden zu reparieren. Durch eine gesteigerte Zellteilungsrate verkürzt sich die Zeitspanne in der Reparaturen möglich sind. Es erhöht sich somit das Risiko für die Entstehung persistierender DNA-Schäden (AMES et al., 1993; FOSTER, 1997). Somit wirken nicht-genotoxische Karzinogene indirekt mutagen (AMES und GOLD, 1990). Zusätzlich kann der Methylierungsstatus der DNA auf Grund der vermehrten DNA-Synthese oft nicht mehr aufrecht erhalten werden (COLUMBANO et al., 1991). Da der Methylierungsstatus des Cytosins verantwortlich für die Kontrolle der Genexpression z.B. von Onkogenen ist (COUNTS und GOODMAN, 1995a), kann eine Hypomethylierung zur vermehrten Entstehung von Lebertumoren führen (DENDA et al., 1985).

Sind schon präneoplastische Zellen vorhanden und kommt es durch den Einfluss nicht-genotoxische Substanzen zu einer gesteigerten Zellteilung, führt dies zu einer selektiven Vermehrung dieser Zellen (CATTLEY und POPP, 1989). Durch eine anhaltend gesteigerte Zellteilungsrate erhöht sich die Wahrscheinlichkeit von weiteren Mutationen innerhalb dieser Präneoplasien und es kommt zu einer fortschreitenden Malignität (FOSTER, 1997).

Manche Autoren vertreten die Meinung, daß eine alleinige Erhöhung der Zellproliferation durch eine chemische Substanz nicht mit einer karzinogenen Wirkung gleichgesetzt werden kann (WEINSTEIN, 1991a; HUFF, 1993). WARD et al. (1988) fanden bei Mäusen erhöhte

Zellteilungsrate, die durch die Gabe verschiedener Substanzen induziert worden waren. Sie konnten die gesteigerte Zellproliferation jedoch nur unregelmäßig mit dem Auftreten von Tumoren korrelieren. Ein besseres Verständnis der zellulären und molekularen Vorgänge während der chemischen Karzinogenese ist notwendig und würde eine bessere Risikoabschätzung potentiell kanzerogener Stoffe ermöglichen (MELNICK et al., 1993).

2.1.4 Apoptose und nicht-genotoxische Karzinogene

Der Begriff Apoptose wurde von KERR et al. (1972) geprägt. Sie beschrieben eine Form des Zelltodes, die anhand spezifischer morphologischer Veränderungen identifiziert werden konnte. Im adulten Organismus dient die Apoptose der Erhaltung des zellulären Gleichgewichts und der selektiven Eliminierung geschädigter Zellen (KERR et al., 1972; BURSCH et al., 1994; CONSTAN et al., 1996). Der Prozeß läuft unter genetischer Kontrolle ab und kann entweder endogen initiiert werden oder durch extrazellulär wirkende Faktoren wie Hormone, Zytokine, Futterentzug, chemische und physikalische Agentien sowie Viren eingeleitet werden (MAJNO und JORIS, 1995; KOLAJA et al., 1996a).

Morphologische Merkmale der Apoptose (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980) sind:

- Separation aus dem Zellverband
- Kondensation des Chromatins
- Zerfall in „apoptotische Körperchen“
- Phagozytose der apoptotischen Körperchen durch Nachbarzellen und Makrophagen

Die Apoptose kann in der Leber durch folgende Verfahren detektiert werden:

- lichtmikroskopische Auswertung am Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitt (s. morphologische Merkmale oben)
- Eosinfluoreszenz im UV-Licht (STINCHECOMBE et al., 1995)
- immunhistochemische Anfärbung von transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) (WAKEFIELD et al., 1990)
- Markierung von DNA-Strangbrüchen (in situ end-labeling = ISEL; terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling = TUNEL) (WIJSMAN et al., 1993)

Tab. 2: Kontrollwerte der Apoptoserate in der Mäuseleber

Mäusestamm	Nachweis	Apoptose Index	Referenz
weibliche B6C3F1	HE-Schnitt	~ 0,1 %	GOLDSWORTHY et al. (1996)
männliche B6C3F1	TUNEL	< 0,01 %	JAMES et al. (1998)
männliche B6C3F1	TUNEL	< 0,01 %	MUSKHELISHVILI et al. (1995)

HE = Hämatoxylin-Eosin, TUNEL = transferase-mediated dUTP nick end-labeling

Ebenso wie die Zellproliferation hat die Apoptose Einfluß auf die Tumorentstehung. Es wird angenommen, daß 80-90 % der initiierten Zellen durch Apoptose eliminiert werden (LUEBECK et al., 1991). Verschiedene nicht-genotoxische Substanzen wie Nafenopin oder Phenobarbital hemmen die Apoptose in präneoplastischem Lebergewebe (ROBERTS et al., 1995; KOLAJA et al., 1996b). Dies verschafft initiierten Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber unverändertem Gewebe (SCHULTE-HERMANN et al., 1990). Mitogene Substanzen können so auf zwei Arten die Entstehung von Präneoplasien oder Tumoren beeinflussen: durch eine gesteigerte Zellteilungsrate und durch Hemmung der Apoptose (SCHULTE-HERMANN et al., 1991). Die chemisch induzierte Hemmung der Apoptose ist durch Absetzen der Substanzgabe reversibel (BURSCH et al., 1986).

2.2 Chemische Karzinogenese in der Leber

2.2.1 Die Leber

Die Leber ist ein zentrales Organ im Stoffwechsel (POPPER und SCHAFFNER, 1961). Zu ihren wichtigsten Aufgaben zählen die Aufrechterhaltung der Energieversorgung, die Biosynthese von Proteinen und die Eliminierung von Ammoniak durch Umwandlung in Harnstoff. Ihr kommt eine wichtige Funktion im Endokrinium durch den Abbau zirkulierender Hormone zu. Medikamente und toxische Substanzen werden oft in der Leber durch Biotransformation entgiftet, andere Stoffe, wie zum Beispiel Clofibrat, können jedoch auch bioaktiviert, also in ihre toxische Form überführt werden (KEDDERIS, 1996).

Die Leber besteht sowohl aus Parenchymzellen, den Hepatozyten, als auch aus Stromazellen, den Endothelzellen, Kupfferschen Sternzellen, Itozellen und Pitzellen (JUNGERMANN und KATZ, 1989).

Morphologisch wird die Leber des Schweines in Leberläppchen eingeteilt, die von hexagonal angeordneten Bindegewebssepten begrenzt werden und die Zentralvene im Läppchenzentrum

liegt. Portalgefäße sind im Dreieck um die Zentralvene angeordnet und liegen im Bereich der Bindegewebssepten. RAPPAPORT et al. (1954) teilten die Leber dagegen in eine funktionale Einheit, den Azinus ein. Das Blut fließt demnach über arterielle Äste zuerst parallel zu den Septen und dann über die Sinusoide zur abführenden Vene. Es kommt somit radiär zur Abnahme an Sauerstoff, Substraten und Hormonen. Man unterscheidet Zonen mit hohem O₂-Partialdruck (periportale Zone 1) und Zonen mit geringem O₂-Partialdruck (perivenöse Zone 3). Dazwischen liegt die Zone 2. Zonale Unterschiede findet man auch in der Enzymausstattung, dem Anteil stromaler Zellen und der autonomen Innervierung (JUNGERMANN und KATZ, 1989). So besitzt die Glukose-6-Phosphatase zum Beispiel eine höhere Aktivität im periportalen Bereich, die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase hingegen eine höhere Aktivität im perivenösen Bereich. Auch die Leber schädigende Stoffe zeigen unterschiedliche Wirkorte: so wird durch Allylkohol vor allem der periportale Bereich geschädigt, wohingegen Ethanol oder Tertrachlorkohlenstoff den perivenösen Bereich schädigen (ISRAEL et al., 1975; JAMES et al., 1981; KLINGER et al., 1986).

2.2.2 Tumorentstehung in der Leber

Die Leber ist eines der Hauptzielorgane in der chemisch induzierten Karzinogenese. Von 354 an Ratten und 299 an Mäusen untersuchten Substanzen führten bei der Ratte 40 % und bei der Maus 57 % zur Tumorentstehung in der Leber (GOLD et al., 1991). Auch hier gilt das Mehrstufenkonzept der Tumorentstehung (SCHULTE-HERMANN, 1985; BUTTERWORTH, 1991). Durch klonales Wachstum initiiert Zellen entstehen Inseln, die sich morphologisch, in ihrer Enzymaktivität und in der Zellteilungsrate vom umliegenden Gewebe unterscheiden (DIWAN et al., 1991). Diese Läsionen werden als präneoplastische „foci“ bezeichnet. Die veränderte Enzymexpression wurde am besten in der Rattenleber untersucht und stellt sich in Form einer Glutathion-S-Transferase-P(GSTP)-positiven immunhistochemischen Reaktion dar. Das umgebende Lebergewebe stellt sich im Vergleich GSTP negativ dar (SATO, 1989). In der Mäuseleber wird Glukose-6-Phosphatase als häufigster immunhistochemisch nachgewiesener Marker präneoplastischer Herde, so genannter „foci“, verwendet (DRINKWATER et al., 1990).

Die Zellproliferation in der Leber beeinflusst im unveränderten Gewebe die Tumorinitiation, in den „foci“ die Tumorpromotion. STANDEVEN et al. (1995) stellten eine erhöhte Zellteilungsrate in „foci“ im Vergleich zum umgebenden Gewebe fest. Proliferative und neoplastische Läsionen in der Mäuseleber sind eosinophile, basophile, vakuolierte oder gemischtzellige „foci“, Klarzellfoci sowie Adenome und Karzinome (FRITH und WARD, 1980).

2.2.3 Mechanismen nicht-genotoxischer Hepatokarzinogene

Die interzelluläre Kommunikation findet in der Leber durch gap junctions statt. Über diese Zell-zu-Zell Kontakte können niedermolekulare Stoffe zwischen den Hepatozyten ausgetauscht werden, wodurch die Gewebshomöostase, das Zellwachstum und die Zellteilung kontrolliert werden (LOEWENSTEIN, 1979; YAMASAKI, 1991). Die Hemmung dieser Zell-zu-Zell Kommunikation ist möglicherweise ein wichtiger Faktor in der Hepatokarzinogenese (KLAUNIG und KOLAJA, 1998). Nicht-genotoxische Substanzen können gap junctions verändern (NEVEU et al., 1994) und so den hemmende Effekt aufheben, den unveränderte Hepatozyten als Wachstumskontrolle auf initiierte Zellen haben (TROSKO und GOODMAN, 1994).

Onkogene, Tumorsuppressor-Gene und Wachstumsfaktoren haben einen regulierenden Einfluß auf das Organwachstum (z. B. auf Zellproliferation und Apoptose) (KLAUNIG und KOLAJA, 1998). Eine Deregulation oder vermehrte Expression dieser Gene kann zur Tumorentstehung führen (WEINSTEIN, 1991b; BUTTERWORTH et al., 1994; HARRINGTON et al., 1994).

Oxidativer Streß ist eine Imbalance des oxidativen Status der Zelle. Dazu kommt es, wenn das Verhältnis zwischen Produktion und Abbau von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gestört ist (REDDY und RAO, 1986). Aus H_2O_2 entstehen über eine Oxidase-vermittelte Reaktion neben einer Hydroxylgruppe (OH⁻) Hydroxylradikale (OH[•]) und Singulett-Sauerstoff (1O_2) (Haber-Weiss-Reaktion). Diese reaktiven Nebenprodukte der Reaktion werden für eine Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden verantwortlich gemacht (CHANCE et al., 1979). Peroxisomenproliferatoren führen zu einer deutlichen Erhöhung der H_2O_2 -generierenden Oxidasen, wohingegen die H_2O_2 -abbauende Katalase nur geringgradig erhöht ist (NEMALI et al., 1989). Dies wird als ein möglicher Weg der Tumorentstehung diskutiert (CERUTTI, 1985; REDDY und RAO, 1986; MACHLIN und BENDICH, 1987; OLSON, 1988). Experimentelle Daten zeigen jedoch, daß dies nicht der alleinige Mechanismus sein kann, über den Peroxisomenproliferatoren karzinogen wirken (MARSMAN et al., 1992). So

rufen z. B. bei der Ratte unterschiedliche Konzentrationen von Wyeth 14,643 gleich starke Oxidierung der DNA hervor, zur Tumorentstehung kommt es jedoch nur in höheren Konzentrationen (CATTLEY und GLOVER, 1993).

Als weitere Wirkweise von hepatokarzinogenen Substanzen wird die induzierte gesteigerte Zellproliferation und veränderte Apoptoserate diskutiert (s. 2.1.3 und 2.1.4).

2.3 Unterschiede in der Tumorrare zwischen der B6C3F1 und C57BL Maus

Die B6C3F1 Maus ist eine Hybridmaus, die durch Kreuzung der beiden Inzuchtstämme C3H/He und C57BL/6 entstanden ist. Der paternale Stamm (C3H/He) ist sehr empfänglich für Tumoren, der maternale Stamm (C57BL/6) gilt dagegen als relativ resistent. Die B6C3F1 Maus ist der meist genutzte Mäusestamm in Kanzerogenitätsstudien und gilt als anfällig für die Entwicklung von Tumoren. Die Lebertumorprävalenz (Adenome und Karzinome), ermittelt aus 2 Jahres Karzinogenitätsstudien im Rahmen des National Toxicology Program (NTP), betrug bei männlichen, über 2 Jahre alten Kontrolltieren der B6C3F1 Maus 30 % (MARONPOT et al., 1987). FRITH et al. (1983) untersuchten die Spontantumorrare in der C57BL/6 Maus. Sie stellten eine Lebertumorprävalenz von 4,7 % bei männlichen, über 500 Tage alten Tieren fest.

Tab. 3: Spontantumorrare in der Mäuseleber

Mäusestamm	Anzahl	Alter	Tumorprävalenz	Referenz
männliche B6C3F1	1784	> 2 Jahre	30 %	MARONPOT et al. (1987)
männliche C57BL/6	215	> 500 Tage	4,7 %	FRITH et al. (1983)

Studien an Inzuchtmäusestämmen und rekombinierten Stämmen zeigen, daß die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Stämme mit Differenzen in Allelen verschiedener Genorte (HCS = hepatocarcinogen sensitivity) in Zusammenhang stehen (DRINKWATER und GINSLER, 1986; HANIGAN et al., 1988; GARIBOLDI et al., 1993). Es konnte jedoch bisher nicht geklärt werden, wo genau diese HCS-Gene liegen. Die HCS-Gene scheinen die Tumorentstehung auf der Ebene der Promotion zu beeinflussen, indem sie die Proliferationsrate präneoplastischer Zellen erhöhen: Mäusestämme mit unterschiedlicher Anfälligkeit für die Tumorentstehung entwickeln alle „foci“. Diese unterscheiden sich aber in der Zellproliferationsrate. Bei dem anfälligeren Stamm ist diese sowohl in den „foci“ als auch

im umgebenden Lebergewebe deutlich höher als bei den anderen Stämmen (HANIGAN et al., 1988). DRINKWATER und GINSLER (1986) zeigten, daß unterschiedlich tumoranfällige Stämme nach Induktion zwar eine ähnliche Tumorprävalenz besaßen, die Gesamtzahl entstandener Tumore in der Leber anfälliger Mäuse jedoch bis um das 20-fache höher gegenüber der des resistenten Stammes war.

2.3.1 Methylierungsstatus der DNA

5-Methylcytosin (5MeC) ist eine im Säugetier vorkommende methylierte Base der DNA und wird vor allem in der Promoterregion verschiedener Gene gefunden (BIRD, 1986). Die Expression eines Gens wird unter anderem durch seinen Methylierungsstatus kontrolliert (JONES und BUCKLEY, 1990). Die Methylgruppe stellt ein chemisches Signal dar, welches von Transkriptions-regulierenden Faktoren erkannt wird (COUNTS und GOODMAN, 1995b). Hypomethylierung eines Gens erhöht die Wahrscheinlichkeit seiner Expression verglichen mit vollständig methylierten Genen (RAZIN und KAFRI, 1994). Wird die Zellproliferation durch Gaben von Phenobarbital oder durch partielle Hepatektomie gesteigert, kommt es bei der B6C3F1 Maus zu einem Abfall des Methylierungsstatus und zur Tumorentstehung. Der Methylierungsstatus der C57BL/6 Maus bleibt unter diesen Behandlungen unbeeinflusst (RAY et al., 1994; COUNTS et al., 1996).

2.4 Messung der Zellproliferation

Die Messung der Zellproliferation dient dem Nachweis von Zellen, die sich gerade in Teilung befinden oder sich auf eine Teilung vorbereiten. Anschließend kann die Zahl der Zellen, die sich in Teilungsphase befinden, in Beziehung zur Gesamtzellzahl oder zu einem Flächen- oder Längenparameter gesetzt werden (GOLDSWORTHY et al., 1991).

2.4.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus wird in folgende Phasen unterteilt (HENKES et al., 1993): in der G0-Phase (G steht für gap = englisch für Lücke, Intervall) befindet sich die Zelle in der Ruhephase. Daran schließt sich die G1-Phase, die Wachstumsphase, an. Während dieses Abschnittes werden Proteine, RNA und Membranen synthetisiert. In der S-Phase (S steht für Synthese) wird die DNA repliziert. Die Zelle verbleibt anschließend einige Zeit in der G2-Phase, bevor sie sich dann in der M-Phase (M steht für Mitose) teilt.

2.4.2 Methoden zur Messung der Zellproliferation

Bei allen verwendeten Methoden zur Messung der Zellproliferation werden biologische Marker detektiert, die während spezifischer Stadien des Zellzyklus exprimiert werden. Messungen können an Zellkulturen oder an histologischen Schnitten vorgenommen werden. Im Folgenden soll nur näher auf Methoden eingegangen werden, die zur Messung der Zellproliferation an histologischen Schnitten verwendet werden:

1. Bestimmung des Mitoseindex (VAN DIEST et al., 1992)
2. Metaphasen-Stop-Methode (FOLEY et al., 1991)
3. AgNoR (Argyrophilic Nuclear Organizer Regions) (MASUDA et al., 1997)
4. Immunhistologischer Nachweis zellzyklusspezifischer Proteine (Ki 67, PCNA) (FOLEY et al., 1991; DIETRICH, 1993; TETER et al., 1995)
5. Nachweis von messenger-RNA bestimmter Histon-Proteine (ALISON et al., 1994; GOWN et al., 1996)
6. Bestimmung der S-Phasen-Fraktion ($[^3\text{H}]$ -Thymidin, BrdU) (GRATZNER, 1982; DeFAZIO et al., 1987; LANIER et al., 1989)

Für die Toxikopathologie haben die Verfahren 4-6 die größte Bedeutung und werden am häufigsten eingesetzt.

2.4.3 Endogene Marker

Die Marker, die in den Verfahren 4 und 5 angewendet werden, zählen zu den endogenen Markern. Es werden immunhistochemisch Proteine detektiert, die während einer oder mehrerer Phasen des Zellzyklus auftreten, nicht aber in der G0-Phase. Der Vorteil gegenüber exogenen Markern besteht darin, daß diese Methoden auch retrospektiv an archiviertem Material eingesetzt werden können (ELDRIGE et al., 1993).

2.4.4 Exogene Marker

$[^3\text{H}]$ -Thymidin

$[^3\text{H}]$ -Thymidin ist ein radioaktiv markierter DNA-Baustein mit einer hohen Spezifität (GOLDSWORTHY et al., 1991). Er wird ausschließlich in die DNA inkorporiert. Für seine Applikation stehen verschiedene Techniken zur Verfügung (s. Tab. 4). Nachteile dieser Methode sind erstens die radioaktive Kontamination, was ein Arbeiten unter besonderen Schutzmaßnahmen erforderlich macht und dadurch hohe Kosten verursacht. Zweitens sind

lange histoautoradiographische Entwicklungszeiten von Wochen bis Monaten erforderlich (ELDRIDGE et al., 1990).

5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)

Hierbei handelt es sich um ein Thymidinanalogon, welches kompetitiv während der Synthesephase des Zellzyklus in die DNA inkorporiert wird. Sowohl der erste polyklonale als auch der erste monoklonale Anti-BrdU-Antikörper wurde von GRATZNER et al. (1975 und 1982) entwickelt. Der gebundene Antikörper kann am histologischen Schnitt mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden (De FAZIO et al., 1987).

In der folgenden Tabelle werden verschiedene Applikationsformen für BrdU und deren Vor- und Nachteile aufgeführt:

Tab. 4: Verabreichungsformen von BrdU (FOSTER, 1997; GOLDSWORTHY et al., 1991)

Methode	Vorteile	Nachteile
einmalige i.p. Injektion (= pulse labeling)	- geringe Kosten, da nur geringer Materialverbrauch	- kleines Zeitfenster
Verabreichung über das Trinkwasser	- geeignet für Langzeitstudien - geringes Intoxikationsrisiko für das Tier	- Aufnahme unterliegt circadianen Einflüssen - nicht geeignet bei Mehrfachbelegung der Käfige
s. c. Implantation von Retardkapseln	- geeignet für Langzeitstudien	- lokale Zytotoxizität - unkontrollierte Substanzabgabe - operativer Eingriff notwendig
osmotische Minipumpe	- konstante Substanzabgabe bis zu 28 Tage - nicht vom circadianen Rhythmus abhängig - gute Untersuchungsmöglichkeit für Organe mit niedrigem Mitoseindex	- Implantation soll laut Autor zu hormonellen Imbalancen führen - operativer Eingriff notwendig

i. p. = intraperitoneal, s. c. = subcutan

Bei der Verwendung der Retardkapseln fanden WEGHORST et al. (1991) eine paradoxerweise geringere Anzahl markierter Zellen nach 7-tägiger Implantation im Vergleich zur 4-tägigen Implantation. Auch kam es zu einem verminderten Leber- zu Körpergewichtsverhältnis. Sie führten dies auf eine inkonstante und zu Beginn zu starke Freisetzung des BrdUs aus den Retardkapseln zurück, da es beim Einsatz der osmotischen Minipumpen zur konstanten Zunahme der gelabelten Zellen und keinen Veränderungen im

Leber- oder Körpergewicht mit längerer Exposition kam. In hohen Dosen fanden sich bei in vitro Versuchen BrdU-assoziierte Mutationen in Säugerzellen in Form eines Austauschs von einzelnen Basenpaaren (DAVIDSON et al., 1988). Bei infantilen Ratten besitzt BrdU eine karzinogene Wirkung (NAPALKOV et al., 1989) und bei der Verabreichung an tragende Mäuse kommt es bei den Feten zu Mißbildungen wie Exenzephalie, Gaumenspalten und abnormaler Gliedmaßenentwicklung (BANNIGAN und LANGMAN, 1979). WEGHORST et al. (1991) applizierten Mäuse BrdU für 7 Tage über eine Minipumpe in einer Konzentration von 35,7 mg/ml und einer durchschnittlichen Ausflußmenge von 0,56 µl/Stunde (entspricht einer Konzentration von 20 µg/Stunde). Sie konnten bei den Tieren keine Abweichung der LI zu Tiere finden, die eine geringere Konzentration BrdU erhielten. Es fand sich auch keine Reduzierung des Körpergewichts oder sonstigen Anzeichen für einen toxischen Effekt. Häufig verwendete BrdU-Konzentrationen für Zellproliferationsstudien liegen bei 20 mg/ml Trägerflüssigkeit in der Minipumpe (De FAZIO et al., 1987; GOLDSWORTHY et al., 1991; ELDRIDGE et al., 1992).

Die ermittelten positiv gelabelten Zellen werden in Beziehung zur Gesamtzellzahl gesetzt und der prozentuale Anteil in Form des Labelingindex (LI) ausgedrückt (ELDRIDGE et al., 1990; GOLDSWORTHY et al., 1991).

Die Wahl der Applikationsform richtet sich nach dem zu untersuchenden Gewebe und der Fragestellung. In sich schnell teilenden Gewebe wie z. B. Darm oder Knochenmark können ausreichend hohe LI mittels der Pulse-Labeling Technik erzielt werden (De FAZIO et al., 1987). Mit Hilfe dieser Technik steht dem Körper nur eine einmalige BrdU-Gabe zur Verfügung. Da die Halbwertszeit von BrdU 0,5-1 h beträgt, stellt dies nur einen sehr kurzen Detektionszeitraum dar (WRIGHT und ALISON, 1984). In sich langsam teilenden Gewebe wie der Leber werden mittels der Pulse-Labeling-Methode nur geringe LI ermittelt. Hierbei kann ein durch eine Substanz hervorgerufener Effekt verdeckt bleiben oder übersehen werden (MARSMAN et al., 1988).

LANIER et al. (1989) und ELDRIDGE et al. (1990) zeigten, daß sich LI, die mit BrdU oder [³H]-Thymidin ermittelt wurden, nicht signifikant unterschieden. Aufgrund dessen hat sich BrdU als exogener Marker durchgesetzt. Dies ist auf die einfachere Handhabung, geringere Kosten und den schnelleren Erhalt der Ergebnisse zurückzuführen (GOLDSWORTHY et al., 1991; FOSTER, 1997).

2.5 Zellproliferation in der Leber

Im ausgewachsenen Organismus zählen die Hepatozyten zu den reversibel postmitotischen Zellen. Sie besitzen eine sehr niedrige basale Zellteilungsrate (0-5,4 Mitosefiguren/1000 Hepatozyten) (SURUR et al., 1985) und einen sehr hohen Differenzierungsgrad (PEREIRA und GROTHAUS, 1997). Werden sie entsprechend stimuliert, können sie erneut eine starke proliferative Aktivität entwickeln (MICHALOPOULOS und De FRANCES, 1997). Die durchschnittliche Lebensspanne eines Hepatozyten beträgt 200 bis 400 Tage (LEDDA-COLUMBANO et al., 1996).

2.5.1 Konzept der „streaming liver“

ZAJICEK et al. (1985) prägten den Begriff „streaming liver“. Ihre Untersuchungen an Ratten zeigten eine Wanderung der Hepatozyten vom Portalfeld zur abführenden Vene innerhalb von 200 Tagen. Hierbei durchlaufen die wandernden Hepatozyten unterschiedliche Differenzierungsstadien in Bezug auf ihre Enzymausstattung. ZAJICEK et al. (1985) gehen von hepatozytären Vorläuferzellen aus, die sich, ähnlich wie in der Epidermis oder in der Darmmukosa, im periportalen Bereich teilen und dann in Richtung Vene ausdifferenzieren. Einige Autoren unterstützen dieses Konzept (GEISLER et al., 1994; WERLICH et al., 1998). Verschiedene Autoren bezeichnen diese Vorläuferzellen als Ovalzellen und gehen davon aus, daß diese Zellen sich sowohl in Hepatozyten als auch in Gallengangsepithelzellen ausdifferenzieren können (SIRICA et al., 1990; SIGAL et al., 1992; SELL, 1994). MELVIN (1968) zeigte bei Mäusen, die mit der zytotoxisch wirkenden Substanz Tetrachlorkohlenstoff behandelt wurden, ein vermehrtes Auftreten von Mitosen und gelabelten Zellen in der Zone 1 nach Rappaport. Sie führten dies auf die bessere Blutversorgung zurück und nicht auf das Vorhandensein von Stammzellen. Andere Untersucher kamen jedoch zu dem Schluß, daß sich Hepatozyten unabhängig von ihrer Position teilen können und anschließend nicht „wandern“ (BRALET et al., 1994; KENNEDY et al., 1995; PONDER, 1996). PONDER et al. (1991) konnten auch zeigen, daß Hepatozyten eine längere Lebensdauer besitzen als die von den Anhängern der „streaming liver“-Theorie angegebenen 200 Tage. LEE et al. (1996) fanden in C57BL Mäusen im Gegensatz zur Ratte nur vereinzelt Ovalzellproliferationen nach dem Auftreten von Allylalkohol-induzierten Nekrosen. Es wurde jedoch eine gesteigerte Zellproliferation im angrenzenden, noch gesunden Gewebe beobachtet.

2.5.2 Zonale Unterschiede in der Zellproliferation

Untersuchungen zeigen, daß es nach Teilhepatektomie bei der Ratte zu unterschiedlichen Zeiten und in unterschiedlichen Zonen zu einer gesteigerten Zellproliferation kommt (RABES et al., 1976). LEE et al. (1998) fanden nach chemisch induziertem Zelltod ebenfalls in der Ratte eine kompensatorische Zellproliferation mit der stärksten Ausprägung im periportalen Bereich. Zu späteren Zeitpunkten findet die vermehrte Zellproliferation in der Mitte des Leberläppchens und perivenös statt. Hervorgerufen durch unterschiedliche mitogen wirksame Substanzen oder andere Stimuli können verschiedene Muster im Proliferationsverhalten der Hepatozyten festgestellt werden. So rufen Peroxisomenproliferatoren wie Wyeth 14,643, Nafenopin, Clofibrat und Ly 171883 (ELDRIDGE et al., 1990; EACHO et al., 1991; TANAKA et al., 1994) oder Tetrachlordibenzo-p-dioxin (FOX et al., 1993) in Ratten ein periportales Labelingmuster hervor. Bei Mäusen wird für Phenobarbital und Dieldrin ein perivenöses Labelingmuster beschrieben (KOLAJA et al., 1996c). Einige Studien zeigen, daß Steigerungen des LI übersehen werden können, wenn zonale Verteilungsmuster bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden (FOX et al., 1993; BAHNEMANN, 2000).

2.5.3 Auswertungsstrategien in der Leber

2.5.3.1 Gesamt-Labelingindex

Zur Bestimmung des Gesamt-LI gibt es verschiedene Methoden. Es werden in zufällig ausgewählten Feldern der Leber sowohl BrdU-positive als auch -negative Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Die Gesamtzellzahl, die hierbei ausgezählt wird, variiert meist zwischen 1000 und 2000 Zellen (ELDRIDGE et al., 1990; GOLDSWORTHY et al., 1991; MARSMAN et al., 1992; WADA et al., 1992; WILSON et al., 1992; LARSON et al., 1994a; STANDEVEN und GOLDSWORTHY, 1994).

Eine weitere Methode zur Bestimmung des LI ist die Beziehung der positiven Zellen zu einer bestimmten Fläche. Hierbei werden in z. B. 5 zufällig gewählten Arealen je 25 Felder a 1 mm^2 ausgewertet und der LI als Zellen pro mm^2 angegeben (WEGHORST et al., 1991).

DEES und TRAVIS (1993) bezogen die positiven Zellen auf 100 lichtmikroskopisch ausgewertete Felder bei einer 200-fachen Vergrößerung.

2.5.3.2 Zonale Auswertung

Tab. 5: Ermittlung von zonalen Zellproliferationsdaten in der Leber

Methode	Durchführung	Autoren
LI	BrdU-positive Zellen aus mind. 500 periportal oder zentrolobulär gelegenen Hepatozyten.	FOX et al. (1993)
LI	BrdU-positive Zellen aus mind. 500 zufällig gewählten Hepatozyten. Abstand der positiven Zellen zur Zentralvene wurde bestimmt	CHEN et al. (1995)
LI	BrdU-positive Zellen aus mind. 1000 Hepatozyten. Periportal = Abstand von 5 Zellen um Trias; zentrolobulär = Abstand von 5 Zellen um Zentralvene; mittlere Zone = Zellen, die dazwischen liegen.	KOLAJA et al. (1996c)
LI	BrdU-positive Zellen aus mind. 3000 Hepatozyten. Dreiteilung der Strecke Trias-Zentralvene und daraus sich ergebende Zonen 1, 2 und 3 (LZM = lobule-dependent zonal measurement).	BAHNEMANN und MELLERT (1997)

LI = Labelingindex, BrdU = s. Abkürzungen

2.5.4 Kontrollwerte der Zellproliferation in der Mäuseleber

2.5.4.1 B6C3F1 Maus

Tab. 6: Ermittelte Kontrollwerte proliferierender Zellen in der Leber männlicher B6C3F1 Mäuse

Methode	Alter	LI in %	Autoren
BrdU 2 h	10 Wochen	0,20	ELDRIDGE und GOLDSWORTHY (1996)
	20 Wochen	0,08	
BrdU 3 d	8 Wochen	0,11	ELDRIDGE et al. (1992)
	10 Wochen	0,69	ELDRIDGE et al. (1990)
	13 Wochen	0,17	ELDRIDGE et al. (1992)
BrdU 3,5 d	12 Wochen	1,00	LARSON et al. (1996)
	21 Wochen	0,50	
BrdU 6 d	11 Wochen	3,90	ELDRIDGE et al. (1990)
BrdU 7 d	keine Angabe	2,50	COUNTS et al. (1996)
	~28g KGW	3,63	CUNNINGHAM et al. (1994)
[³ H]Thymidin 7 d	9 Wochen	2,50	KOLAJA et al. (1996c)

LI = Labelingindex, h = Anzahl der Stunden, die eine BrdU-Gabe vor der Sektion appliziert wurde, d = Anzahl der Tage, die eine mit BrdU-oder [³H]Thymidin gefüllte Minipumpe appliziert wurde, KGW = Körpergewicht, BrdU = s. Abkürzungen

KOLAJA et al. (1996c) werteten Lebern von 9 Wochen alten B6C3F1 Mäusen zonal aus, nachdem den Tieren für 7 Tage eine mit [^3H]Thymidin gefüllte Minipumpe implantiert wurde. Der LI lag für alle 3 Zonen im Bereich von 2,5 %, wobei eine nur sehr geringgradige Abnahme der Werte von der periportal Zone zur perivenösen Zone hin zu beobachten war. Die Kontrollwerte variierten je nach Applikationsform des Labels. Niedrigste Werte wurden mit der Pulse-Labeling-Methode erzielt (0,08 %) (ELDRIDGE und GOLDSWORTHY, 1996). Mit Verlängerung der BrdU-oder [^3H]Thymidin-Verabreichung stiegen die LI an und lagen zwischen 2,5 und 3,9 % bei Verwendung einer 6- oder 7-Tage-Pumpe (ELDRIDGE et al., 1990; COUNTS et al., 1996). Mit zunehmendem Alter verringerten sich die LI (12 Wochen: 1,0 %; 21 Wochen 0,5 %) (LARSON et al., 1996). Bei der Verwendung von [^3H]Thymidin ergaben sich vergleichbare Kontrollwerte (2,5 %) (KOLAJA et al., 1996c) wie bei der Verwendung von BrdU (2,5 %) (COUNTS et al., 1996).

2.5.4.2 C57BL Maus

Tab. 7: Ermittelte Kontrollwerte proliferierender Zellen in der Leber männlicher C57BL Mäuse

Methode	Alter	LI in %	Autoren
BrdU 7 d	Keine Angabe	4,50	COUNTS et al. (1996)
	6 Wochen	1,80	ORTON et al. (1996)
	10 Wochen	3,80	
	18 Wochen	0,33	

LI = Labelingindex, d = Anzahl der Tage, die eine mit BrdU-oder [^3H]Thymidin gefüllte Minipumpe appliziert wurde, BrdU = s. Abkürzungen

Im Gegensatz zu den Kontrollwerten bei der B6C3F1 Maus liegen die LI hier höher (bis zu 4,5 % bei Benutzung einer 7-Tage-Pumpe) (COUNTS et al., 1996). Bei zwischen 6 und 18 Wochen alten Tieren findet sich das Maximum mit einem LI von 3,8 % bei 10 Wochen alten Mäusen (ORTON et al., 1996).

2.5.5 Bewertung von Labelingindizes

2.5.5.1 Zellzahl und Gruppengröße

Um die Varianz klein zu halten, sollten möglichst viele Zellen pro Schnitt ausgezählt werden, bei einer gleichzeitig großen Tierzahl pro Gruppe (möglichst > 10 Tiere) (MORRIS, 1993). Da die Anzahl der Tiere pro Gruppe einen stärkeren Einfluß auf die Varianz hat, sollte die Gruppengröße nicht zu Gunsten einer höheren Zellzahl verringert werden.

Bei einem LI von über 5 % konnte nach 3 ausgezählten Feldern (im Mittel 120 Zellen/Feld) keine Verringerung der Varianz erreicht werden, wenn noch Felder darüber hinaus ausgewertet wurden. Im Gegensatz dazu müssen in der Mäuseleber, wo die LI häufig unter 1 % liegen, deutlich mehr Felder und damit mehr Zellen ausgewertet werden oder es muß eine Mindestzahl an positiv markierten Zellen festgelegt werden, die ausgezählt werden soll (SOAMES et al., 1994).

2.5.5.2 Alter der Tiere

In den ersten 8-10 Lebenswochen kommt es durch das starke Größenwachstum der Organe zu hohen LI. Um Schwankungen in den Kontrolldaten zu vermeiden, sollten deshalb für Zellproliferationsstudien Tiere mit einem Mindestalter von 10-12 Wochen verwendet werden (GOLDSWORTHY et al., 1991).

2.5.5.3 Angaben zur Labelingindex-Steigerung

Wird ein Anstieg des LI bei behandelten Tieren als Vielfaches gegenüber den Kontrolltieren ausgedrückt, sollten auf jeden Fall die Varianz oder die Mittelwerte der Kontrolltiere mit angegeben werden. Bei niedrigen Kontrollwerten kann es zu hohen relativen LI-Steigerungen kommen, bei hohen Kontrollwerten besitzt dieser Faktor jedoch eine wesentlich stärkere Aussagekraft (MORRIS, 1993).

2.6 Prüfsubstanzen

2.6.1 Phenobarbital

Phenobarbital (PB), ein Barbitursäurederivat, wurde vielfach als Sedativum und zur Behandlung von Epilepsie eingesetzt. In der Veterinärmedizin findet es in dieser Form auch heute noch Verwendung (WHYSNER et al., 1996).

Sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen führt eine längerdauernde Gabe von Phenobarbital zur Entstehung von Lebertumoren (ROSSI et al., 1977; BUTLER, 1978; BECKER, 1982; EVANS et al., 1992). Es ist ein typischer Tumorpromoter in der Leber nach vorangegangener Initiation mit verschiedenen genotoxischen Substanzen (PERAINO et al., 1975; WARD et al., 1983; GOLDSWORTHY et al., 1984; DIWAN et al., 1986; PITOT et al., 1987; KOLAJA et al., 1996c). Phenobarbital besitzt ebenfalls eine promovierende Wirkung auf die Schilddrüse (HIASA et al., 1982; McCLAIN et al., 1989; KANNO et al., 1990). In Bakterien-Mutagenitätstests konnte keine mutagene Wirkung nachgewiesen werden (McCANN et al., 1975; MATSUSHIMA et al., 1985).

BECKER (1982) untersuchte die Tumoranfälligkeit verschiedener Mäusestämme nach Phenobarbital Behandlung. B6C3F1 und C57BL Mäuse erhielten hierbei 0,05 % Phenobarbital im Trinkwasser über 18 Monate. Die B6C3F1 Maus entwickelte zu 100 % Lebertumoren (Kontrolltiere 29 %), bei der C57BL Maus traten keine Tumoren auf. DIWAN et al. (1986) verabreichten der C57BL Maus 0,05 % Phenobarbital für bis zu 52 Wochen im Trinkwasser und konnten keine vermehrte Tumorentstehung feststellen. Auch EVANS et al. (1992) fanden keine statistisch signifikante Steigerung der Lebertumorinzidenz in der C57BL Maus nach einer bis zu 100-wöchigen Phenobarbitalgabe.

Die Lebern der mit Phenobarbital behandelten Tiere sind vergrößert, das relative Lebergewicht ist erhöht (LIN et al., 1989; CUNNINGHAM et al., 1991; EVANS et al., 1992; KOLAJA et al., 1996c). Histologisch fällt bei behandelten Tieren eine Hypertrophie und ausgeprägte Eosinophilie der perivenösen Hepatozyten auf (LIN et al., 1989; JIRTLE et al., 1991; EVANS et al., 1992). Ultrastrukturell ist in diesen Zellen eine deutliche Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulums zu finden (CUNNINGHAM et al., 1991), und es zeigt sich eine deutliche Induktion mikrosomaler Enzyme, wie zum Beispiel des Cytochroms P450 (LAKE et al., 1986; LIN et al., 1989). Weiterhin kommt es zu einer zonal unterschiedlichen Verteilung von Zytokinen: ORTON et al. (1996) fanden nach 1-wöchiger Phenobarbitalgabe an C57BL Mäuse erhöhte Werte des Wachstumsfaktors „transforming

growth factor α “ (TGF α) und dem korrespondierenden Rezeptor „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) in zentrilobulären Hepatozyten. Dagegen war die Expression des transforming growth factor β 1 (TGF β 1), ein Inhibitor der Zellproliferation, in diesem Bereich erniedrigt.

In der Zellkultur findet nach Zusetzen von Phenobarbital bei Hepatozyten der B6C3F1 Maus eine Hemmung des über gap junctions vermittelten interzellulären Kontaktes statt (RUCH et al., 1987). Es kam hierbei zu einem deutlich geringeren Übertritt von [5-³H]Uridin von Zelle zu Zelle nachdem Phenobarbital zugegeben wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese Hemmung der interzellulären Kommunikation unterbleibt jedoch bei Hepatozyten der C57BL Maus (KLAUNIG und RUCH, 1987).

2.6.1.1 Phenobarbital und Zellproliferation

Phenobarbital bewirkt in der Nagerleber eine Steigerung der Zellteilungsrate (WARD und OHSHIMA, 1985; SMITH et al., 1991; JONES und CLARKE, 1993). Bei 8 Wochen alten B6C3F1 Mäusen kam es nach Phenobarbitalgaben zu einer signifikanten Steigerung des LI über 28 Tage mit einem Maximum nach 7 Tagen. Nach 90 Tagen war der LI wieder auf Kontrollniveau gesunken (KOLAJA et al., 1996c). Bei der zonalen Verteilung fiel auf, daß der stärkste Anstieg des LI (> 6,5-fach) nach 7 Tagen perivenös zu finden war und über 28 Tage signifikant erhöht blieb.

SCHAFER und KLAUNIG (1991) behandelten männliche B6C3F1 Mäuse mit 500 mg Phenobarbital/l Trinkwasser. Nach 2 Wochen fand sich mit einer 15-fachen Erhöhung das Maximum der Zellproliferation. Nach 6 und 13 Wochen konnte keine behandlungsabhängige Steigerung der Zellproliferation mehr beobachtet werden.

COUNTS et al. (1996) verglichen die Wirkung von Phenobarbital auf die Zellproliferation in der Leber von B6C3F1 und C57BL Mäusen. Die Tiere erhielten 0,05 % Phenobarbital im Trinkwasser. Die LI wurden nach Einsatz einer 7-Tage BrdU-Pumpe ermittelt. Nach ein und zwei Wochen waren bei beiden Stämmen die LI signifikant erhöht. Das Maximum der LI fand sich nach einer Woche (B6C3F1: 7 %, > 2-fach über Kontrollwert; C57BL: 15 %, > 3-fach über Kontrollwert). Nach zwei Wochen waren die LI der B6C3F1 Maus 3-fach, die der C57BL 1,5-fach über die Kontrollwerte erhöht. Nach 4 Wochen fand sich bei beiden Stämmen keine signifikante Erhöhung mehr gegenüber den Kontrolltieren.

ORTON et al. (1996) verabreichte 5 Wochen alten C57BL Mäusen über 1, 4 und 13 Wochen Phenobarbital (2500 p.p.m. im Futter). Nach 1 Woche war der LI um das 12-fache erhöht, nach 4 Wochen lag er auf Kontrollniveau und nach 13 Wochen sogar geringfügig unter den

Kontrollwerten. Phenobarbital ruft somit eine transiente Steigerung des LI mit dem Maximum nach 1-2 Wochen hervor. Nach 4-6 Wochen befinden sich die LI wieder auf Kontrollniveau.

2.6.1.2 Phenobarbital und Apoptose

Bei Ratten kommt es unter Phenobarbitalbehandlung zu einer Hemmung der Apoptose sowohl im normalen als auch im präneoplastischen Lebergewebe (BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1989). KOLAJA et al. (1996b) konnten die Hemmung der Apoptose auch in mit Diethylnitrosamin induzierten „foci“ der Mäuseleber bestätigen. Nach 60 Tagen Phenobarbitalgabe lag der Apoptoseindex in präneoplastischen Herden bei 0,18 % im Vergleich zu 0,65 % in „foci“ von Tieren, die kein Phenobarbital erhielten (B6C3F1 Maus). Ein Vergleich mit nicht-fokalem Lebergewebe wurde nicht durchgeführt.

2.6.2 Chloroform

Chloroform findet Verwendung in Pestiziden, als Lösungsmittel sowie als Anästhetikum. Ferner fallen in der Papierindustrie in Form chemischer Zwischenprodukte und bei der Wasseraufbereitung große Mengen Chloroform an (INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY, 1994).

Wird Chloroform über einen längeren Zeitraum (bis zu 2 Jahren) in einer Konzentration von 138 oder 277 mg/kg Körpergewicht (KGW)/Tag an männliche und 238 oder 477 mg/kg KGW/Tag an weibliche B6C3F1 Mäuse verabreicht, kommt es zur Entstehung von Lebertumoren (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1976). In der Niere männlicher Osborne Mendel Ratten kommt es nach Gaben von 90 oder 180 mg Chloroform/kg KGW/Tag zur Tumorentstehung (JORGENSEN et al., 1985). In niedrigen Dosen (60 mg/kg KGW/Tag) verursacht Chloroform Nierentumoren in männlichen ICI Mäusen, bei C57BL, CBA und CF/1 Mäusen kann jedoch keine Tumorentstehung beobachtet werden (ROE et al., 1979).

Die Verabreichungsform von Chloroform spielt bei der Tumorentstehung eine große Rolle: wird per Schlundsonde appliziert, erhöht sich die Lebertumorprävalenz in männlichen und weiblichen B6C3F1 Mäusen (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1976). Bei der Gabe von vergleichbaren Dosen an weibliche B6C3F1 Mäuse über das Trinkwasser kann keine vermehrte Tumorentstehung festgestellt werden (JORGENSEN et al., 1985). Chloroform besitzt weiterhin eine karzinogene Wirkung auf die Schilddrüse weiblicher Ratten (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1976).

Weder für Chloroform noch für seine Metaboliten konnte eine DNA-Reaktivität in vitro oder in vivo nachgewiesen werden (REITZ et al., 1982; VAN ABBE et al., 1982; LARSON et al., 1994b).

Unter Chloroformbehandlung kommt es zu einer dosisabhängigen Reduzierung des Körpergewichtes und einer Erhöhung des relativen Lebergewichtes (LARSON et al., 1994a; 1994c; 1994d; 1996).

Histomorphologische Veränderungen sind abhängig von der Applikationsform und der Dosis. Wird Chloroform per Schlundsonde oder per Inhalation an männliche oder weibliche B6C3F1 Mäuse verabreicht, kommt es zur Leberzellschädigung (LARSON et al., 1993; 1994a; 1994c; 1994d; 1996; PEREIRA, 1994). In geringen Dosen (34-90 mg/kg KGW/Tag per Schlundsonde oder bei einer Konzentration von 30 p.p.m. in der Atemluft) findet sich eine Schwellung sowie ein Verlust der Eosinophilie der perivenösen Hepatozyten; in den Zellen der Zone 2 findet sich eine geringe Vakuolisierung. Bei höheren Dosierungen (138-238 mg/kg KGW/Tag oder 100 p.p.m.) kommt es zu vereinzelt Nekrosen im perivenösen Bereich und Degenerationen mit Vakuolenbildung in Zone 2. In hohen Dosierungen (277-477 mg/kg KGW/Tag oder 300 p.p.m.) sind bis zu 50 % der Leber nekrotisch, es kommt zu konfluierenden, perivenösen Nekrosen mit Infiltration von Entzündungszellen; periportal und in der Zone 2 gelegene Zellen weisen eine starke vakuoläre Degeneration auf. Lebern männlicher Tiere weisen im Vergleich zu weiblichen Tieren schon bei geringeren Dosen diese Veränderungen auf.

Wird hingegen Chloroform im Trinkwasser in vergleichbaren Dosen (1800 p.p.m.) verabreicht, kommt es bei einigen Tieren nur zu einem geringen Verlust der Eosinophilie perivenöser Hepatozyten (LARSON et al., 1994d). PEREIRA (1994) fand 5 Tage nach der Chloroformgabe im Trinkwasser (bis zu 1800 p.p.m.) kleine Hepatozyten mit dichtem, basophilem Zytoplasma. Zu späteren Zeitpunkten konnten keine Abweichungen gegenüber Lebern der Kontrolltieren beobachtet werden.

PEREIRA und GROTHAUS (1997) verabreichten männlichen B6C3F1 Mäusen für 33 Tage Chloroform (1800 p.p.m.) über das Trinkwasser. Anschließend erhielten die Tiere für 3 Tage 263 mg Chloroform/kg KGW per Schlundsonde, worauf geringere histopathologische Veränderungen auftraten als bei Tieren, die Chloroform ausschließlich per Schlundsonde erhielten. GEMMA et al. (1996) konnten keine morphologischen Veränderungen in Lebern männlicher B6C3F1 Mäuse feststellen, die eine einmalige Gabe von 150 mg Chloroform/kg KGW per Schlundsonde erhielten. Allerdings waren die Serumwerte der Alanin-Amino-

Transferase (ALT) und der Sorbit-Dehydrogenase (SDH) deutlich erhöht, was auf eine Zellschädigung in der Leber hindeuten könnte.

PERICIN und THOMANN (1979) testeten die akute Toxizität von Chloroform durch Ermittlung der LD₅₀ (Letaldosis) bei verschiedenen Mäusestämmen. Die männliche C57BL Maus war von allen Stämmen am wenigsten anfällig für die letalen Effekte. HILL et al. (1975) fanden in C57BL Mäusen, die nach einer Chloroformgabe verstorben waren, perivenöse Nekrosen in der Leber sowie Tubulusnekrosen in der Niere.

Chloroform hat in vitro keinen Einfluß auf gap junctions in Hepatozyten der B6C3F1 Maus und scheint so die interzelluläre Kommunikation auf diesem Wege nicht zu stören (RUCH et al., 1987).

Die durch Chloroform induzierte Hepatotoxizität wird mit seiner Metabolisierung durch ein Cytochrom P450 in Verbindung gebracht (MANSUY et al., 1977; SMITH und HOOK, 1984). CONSTAN et al. (1999) zeigten, daß das Cytochrom P450 2E1 verantwortlich ist für die Bildung toxischer Metabolite in der Leber von B6C3F1 Mäusen nach Chloroform Exposition. In der Leber kommt es durch Biotransformation von Chloroform zur Bildung der toxischen Metabolite Phosgen und Salzsäure (MANSUY et al., 1977; POHL et al., 1977). Das entstandene Phosgen wird für die zytotoxische Wirkung des Chloroforms verantwortlich gemacht (SMITH et al., 1983; COWLEN et al., 1984). Das Ausmaß der Organschädigung scheint abhängig zu sein von der Menge der gebildeten toxischen Metaboliten und der Fähigkeit der Zelle, entstandene Schäden zu reparieren (CONOLLY und BUTTERWORTH, 1995). PEREIRA (1994) vertritt die Ansicht, daß es durch die Applikation per Schlundsonde zu sehr hohen Konzentrationen in der Leber kommt, denen die zellulären Entgiftungsmechanismen nicht gewachsen sind. Wird dagegen Chloroform kontinuierlich über das Trinkwasser aufgenommen fehlen diese Konzentrationsspitzen und dementsprechend die nekrotischen Veränderungen.

2.6.2.1 Chloroform und Zellproliferation

Verschiedene Studien demonstrieren, daß die toxisch bedingten Veränderungen in der Leber eine regenerative Zellproliferation hervorrufen, es aber zu keiner Erhöhung des LI kommt, wenn eine Schädigung der Zellen unterbleibt. LARSON et al. (1994d) und PEREIRA (1994) zeigten, daß erst in Dosierungen, in denen Leberzellveränderungen auftraten, es zu einer Steigerung des LI in Abhängigkeit der verabreichten Dosis kam. Bei Tieren, die Chloroform

im Trinkwasser erhielten, fanden sich keine erhöhten LI. Der LI war im Gegenteil nach 4 Tagen gegenüber den Kontrolltieren signifikant erniedrigt.

Bei 9 Wochen alten männlichen B6C3F1 Mäusen fand sich ebenfalls eine dosisabhängige Steigerung des LI bei Chloroformgaben per Schlundsonde über 4 Tage oder 3 Wochen (LARSON et al., 1994a). Die Maxima der LI (30,3 % und 29,3 % gemessen mit einer 3,5 Tage BrdU-Pumpe) lagen zu beiden Zeitpunkten in der höchsten Dosisgruppe (277 mg/kg KGW/Tag).

GEMMA et al. (1996) konnten im Gegensatz dazu in männlichen B6C3F1 Mäusen keine morphologischen Veränderungen nach einer einmaligen Gabe von 150 mg Chloroform/kg KGW feststellen, fand jedoch eine signifikant erhöhte Zellteilungsrate nach 24 und 48 h. Die Serumwerte von ALT und SDH waren jedoch deutlich erhöht, was auf eine histomorphologisch noch nicht sichtbare Zellschädigung der Hepatozyten hindeuten könnte.

Nach einmaliger Chloroform-Applikation befanden sich nach 48 h die meisten Hepatozyten in der S-Phase (LARSON et al., 1993; GEMMA et al., 1996).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse gehen viele Autoren bei Chloroform von einem zytotoxischen Mechanismus aus. Darauf folgend kommt es zu einer regenerativen Zellproliferation, welche zur Tumorentstehung führt (REITZ et al., 1982; REITZ et al., 1990; BUTTERWORTH et al., 1995).

2.6.2.2 Chloroform und Apoptose

Bei Fischer-344 Ratten fand sich nach Verabreichung einer Mixtur von Grundwasser-Verunreinigungen, die unter anderem auch Chloroform enthielt, nach einmonatiger Behandlung eine geringgradig gesteigerte Apoptoserate (CONSTAN et al., 1996). Aufgrund der verschiedenen Substanzen konnte die Steigerung der Apoptose nicht eindeutig der Wirkung des Chloroforms zugeordnet werden. Die Autoren gingen von einer kompensatorisch erhöhten Apoptoserate in Folge der gesteigerten Zellproliferation aus.

GUASTADISEGNI et al. (1999) fanden in Lebern von Sprague-Dawley Ratten elektronenmikroskopische Änderungen an Mitochondrien nachdem den Tieren Chloroform in unterschiedlichen Dosen verabreicht wurde. Es kam zu einem Anschwellen der Mitochondrien bis hin zur Entstehung von Megamitochondrien. Ab einer Dosierung von 300 mg Chloroform/kg KGW konnte Zelltod in Form von Nekrose und Apoptose beobachtet werden.

Einige Autoren beobachteten jedoch ausschließlich das Auftreten von Nekrosen bei mit Chloroform-behandelten Mäusen (HILL et al., 1975; LARSON et al., 1993; 1994a; 1994c; 1994d; 1996; PEREIRA, 1994)

2.6.3 Wyeth 14,643

Wyeth 14,643 ([4-Chloro-6(2,3-xylyldino)-2-pyrimidinylthio]azetat) gehört zur Gruppe der Peroxisomenproliferatoren (PP). Diese Stoffe finden vor allem als Weichmacher, Herbizide, Lösungsmittel und Lipidsenker Verwendung (REDDY und LAWANI, 1983; MARSMAN et al., 1988; EACHO et al., 1991). Sie führen zu einer starken Vermehrung und Vergrößerung der Peroxisomen in den Lebern behandelter Tiere (LOCK et al., 1989). Unter physiologischen Bedingungen nehmen Peroxisomen ca. 2 % des Zytoplasmavolumens ein (REDDY und LAWANI, 1983); nach der Behandlung mit PP können die Peroxisomen bis zu 25 % des Zytoplasmavolumens einnehmen (KOLDE et al., 1976; MOODY und REDDY, 1976). Dadurch kommt es zu einer Vergrößerung der Leber in Folge von Hepatozytenhypertrophie und -hyperplasie sowie zu einer transkriptionalen Erhöhung von Enzymen, die in den Fettsäurestoffwechsel eingreifen. Bei Mäusen kommt es zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung der Carnitinacetyltransferase im Zusammenhang mit einem gesteigerten Metabolismus von Acetylcoenzym A (Acetyl-CoA) sowie zu einer Senkung der Serumspiegel von Cholesterol und Triglyzeriden (REDDY et al., 1977; MOODY und REDDY, 1978).

Gaben von PP führen zur Entstehung von Lebertumoren bei Ratten und Mäusen (LAWANI et al., 1982; REDDY und LAWANI, 1983; RAO et al., 1988b). ISENBERG et al. (1997) initiierte B6C3F1 Mäuse mit Diethylnitrosamin (DEN) und fand in anschließend mit Wyeth 14,643 behandelten Tieren eine höhere Tumorprävalenz als in den ausschließlich initiierten Kontrolltieren. Für Wyeth 14,643 liegen keine Daten zur kanzerogenen Wirkung bei den von uns benutzten, nicht initiierten Mäusestämmen vor. REDDY et al. (1979) verabreichten Wyeth 14,643 in Konzentrationen von 0,05-0,1 % für bis zu 16 Monate an CS^b Mäuse und F344 Ratten. Sie stellten in beiden Spezies bei allen Tieren Lebertumoren fest. Bei den Kontrollgruppen kam es dagegen nicht zu einer Entstehung von Tumoren. Die PP erweisen sich im Salmonella-Mutagenitätstest als nicht mutagen und es kann auch keine Bindung an die DNA oder deren Schädigung beobachtet werden (WARREN et al., 1980; GOEL et al., 1985).

Der Mechanismus der Tumorentstehung ist bis jetzt noch nicht entgültig geklärt (REDDY und LAWANI, 1983). Es bestehen jedoch verschiedene Hypothesen: aufgrund der peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren, hervorgerufen durch PP, kommt es zu einer starken Bildung von

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (REDDY und RAO, 1989). Die H_2O_2 -abbauenden Enzyme (z. B. Katalase) sind nur wenig erhöht, wodurch es zu einem Überschuß an H_2O_2 kommt, dem sogenannten oxidativen Streß (s. 2.2.3) (REDDY und RAO, 1986). Infolge des oxidativen Stresses kann es entweder direkt oder durch die Peroxidation von Lipiden zu DNA-Schäden kommen (CERUTTI, 1985; MACHLIN und BENDICH, 1987; OLSON, 1988).

Eine Rezeptor-vermittelte Reaktion stellt einen weiteren möglichen Wirkmechanismus dar. Es wurden Mitglieder der Familie der Steroidhormonrezeptoren identifiziert, welche durch PP aktiviert werden können (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) (ISSEMAN und GREEN, 1990). Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es bei Ratten und Mäusen zu einer veränderten Expression von PPAR-Zielgenen und so zu Störungen im Zellzyklus, wodurch ihre karzinogene Wirkung erklärt wird (PETERS et al., 1998; ANDERSON, et al., 1999). Verschiedene Autoren konnten zeigen, daß Mäuse, denen genotypisch der PPAR-Rezeptor fehlt, unter einer Behandlung mit Wyeth 14,643 weder gesteigerte LI zeigten noch, im Unterschied zu den PPAR tragenden Wildtypen, Tumoren entwickelten (LEE et al., 1995; PETERS et al., 1997).

Andere Autoren machen die erhöhte Zellproliferation für die Tumorentstehung verantwortlich. So zeigten MARSMAN et al. (1988) an Ratten, daß sowohl Wyeth 14,643 als auch Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) eine gleichartige Peroxisomenproliferation induzieren. Zur Entwicklung von Tumoren kommt es allerdings nur unter Wyeth 14,643-Gaben. Hier waren die LI anhaltend um das 5 bis 10-fache erhöht, wohingegen es unter der DEHP-Behandlung zu keiner anhaltend gesteigerten Zellteilungsrate kam. Werden B6C3F1 Mäuse gleichzeitig mit Wyeth 14,643 und dem Antikarzinogen Rotenon behandelt, sind sowohl der LI als auch die Entstehung von Tumoren signifikant niedriger als bei den allein mit Wyeth 14,643 behandelten Tieren (CUNNINGHAM et al., 1995; ISENBERG et al., 1997).

ROSE et al. (1997) machen aktivierte Kupffersche Sternzellen für den mitogenen Effekt der PP in der Leber verantwortlich. Kupffersche Sternzellen enthalten große Mengen an mitogen wirksamen Zytokinen, wie z. B. Tumor Nekrose Faktor α ($\text{TNF}\alpha$) (DECKER, 1990; BOJES et al., 1997). Werden Kupffersche Sternzellen durch Wyeth 14,643 aktiviert, kommt es zu einem deutlichen Anstieg von $\text{TNF}\alpha$ und somit zur vermehrten DNA-Synthese in Hepatozyten (ROSE et al., 1997). Werden die Kupfferschen Sternzellen jedoch vor der Wyeth 14,643-Gabe mit der nicht verstoffwechselbaren Fettsäure Methylpalmitat inaktiviert, kann kein durch Wyeth 14,643 hervorgerufener mitogener Effekt beobachtet werden (ROSE et al., 1997).

Bei der Verabreichung von Wyeth 14,643 an B6C3F1 und C57BL Mäusen kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des absoluten sowie auch des relativen Lebergewichtes (LANIER et al., 1989; ELDRIDGE et al., 1990; LUNDGREN et al., 1990; ISENBERG et al., 1997). In Lebern von Swiss-Webster Mäusen kommt es nach der Behandlung mit Wyeth 14,643 ebenfalls zu einem deutlich erhöhten relativen Organgewicht (REDDY et al., 1977; MOODY und REDDY, 1978). Die Hepatozyten erscheinen vergrößert und enthalten zahlreiche eosinophile Granula. Ultrastrukturell fällt die stark erhöhte Anzahl an Peroxisomen und eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums auf (MOODY und REDDY, 1978).

2.6.3.1 Wyeth 14,643 und Zellproliferation

CUNNINGHAM et al. (1995) behandelten männliche B6C3F1 Mäuse (keine Altersangabe) über 7 Tage mit 100 p.p.m. Wyeth 14,643 im Futter und implantierten den Tieren zur selben Zeit eine 7-Tage osmotische Minipumpe, die mit BrdU gefüllt war. Der LI lag bei 67,6 % und war auf mehr als das 4-fache über die Kontrollwerte erhöht.

ELDRIDGE et al. (1990) verabreichten Wyeth 14,643 in einer Konzentration von 0,1 % über 5 Tage im Futter an 10 Wochen alte, männliche B6C3F1 Mäuse. Der LI wurde nach Einsatz einer 6-Tage BrdU-Minipumpe ermittelt und lag bei 28 %; dies entsprach ebenfalls einer 4-fachen Steigerung. Die markierten Zellen wiesen kein zonales Verteilungsmuster auf, im Gegensatz zur ebenso behandelten F344 Ratte, die ein periportales Labelingmuster zeigte. SMITH et al. (1991) fanden ebenfalls ein panlobuläres Verteilungsmuster der markierten Zellen bei CD-1 Mäusen und das Vorkommen von markierten Zellen vor allem im periportalen Bereich bei SD Ratten. Die Tiere wurden über 1 oder 5 Wochen mit 0,1 % Wyeth 14,643 im Futter behandelt und es wurde eine BrdU-gefüllte Minipumpe 7 Tage vor der Tötung implantiert. Männliche Mäuse wiesen einen LI von 40 % nach 1 und 60 % nach 5 Wochen auf. Die LI der Kontrolltiere lagen zu beiden Zeitpunkten bei ca. 3 %.

Bei weiblichen B6C3F1 Mäusen, die ebenfalls mit 0,1 % Wyeth 14,643 über das Futter für 5 Tage behandelt wurden und an den Tagen 2 bis 5 jeweils eine einmalige i. p. Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht BrdU erhielten, fand sich ein 14-fach höherer LI bei den behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrolle (LANIER et al., 1989).

Wyeth 14,643 ruft somit in Mäusen anhaltend erhöhte LI (ermittelt bis zu 5 Wochen) hervor.

2.3.6.2 Wyeth 14,643 und Apoptose

Als weiterer kanzerogener Wirkmechanismus der PP wird eine Hemmung der Apoptose diskutiert. In den Lebern von Ratten, sowie in Zellkulturen von Mäuse- und Rattenhepatozyten konnte eine Verringerung der Apoptoserate in Folge von PP-Gaben nachgewiesen werden (BAYLY et al., 1994; ROBERTS et al., 1995; JAMES und ROBERTS, 1996).

MARSMAN et al. (1992) fanden jedoch in Ratten nach der Gabe von Wyeth 14,643 über 22 Wochen eine erhöhte Apoptoserate. ISENBERG et al. (1997) konnten in mit Diethylnitrosamin (DEN) initiierten B6C3F1 Mäusen sowohl im fokalen als auch im nicht-fokalen Lebergewebe nach Wyeth 14,643-Gaben ebenfalls einen Anstieg der Apoptoserate nachweisen.

Initiierte Zellen sollen jedoch eine selektive Resistenz gegenüber Apoptosesignalen aufweisen (SCHULTE-HERMANN et al., 1990; KOLAJA et al., 1996b). Im Fall von Wyeth 14,643 schrieben MARSMAN und BARRETT (1994) apoptoseresistenten Hepatozyten einen doppelten Wachstumsvorteil zu: eine passive Resistenz gegenüber induziertem Zelluntergang und eine vermehrte Zellteilung dieser resistenten Zellen, um den Verlust der umgebenden Zellen auszugleichen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere

Es wurden je 180 männliche B6C3F1 und C57BL/6 Mäuse (Centre d'Elevage R. Janvier, Frankreich) eingesetzt. Bei Ankunft waren die Tiere 8 Wochen alt und gewöhnten sich in einer 2-wöchigen Adaptationsperiode an die Umgebungsbedingungen.

3.1.2 Haltungsbedingungen

Die Mäuse wurden einzeln in Makrolonkäfigen, Typ MI (Becker und Co., Castrop-Rauxel) gehalten. Die Räum waren zentral klimatisiert mit einem Temperaturbereich von 20-24° C und einer Luftfeuchte von 30-70 %. Es herrschte ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Den Tieren stand Futter (Kliba-Haltungsdiät, Firma Kliba Mühlen, Schweiz) und Trinkwasser ad libitum zur Verfügung.

3.1.3 Randomisierung

Die Tiere wurden vor Studienbeginn auf Gruppen zu je 10 Tiere verteilt. Die Liste der Randomisierungsanweisungen wurde mit einem Personal Computer erstellt (Labordatenverarbeitung, BASF AG). Die Mäuse wurden mit fortlaufenden Nummern durch eine Ohrtätowierung gekennzeichnet.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Dosisgruppen

Die Tiere beider Mäusestämme wurden in je 3 unbehandelte Kontrollgruppen (á 30 Tiere) und 3 mit Substanz behandelte Gruppen (á 30 Tiere) aufgeteilt. Die Tiere wurden 1, 4 und 13 Wochen nach Versuchsbeginn getötet (jeweils 10 Tiere/Gruppe).

Tab. 8: Mäusestamm, Substanz und Applikation

Stamm	Substanz	Dosis	Art der Applikation	Frequenz der Applikation	Vehikel
B6C3F1	Phenobarbital	500 ppm	oral	täglich	Futter
B6C3F1	Chloroform	120 mg/kg KGW	via Schlundsonde	5 x pro Woche	10 ml/kg KGW Olivenöl DAB
B6C3F1	Wyeth 14,643	100 ppm	oral	täglich	Futter
C57BL	Phenobarbital	500 ppm	oral	täglich	Futter
C57BL	Chloroform	238-120* mg/kg KGW	via Schlundsonde	5 x pro Woche	10 ml/kg KGW Olivenöl DAB
C57BL	Wyeth 14,643	100 ppm	oral	täglich	Futter

KGW = Körpergewicht

*nach dem Tod von 3 Tieren wurde die Dosis auf 160 mg/kg KGW und nach dem Tod von 2 weiteren Tieren auf 120 mg/kg KGW reduziert.

Den ersten Kontrollgruppen (Kontrolle 1) beider Stämme wurde 2 h vor der Tötung 100 mg 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) pro kg Körpergewicht in physiologischer Kochsalzlösung (20 mg/ml) intraperitoneal injiziert.

Den zweiten Kontrollgruppen (Kontrolle 2) wurde am 3. Tag vor der Tötung, den verbleibenden Kontrollgruppen (Kontrolle 3) und den behandelten Gruppen am 7. Tag vor der Tötung unter Methoxyfluran-Narkose (Metofane[®], Janssen Cilag GmbH, Neuss) eine osmotische Minipumpe (Alzet Osmotic Pump, Modell 2001, Alza Corporation, Palo Alto, USA) subcutan im Lendenbereich implantiert. Die Minipumpen wurden zuvor mit 200 µl physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, die BrdU in einer Konzentration von 20 mg/ml enthielt. Der kontinuierliche Ausfluß aus der Pumpe betrug 1 µl/h.

Tab. 9: Pumpenverweildauern bei beiden Mäusestämmen vor der Tötung

Behandlungsdauer	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Phenobarbital	Chloroform	Wyeth 14,643
1 Woche	2 h i.p. Injektion	3 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe
4 Wochen	2 h i.p. Injektion	3 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe
13 Wochen	2 h i.p. Injektion	3 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe

i.p. = intraperitoneal, d = Tag

3.3 Histopathologische Aufarbeitung

3.3.1 Sektion

Zur Organentnahme wurden die Tiere unter CO₂-Narkose dekapitiert. Nach Entblutung wurden die Tiere sezirt sowie die Lebern entnommen und gewogen.

3.3.2 Fixierung und Trimmen der Organe

Aus dem Lobus dexter lateralis und dem Lobus dexter medialis der Leber wurden sofort nach der Sektion ca. 3 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Leberscheiben wurden zusammen mit einer ca. 2 mm langen Dünndarmprobe in einer Einbettungskapsel zusammengebracht und für 24 bis 48 Stunden in 4 % Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Gewebeproben in 70 % Ethanollösung überführt und dort für mindestens 24 Stunden belassen.

3.3.3 Einbetten der Organe

Die Gewebeproben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 70 %, 2 x 96 % und 2 x 100 %) sowie in reinem Xylol (2 x) entwässert und entfettet. In einem Einbettautomaten (Shandon 2L Prozessor MK II) wurden die Proben bei 60° C in Paraplast eingebettet.

3.3.4 Schneiden der Paraffinblöcke

Die Paraffinblöcke wurden auf -2° C gekühlt und mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM 355) wurden 3-4 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, die mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS, Sigma) beschichtet waren. Von jedem Block wurden mindestens 5 Schnitte angefertigt, die für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung, eine immunhistologische BrdU-Färbung, sowie als Reserve und zur Etablierung von Inkubationsprotokollen verwandt wurden. Bei jedem Färbedurchlauf wurde pro Tier ein Schnitt als Negativkontrolle mit Kontrollantikörper Super Sensitive Negative Control HK 119-7M (BioGenex) anstelle des primären Antikörpers 247-5M (BioGenex) inkubiert.

3.3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol für 10 Minuten. Rehydrieren in der absteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten in 100 %, 96 % und 70 % Ethanol).
- Färben mit Hämatoxylin nach Ehrlich (sauer) für 3 Minuten.

- Kurzes Eintauchen in fließendes Leitungswasser zum Bläuen der Kerne.
- Eintauchen in Differenzierungsmedium (0,5 % Salzsäure in 70 % Alkohol) für 5 Sekunden, wässern in fließendem Leitungswasser für 5 Minuten.
- Gegenfärben in Eosin für 1 Minute.
- Eintauchen in Differenzierungsmedium (0,1 % Essigsäure) für 5 Sekunden.
- Dehydrieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 %) mit abschließendem Xylolbad.
- Eindecken der Schnitte mit Eindeckmedium Pertex im Eindeckautomaten Promounter RCM 90.

3.3.6 Immunhistologische Färbung

3.3.6.1 Entparaffinierung und Rehydrierung

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol für 2 x 5 Minuten.
- Rehydrieren in der absteigenden Alkoholreihe (je 2 x 5 Minuten in 100 %, 96 % und 70 % Ethanol).
- Wässern in destilliertem Wasser und PBS (0,1 M, pH 7,4, BioGenex) für je 5 Minuten.

3.3.6.2 Antigen-Retrieval

- Vorverdauung in 0,1 % Protease P6911 (Sigma) in PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex) für 2 Minuten bei 37° C.
- Waschen mit destilliertem Wasser für jeweils einige Sekunden (2x).
- Hydrolyse in 4 N Salzsäure (pH 0,8) für 30 Minuten.
- Waschen in destilliertem Wasser für jeweils einige Sekunden (4x).

3.3.6.3 Immunhistologisches Färbeprotokoll

- Zur Verkleinerung der Fläche, die mit Antikörper benetzt werden soll, wird das Organ mit einem Fettstift umfahren (Pap-Pen, Biogenex XT001 PP).
- Einsetzen der Schnitte in eine feuchte Kammer.
- Waschen mit PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex) für 5 Minuten.
- Absaugen des Puffers.

- Auftragen von 300 µl des primären Antikörpers Mouse-anti-BrdU (Verdünnung 1:800, 247-5M, BioGenex). Inkubation bei + 4° C für 24 Stunden.
- Umsetzen der Schnitte in ein automatisches Färbegerät (OptiMaxTM Automated Cell Staining System, BioGenex). Einfüllen der errechneten Volumina der verwendeten Lösungen (300 µl/Schnitt) vor jedem Durchlauf.
- Waschen mit PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex) für einige Sekunden.
- Auftragen des sekundären Antikörpers Multilink Anti-Ig for Mouse, Rabbit, Guinea Pig and Rat Antibodies HK 268-UK (Verdünnung 1:20, BioGenex) und Inkubation für 20 Minuten.
- Waschen mit PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex).
- Auftragen des Alkalische-Phosphatase-konjugierten Streptavidins in PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex, Verdünnung 1:20, BioGenex, LSAB-Methode: labeled streptavidin-biotin) und Inkubation für 20 Minuten.
- Waschen mit PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex) für einige Sekunden.
- Herausnehmen der Schnitte aus dem Färbeautomaten. Lösen einer Tablette Chromogens Fast Red (5 mg) in Naphthol-Phosphat und Tris-Puffer (5 ml) (BioGenex) nach Anweisung des Herstellers. Fast Red ist in Lösung instabil und muß deshalb vor jeder Anwendung unmittelbar frisch angesetzt werden.
- Auftragen von je 300 µl der Fast Red Lösung für 5-10 Minuten. Die Zeitspanne, die das Chromogen auf den Organschnitten belassen wurde, richtete sich nach dem Grad der Anfärbung, die mikroskopisch kontrolliert wurde.
- Waschen mit destilliertem Wasser für einige Sekunden.
- Gegenfärben mit Hämatoxylin nach Mayer für 5 Minuten.
- Bläuen in fließendem Leitungswasser für 5 Minuten.
- Eindecken mit erwärmter (45° C) Kaisers Glyceringelatine und Deckgläschen.
- Versiegeln der Deckgläschen mit Pertex-Eindeckmedium nach 24 Stunden.

3.4 Auswertung der immunhistologischen Schnitte

3.4.1 Hilfsmittel der Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines rechnergestützten Bildanalyse-Systems der Firma Zeiss (Axioskop 2, KS 400/3.0, Farbkamera Sony 3CCD Typ MC-3250, INTEL Pentium II). Das Okular vergrößerte 20-fach und das Objektiv 10-fach, das heißt, es wurde mit einer 200-fachen Vergrößerung gearbeitet. Zur Bildbearbeitung wurde das Programm „Prolcount.MCR“ der Firma Zeiss Vision verwendet.

3.4.2 Auswertestrategien

Pro Tier wurden 2 verschiedene Leberlappen untersucht, um eine genügend große Anzahl an auswertbaren Meßfeldern und eine bessere Repräsentation der gesamten Leber zu erhalten. In jedem Leberlappen wurden 5 Areale (mit Portalgefäßen und Zentralvene) gewählt, die in 3 Meßfelder mit je ca. 100 Zellen unterteilt wurden. Insgesamt wurden so ca. 3000 Zellen pro Tier ausgezählt. Die Unterteilung der Meßfelder erfolgte nach der lobule-dependent zonal measurement Methode (LZM; BAHNEMANN und MELLERT, 1997). Hierbei wurde die Strecke zwischen Portalgefäßen und Zentralvene in drei gleich große Abschnitte geteilt (Zone 1, Zone 2 und Zone 3). Zone 1 ist hierbei portalnahe, Zone 3 liegt venennah und Zone 2 in der Mitte zwischen den Gefäßen. Die drei Zonen wurden am Bildschirm umfahren und so die zu messenden Abschnitte festgelegt. Der durchschnittliche Abstand zwischen Portalgefäß und Zentralvene betrug 350 µm.

BrdU-positive Zellkerne konnten durch den inkorporierten roten Farbstoff detektiert werden. BrdU-negative Zellkerne stellten sich auf Grund der Gegenfärbung blau dar.

Um repräsentative Werte zu erhalten, wurden die Lebern von 10 Mäusen pro Gruppe ausgewertet.

3.4.2.1 S-Phasen-Response

Zur Bestimmung des Labelingindex (LI) wurden sowohl BrdU-positive (Hepatozyten in S-Phase) als auch die BrdU-negative Hepatozyten gezählt. Der Labelingindex wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{LI (\%)} = \frac{\text{positive Zellen}}{\text{positive + negative Zellen}} \times 100$$

Der Gesamtlabelingindex (Gesamt-LI) berechnete sich aus dem Anteil der positiven Zellen aller 3 Zonen an der Gesamtzellzahl.

3.4.2.2 Mitoseindex

Der LI ist ein Indikator für Zellen in der S-Phase. Zur Kontrolle ob die markierten Zellen anschließend die Mitose-Phase durchlaufen, wurde der Mitoseindex (MI) bestimmt. Die lichtmikroskopische Auswertung (Axioskop, Zeiss) erfolgte ebenfalls bei einer 200-fachen Vergrößerung am Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitt. Bei fraglichen Strukturen wurde zur Überprüfung der Mitosefigur eine Kontrolle bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Wie schon bei der Bestimmung des LI wurden je Leberlappen 5 Areale mit je 3 Meßfeldern (Zone 1, Zone 2 und Zone 3) zwischen Portalfeld und Zentralvene gewählt. Der Mitoseindex (MI) wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{MI (\%)} = \frac{\text{Mitosefiguren}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

Da die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten und immunhistologischen Schnitte in Serie hergestellt wurden und wir somit von einer annähernd gleichen Zellverteilung und -zahl ausgingen, wurde die Gesamtzellzahl zur Vereinfachung aus der Berechnung des LI übernommen. Hierbei wurde entweder die Zellzahl der einzelnen Zonen oder die Zellzahl aus der Berechnung des Gesamt-LI zur Bestimmung der zonalen MI oder des Gesamt-MI verwendet.

3.4.2.3 Apoptoseindex

Zur Überprüfung eines Effektes der Substanzen auf die Apoptoserate wurden nach demselben Schema, das zur Mitoseauswertung (s. 3.4.2.3) angewandt wurde, auch apoptotische Zellen in Form von Apoptosekörperchen im Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitt gezählt. Die apoptotischen Körperchen wurden anhand morphologischer Kriterien im Lichtmikroskop detektiert (s. 2.1.4). In Gruppen liegende apoptotische Körperchen wurden als einzelnes Ereignis gewertet, da deren Ursprung aus einer Zelle angenommen wird (BURSCH et al., 1985; GOLDSWORTHY et al., 1996). Der Apoptoseindex (AI) wurde wie folgt berechnet:

$$\text{AI (\%)} = \frac{\text{apoptotische Körperchen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

Die Gesamtzellzahl wurde zur Vereinfachung aus der Berechnung des LI übernommen (s. 3.4.2.2). Hierbei wurde entweder die Zellzahl der einzelnen Zonen oder die Zellzahl aus der Berechnung des Gesamt-LI zur Bestimmung des zonalen AI oder Gesamt-AI verwendet.

3.4.3 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und –auswertung erfolgte mit Ausnahme der Daten der Körper- und Lebergewichte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMPD/Dynamic, Release 7.0 durchgeführt. Die graphischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm PlotIT, Version 2.0 erzeugt.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, das heißt Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3.4.3.1 Vergleich der Pumpenzeiten sowie der Mitose- und Apoptoseindizes

Bei den semiquantitativen Variablen der unterschiedlichen Pumpenverweildauern erfolgte die Datenbeschreibung durch die Angabe der Mediane (\tilde{x}) und der Quartile (Q1 und Q3). Zur statistischen Prüfung kam aufgrund der semiquantitativen Merkmale der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz.

3.4.3.2 Vergleich der zonalen und totalen Zellproliferation der behandelten Gruppen mit der Kontrollgruppe

Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der Daten wurde eine logarithmische Transformation durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten (\bar{x}_g) und der Streufaktoren (SF) vorgenommen. Zur statistischen Prüfung des Gruppen- und Zeiteinflusses wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Da statistisch signifikante Unterschiede und Wechselwirkungen auftraten, wurden die Gruppen mit den Kontrollen im Anschluß paarweise getrennt nach Behandlungszeitpunkten mit dem Dunett-Test verglichen.

3.4.3.3 Körper- und Lebergewichte

Die Auswertung der Körper- sowie der relativen und absoluten Lebergewichte wurde auf Rechnern der Abteilung Toxikologie der BASF AG im Rahmen von Zellproliferationsstudien (S-Phasen-Response-Studien) durchgeführt. Zur Datenbeschreibung wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) berechnet. Die behandelten Gruppen wurden mit den unbehandelten Kontrollgruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test und im Anschluß paarweise mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test verglichen. Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau wie oben zugrunde gelegt (s.3.4.3).